

# Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.) tratadas con *Trichoderma harzianum*

Mohammed Ezziyani, Maria Emilia Requena, & Maria Emilia Candela

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo (Murcia), España.

## Resumen

### Correspondencia

M. E. Candela

Tel.: +34 968 364943

Fax: +34 968 363963

E-mail: mcandela@um.es

**Recibido:** 10 Octubre 2005

**Aceptado:** 23 Noviembre 2005

En este trabajo se evalúa la reacción defensiva que desarrollan las plantas de pimiento, cuando se inoculan los tallos con el patógeno *Phytophthora capsici* y se adiciona a las raíces el hongo antagonista *Trichoderma harzianum*. Así mismo se comprueba que el tratamiento de las semillas con esporas de *T. harzianum* incrementa el porcentaje de germinación y el peso seco de las plántulas de pimiento. Las hifas del antagonista colonizan las raíces y la rizosfera de las plántulas crecidas de semillas tratadas, pero el hongo antagonista no alcanza la parte aérea de las plantas de pimiento. La infección de los tallos de pimiento con el patógeno produce una reacción de hipersensibilidad pero la progresión de la necrosis se ralentiza en las plantas tratadas con el antagonista *T. harzianum* lo que significa una reducción del avance del patógeno mediada por una inducción de resistencia. La adición del antagonista *T. harzianum* a las plantas de pimiento inoculadas con *P. capsici*, produce una reacción defensiva con producción de proteínas con actividad peroxidasa. El incremento de actividad afecta tanto a las enzimas constitutivas, como a las que se sintetizan "de novo", pero el incremento de actividad que se detecta en las plantas control es debido al efecto de la herida y no al tratamiento, pues no progresa a lo largo del tiempo. El tratamiento con *T. harzianum* en las raíces produce una reacción sistémica en las hojas que se resuelve en producción de proteínas-PR con actividad peroxidasa, a pesar de que las hojas no han sido afectadas por el antagonista ni por el patógeno. Estas peroxidasas-PR son básicas de pl 7,2 y 8,7 y solo se detectan en hojas tratadas con *T. harzianum* viva y a las 96 horas de inoculación. También se observa incremento de la actividad peroxidasa de las raíces y se detecta la producción de una proteína-PR tanto a las 24 como a las 96 horas. Esta isoenzima es ácida de pl 4,3 y aparece debido al tratamiento con *T. harzianum* tanto viva como auto-clavada, pero no aparece en el control ni en las raíces tratadas con agua-peptona. Esto significa que el elicitor es un componente del micelio del hongo que provoca la reacción defensiva con formación de las peroxidasas. La producción de proteínas-PR con actividad peroxidasa debe formar parte del mecanismo de defensa hipersensible de la planta de pimiento y es el responsable de la inducción de resistencia desarrollada por la planta, después del tratamiento con el hongo antagonista y la infección por el patógeno.

**Palabras clave:** Biocontrol, *Capsicum annuum*, Peroxidasas, *Phytophthora capsici*, Proteínas-PR, *Trichoderma harzianum*.

## Abstract

*Production of PR proteins during the induction of resistance to Phytophthora capsici in pepper (Capsicum annuum L.) plants treated with Trichoderma harzianum.*

We evaluate the defensive reaction of pepper plants after inoculating the stems with the pathogen *Phytophthora capsici* and treating the roots with the antagonist *Trichoderma harzianum*. Treating the seeds with *T. harzianum* increases the germination percentage and dry weight of the seedlings. The hyphae of the antagonist colonise the roots and the rhizosphere of the seedlings grown from treated seeds although the fungus does not grow in the aerial part of the plants. Infection of the stems with the pathogen produces a hypersensitivity reaction but necrosis is slowed down in plants treated with the antagonist *T. harzianum*, as a result of induced resistance. The addition of the antagonist *T. harzianum* to plants inoculated with *P. capsici* produces a defensive reaction involving the production of proteins showing peroxidase activity. The increase in activity affects both constitutive enzymes and those synthesised "de novo", although the increase in activity detected in control plants is due to the effect of the wound rather than to the treatment since it does not increase with time. Treatment with *T. harzianum* induces a systemic reaction in the leaves, which is resolved by the production of PR proteins with peroxidase activity, even though the leaves are not affected by the antagonist or by the pathogen. These PR peroxidases are basic (p.I. 7.2 and 8.7) and are only detected in leaves treated with live *T. harzianum* 96 hours after inoculation. Increased peroxidase activity is also observed in roots and the production of a PR protein is observed both at 24 and 96 hours. This isoenzyme is acidic (p.I. 4.3) and seems to be produced as a result of treatment with both live and autoclaved *T. harzianum*, but does not appear in the control or in the roots treated with water-peptone. This means that the elicitor is a component of the mycelium of the antagonist fungus, which provokes a defensive reaction involving the formation of peroxidases. The production of PR-proteins with peroxidase activity presumably forms part of the hypersensitive defence mechanism of pepper plants and would be responsible for the induction of the resistance developed by the plant after treatment with the antagonist *T. harzianum* and infection by the pathogen.

**Key words:** Biocontrol, *Capsicum annuum*, Peroxidases, *Phytophthora capsici*, PR-proteins, *Trichoderma harzianum*.

## Introducción

Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos del suelo, principalmente de los géneros *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium* entre otros, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas et al. 1982). Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos

que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se les atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular. Los mecanismos por los que las cepas del género *Trichoderma* desplazan al fitopatógeno son fundamentalmente de tres tipos. Competición directa por el espacio o por los nutrientes (Elad & Baker 1985, Elad & Chet 1987, Chet & Ibar 1994, Belanger et al. 1995, Ezziyyani et al. 2004), producción de metabolitos antibióticos, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Lorito et al. 1993, Chet et al. 1997,

Sid Ahmed et al. 2003), y parasitismo directo de determinadas especies de *Trichoderma* sobre los hongos fitopatógenos (Yedidia et al. 1999, Ezziyyani et al. 2003). También se sabe que la inducción localizada de muerte celular, en el lugar de infección de la planta hospedadora, esta acompañada por una activación transcripcional de genes de defensa que codifican la síntesis de metabolitos antimicrobianos y proteínas. Estas reacciones han sido confirmadas al demostrarse que no sólo los patógenos atenuados son capaces de inducir reacciones de resistencia en las plantas, sino también los microorganismos saprofitos agentes de biocontrol entre ellos los pertenecientes al género *Trichoderma*, *Bacillus* y *Pseudomonas* (Smith et al. 1990, Benhamou & Chet 1997, Maurhofer et al. 1994, Ongena et al. 1999, 2000, Van Peer et al. 1991, Ezziyyani et al. 2001).

Uno de los posibles mecanismos reconocidos como responsables de biocontrol de enfermedades de las plantas, mediante microorganismos antagonistas, es la inducción de reacciones sistémicas. La posible interacción de este último mecanismo en la reducción de la enfermedad durante los experimentos de evaluación, nos llevó a estudiar la interacción de la planta de pimiento de la variedad California Wonder con *T. harzianum*, la dinámica del desarrollo de la necrosis en tallos infectados causada por *P. capsici*, y el papel que pueden jugar las peroxidasas en los mecanismos de defensa en el caso de las interacciones planta-patógeno-antagonista. Puesto que las peroxidasas juegan un rol fundamental en los procesos de endurecimiento de la pared celular, mediando en reacciones tales como la lignificación, la suberización o la insolubilización de los monómeros de la extensina, estos procesos se consideran como integrantes de la respuesta defensiva de la planta frente al ataque de patógenos. El objeto de este trabajo es pues analizar la reacción de semillas y raíces de plantas de pimiento cuando se tratan con esporas y micelio del hongo antagonista *T. harzianum*. Evaluamos su efecto sobre la inducción de resistencia sistémica en el tallo, en correlación con la respuesta hipersensible, después de infectar las plantas con el patógeno *P. capsici*, analizando el incremento de proteínas-PR con actividad peroxidasa y su implicación con la resistencia directa o sistémica al patógeno.

## Material y métodos

### Material fúngico

El patógeno usado es *P. capsici* aislado 17 (Candela et al. 1995) que se cultiva y mantiene en medio patata-dextrosa-agar (PDA, Difco) a 25°C. Para las infec-

ciones usamos colonias de 5 días de las que se extraen discos de 5 mm de diámetro cortados al borde de la colonia miceliana en crecimiento. Estos discos se usarán para la inoculación por decapitación de los tallos de plántulas de pimiento con 5-6 hojas verdaderas (Candela, et al. 1995). Como antagonistas usamos el hongo *T. harzianum* aislado 2413 de la Colección española de cultivos tipo (CECT) de Valencia que conservamos en medio PDA y (agua-avena) Avy-3 (Ezziyyani et al. 2004). Para el tratamiento de la semillas y el empapado de las raíces de las plántulas de pimiento, se utilizaron esporas o micelio del hongo *T. harzianum*. La suspensión de esporas se obtuvo raspando la superficie de los cultivos en PDA con una varilla y depositándolas en disolución de sacarosa al 3% hasta obtener  $9 \times 10^7$  esporas/ml. El micelio se obtuvo de los cultivos líquidos en PDB (Ezziyyani, et al. 2004).

### Material vegetal

Las plantas de pimiento objeto de estudio son California Wonder, una variedad muy susceptible al Oomyceto patógeno *P. capsici* que se obtuvieron de semillas desinfectadas con NaClO al 5% durante 10 min seguidas de tres lavados con agua estéril. Las semillas desinfectadas se cultivaron en bandejas rectangulares de 48 orificios que contenían una mezcla de turba (Humus King, Floraska, Alemania) y arena (3:1, v/v; pH= 6,5) que había sido autoclavada a 121°C durante 1 h dos veces en dos días consecutivos. Las bandejas se instalan, en un módulo del invernadero de la Estación de Experimentación Agrícola de la Universidad de Murcia a 18-29°C, 65% de humedad y fotoperíodo de 12 horas. Se riegan con 80 ml de agua por bandeja cada dos días y después de diez días se abonan cada día con agua más 5 ml de una solución fertilizante (COMPO), manteniéndose en estas condiciones hasta que aparecen los primeros cotiledones. Cuando desarrollan la quinta o sexta hoja verdadera, se transplantan a macetas de 45 cm de diámetro con el mismo sustrato donde se someten a los distintos tratamientos con *T. harzianum* y *P. capsici*.

### Tratamientos de las semillas o empapado de las plantas con esporas o micelio de *T. harzianum*

Semillas de pimiento desinfectadas se introdujeron en 10 ml de una suspensión de esporas de *T. harzianum* ajustada a  $5 \times 10^6$  esporas/ml, dosis optimizada en base a datos no publicados. A los 10 minutos se retiraron, absorbiendo el exceso de agua con un papel de filtro estéril y dejándolas secar bajo corriente de

aire en la cámara de flujo laminar. Para hacer el recuento de la población inicial del antagonista adherida a cada semilla, se separaron 5 semillas tratadas con el aislado y se molieron en un mortero estéril añadiendo 9 ml de un disolvente de peptona-agua (P-A) al 0,1% (p/v). A partir de la suspensión obtenida se prepararon diluciones decimales que, sembradas en placas con medio PDA, se incubaron a 25°C en oscuridad. El recuento se hizo bajo el microscopio a las 48h. La densidad de *T. harzianum* fue  $4,5 \times 10^4$  UFC/ml. En otro tratamiento las raíces de las plantas fueron empapadas con suspensiones de esporas (10 ml de  $1,8 \times 10^8$  esporas/ml por planta) o con micelio del antagonista *T. harzianum* vivo o muerto (autoclavado) obtenido del que crecía en placas con medio PDB. El micelio de *T. harzianum* autoclavado se trituró con  $N_2$  líquido y se disolvió para su adición a las plantas en agua de peptona al 0,1% hasta una concentración de 0,11 g/ml. Tanto la suspensión de esporas como el micelio se adicionaron al sustrato alrededor de la base del tallo de cada planta. Para evaluar el efecto de *T. harzianum* sobre la germinación y la estimulación del crecimiento de plántulas de pimiento, las semillas tratadas con esporas de *T. harzianum* se hicieron crecer en vermiculita y se cultivaron como se dice anteriormente. Se evaluó el % de germinación y el crecimiento (como longitud de tallo a los tres meses de edad) frente a plantas controles obtenidos de semillas tratadas con agua destilada-sacarosa al 3%.

#### Colonización de la raíz y rizosfera de las plantas de pimiento por esporas de *T. harzianum*

A plantas de 45 días, crecidas en macetas con el sustrato de la mezcla de turba y arena, se adicionaron las esporas del hongo antagonista *T. harzianum*. La adición se realizó empapando el cuello de las plantas con 10 ml de una suspensión de  $9 \times 10^7$  esporas/ml por plántula. Se dejaron actuar durante 5 semanas, midiendo capacidad de colonización y presencia del hongo cada semana. Para ello se extrajeron las plantas y se recogió la raíz y el sustrato a su alrededor (rizosfera), dividiéndolos en dos partes iguales desde la coronilla. De cada zona se obtuvieron muestras de 1 gramo tanto de las raíces como del sustrato envolvente, que se trituraron en mortero estéril con 9 ml de agua-peptona al 0,1%. De la suspensión obtenida se prepararon diluciones decimales hasta  $10^{-5}$  que se sembraron en medio PDA, enriquecido con cloruro de tetraciclina Sigma, C-4881 y penicilina G, Sigma, P-8306 a razón de 50 mg/ litro y se incubaron a 25°C. La densidad de la población se determinó como propágalos por centímetro (ppcm) de las raíces y como propágalos-por-gramo (ppg) de sustrato, y se

visualizó al microscopio a las 24 horas de la siembra. Los experimentos se repitieron tres veces.

#### Evaluación del efecto del tratamiento en raíces de las plantas de pimiento con *T. harzianum*, inoculadas con *P. capsici*

Plantas de tres meses crecidas en el sustrato de turba-arena se trataron con: i) 10 ml de disolución de esporas de *T. harzianum* de agua-peptona al 0,1% a razón de  $1,5 \times 10^8$  esporas/ml y/o con ii) micelio inerte de *T. harzianum*. Para ello se recogió micelio crecido en PDB se autoclavó y se trituró con nitrógeno líquido preparándose un extracto miceliar de 0,11g/ml con agua de peptona al 0,1%, con el que se empaparon las plantas. A la semana siguiente de los tratamientos con *T. harzianum*, los tallos de las plantas fueron (iii) inoculadas por decapitación con discos de 5 mm de diámetro de *P. capsici* (Pochard y Chambonnet, 1971). A los 3, 6 y 9 días de la inoculación se evaluó la reacción defensiva midiendo la longitud de la reacción necrótica a lo largo del tallo. Se realizaron controles inoculando tallos con agar sin *P. capsici* y se inocularon plantas con el patógeno que no habían sido tratadas con el antagonista. Se usaron 5 plantas para cada tiempo y control y los datos son el valor medio de la longitud de la necrosis en cms.

En raíces y hojas de las plantas tratadas con esporas (i) con micelio autoclavado (ii) del antagonista *T. harzianum* y con (iii) el inóculo de *P. capsici*, se realizó la medida de la inducción de resistencia sistémica por producción de proteínas-PR, a las 24 y 96 horas después de la inoculación con el patógeno. Las hojas y raíces se lavaron con agua destilada para retirar restos de sustrato y una vez reunidas las muestras de tres plantas por tiempo de tratamiento, se pesaron y procesaron en la cámara fría, triturándolas en un mortero con  $N_2$  líquido. El polvo fino resultante se utilizó para la extracción de proteínas de la fracción soluble protoplástica según Egea et al. (1996) pero adicionando mercapto-etanol al 2%. En los extractos se realizó, la medida de la concentración de proteínas totales según Lowry y la concentración de proteínas con actividad peroxidasa utilizando el método colorimétrico basado en la medida de los incrementos de absorbancia a 593 nm, con 4-metoxi-?-naftol (4-MN) como sustrato (Alcazar et al. 1995). Las proteínas se separaron mediante isoelectroenfoque (IEF) y electroforesis (native-PAGE) en el PHAST-SYSTEM de Pharmacia (Amersham). Las cromatografías del IEF (realizado en gradiente 3-9) como las de native-PAGE (realizada en gradiente 8-25%, para proteínas ácidas) se revelaron para actividad peroxidasa mediante incubación de los geles en

disolución 1mM de 4-MN. A temperatura ambiente aparecen a los 10-15 minutos las bandas de peroxidasa teñidas en azul. Los controles se realizaron con plantas no tratadas con *T. harzianum*. La cuantificación de los enzimas se realizó directamente de los geles teñidos en el densitómetro PHAST IMAGE de Pharmacia (Amersham) utilizando la medida de transmitancia 613 nm para peroxidasa (Egea et al. 1996) y los resultados se obtienen como % comparando las bandas entre sí.

## Resultados y discusión

### Efecto de *T. harzianum* sobre la germinación y la estimulación del crecimiento de semillas de pimiento

En las plántulas crecidas en vermiculita a partir de semillas tratadas, el porcentaje de germinación fue superior al de las no tratadas. De hecho a los 12 días habían germinado un 62% frente a un 56% en las semillas control y a los 18 días germinaron un 95% frente al 72% control, que no fueron tratadas con el antagonista. Este incremento parece deberse según Bellone et al. (1999) a que el tratamiento con *T. harzianum* facilita una mayor absorción de nutrientes. Además el peso seco de las plántulas crecidas a partir de semillas tratadas se incrementó significativamente (5,8 mg/peso seco frente a 4,9 mg/peso seco de las semillas control) y también morfológicamente presentaron un color más verde en comparación con el de las semillas no tratadas. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Leeman et al. (1995) y Kim et al. (1997) quienes obtuvieron una cosecha superior al tratar las semillas de rábano con *Pseudomonas fluorescens* WCS374 y semillas de trigo tratadas con microorganismos antagónicos, respectivamente.

El aumento de peso y el cambio fisio-morfológico de las plántulas parece que se relaciona con el tipo de comunidad microbiana asociada a la rizósfera, la especie de la plántula, el tipo de sustrato y las prácticas culturales (Yang & Crowley 2000). A pesar de que los inoculantes ya se usaban a principios de los años 1900, falta mucho por conocer sobre como actúan las diferentes especies en el biocontrol y la absorción y/o producción de nutrientes (Ongena et al. 2000). Los fenómenos en la rizósfera son complejos y esta diferencia entre los tratamientos es difícil de explicar. Sin embargo, es probable que las exudados de las raíces varíen según el sustrato donde crecen las plantas y esa variación tenga un efecto sobre la fisiología de las PGPR (Plant Growth Promotion Rhizobacteria) y como consecuencia una eventual

producción por estas bacterias, de moléculas con el rol de fitohormonas (Marc Ongena comunicación personal), o por su capacidad de solubilizar algunos minerales para la planta.

No sólo los microorganismos ejercen su efecto sobre la planta, sino que ésta también actúa, a través de sus exudados, determinando la composición de la comunidad rizosférica, incluso en las diferentes zonas de las raíces varían las estructuras y las especies de la comunidad rizosférica. Por ejemplo, en las raíces nuevas se ubican preferentemente microorganismos que utilizan azúcares fácilmente degradables y ácidos orgánicos. En cambio, en las raíces antiguas, predominan bacterias y hongos adaptados a condiciones oligotróficas y capaces de degradar compuestos más recalcitrantes como lignina y hemicelulosa (Yang & Crowley 2000).

### Colonización de la raíz y rizosfera de las plantas de pimiento por esporas de *T. harzianum*

El análisis de las raíces de las plantas de pimiento, ha puesto de manifiesto que *T. harzianum* coloniza la raíz y se distribuye a lo largo de ella, pero su densidad no aumenta significativamente con el tiempo. La densidad más alta de la población de *T. harzianum* se encontró en el cuello de la planta (la coronilla) y en la parte superior de la rizosfera (Tabla 1). Estos datos demuestran que el hongo antagonista se establece en el suelo y penetra en la raíz de las plantas y que, aunque después de un aumento inicial del inóculo, sigue una estabilización de la densidad, la colonización de las raíces puede ser suficiente para disminuir la fijación del micelio del patógeno.

La colonización de la raíz y la rizosfera es un prerrequisito para el funcionamiento de los mecanismos de biocontrol exhibidos por los microorganismos antagonistas. Una colonización efectiva está ligada directamente a una competición efectiva con otros microorganismos por la colonización de nichos, y por los nutrientes disponibles procedentes de los exudados radiculares. Para exhibir efectos supresores sobre una enfermedad en una planta, un agente de biocontrol necesita distribuirse por toda la raíz, multiplicarse y sobrevivir durante varias semanas en competición con otros microorganismos procedentes de la microbiota indígena. Se aceptan dos etapas de la colonización de la zona radicular: una mediada por mecanismos inespecíficos como fuerzas electrostáticas, y otra mediante mecanismos específicos en los que participan glucoproteínas de la superficie de la raíz. En este caso, *T. harzianum* coloniza masivamente la raíz y también la rizosfera con lo que apoya la tesis de que la competencia por el espacio se salda a

Tabla 1. Dinámica de *T. harzianum* en la raíz y la rizosfera de plantas de pimiento, medido como propágulos por centímetro (ppcm) y como propágulos por gramo (ppg) respectivamente.

ZONA	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana
<b>Raíz</b> cerca del cotiledón	2,4x10 <sup>2</sup> ppcm	2,1x10 <sup>2</sup> ppcm	2,0x10 <sup>2</sup> ppcm	2,0x10 <sup>2</sup> ppcm	1,7x10 <sup>2</sup> ppcm
<b>Raíz</b> en la punta de la raíz	0.30x10 <sup>2</sup> ppcm	0.25 x10 <sup>2</sup> ppcm	0.23x10 <sup>2</sup> ppcm	0.20x10 <sup>2</sup> ppcm	0.13x10 <sup>2</sup> ppcm
<b>Rizosfera</b> parte superior	10 <sup>5</sup> ppg	2x10 <sup>7</sup> ppg	2x10 <sup>7</sup> ppg	1.35x10 <sup>5</sup> ppg	10 <sup>4</sup> ppg
<b>Rizosfera</b> parte inferior	10 <sup>4</sup> ppg	10 <sup>5</sup> ppg	1.2x10 <sup>5</sup> ppg	1.5x10 <sup>3</sup> ppg	10 <sup>2</sup> ppg

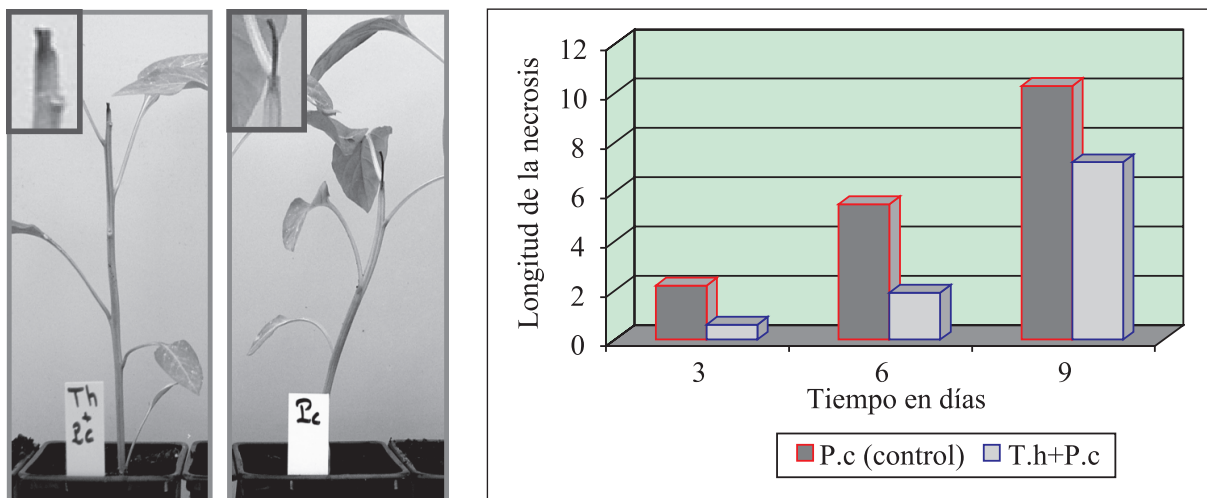


Figura 1. Desarrollo de la necrosis en tallos de plantas de pimiento a los tres y nueve días después del tratamiento con *T. harzianum* (T.h), y de la inoculación con *P. capsici* (P.c.). En el diagrama se representa la longitud de la necrosis frente al tiempo en tratamientos con P.c. sólo o con P.c.+el antagonista T.h.

su favor y puede contribuir a retardar o inhibir la infección y la penetración de las hifas de *P. capsici*. Este mecanismo junto con otros como producción de fitoalexinas (Sid Ahmed et al. 2000) crea un ambiente inhóspito para la multiplicación en la rizosfera y la colonización de la raíz de la planta por parte del patógeno; resultados que están de acuerdo con los publicados por otros autores (Elad et al. 1982, De La Fuente et al. 2000, Ongena et al. 2000, El-Tarabily et al. 2000) quienes han trabajado sobre la evolución de la capacidad colonizadora de varias cepas de *Trichoderma* tanto en suelos como en raíces.

#### Evaluación del efecto del tratamiento con *T. harzianum* en plantas de pimiento inoculadas con *P. capsici*

La progresión de la necrosis de los tallos infectados con *P. capsici*, y tratados con el antagonista *T. harzi-*

*anum*, se refleja en la Fig. 1, donde se observa que después de la inoculación con el patógeno, la respuesta de la plántula reduce el avance del patógeno. La respuesta defensiva es una reacción de hipersensibilidad con resultado de necrosis que es inversamente proporcional a la resistencia que opone la planta. Las plantas que han sido tratadas con el antagonista *T. harzianum* producen una necrosis de menor longitud que en los controles de las plantas inoculadas sólo con el patógeno. La reacción defensiva se desarrolla en las células vivas del tallo localizadas en el frente del avance patogénico. Su efectividad se debe a la síntesis, y o al incremento, de sustancias defensivas, entre ellas proteínas-PR con distinta actividad enzimática, así como a la velocidad de su formación (Candela et al. 1995).

La reacción directa de la planta al tratamiento con el antagonista se mide en las raíces y la reacción sistémica se mide en las hojas no tratadas ni con el an-

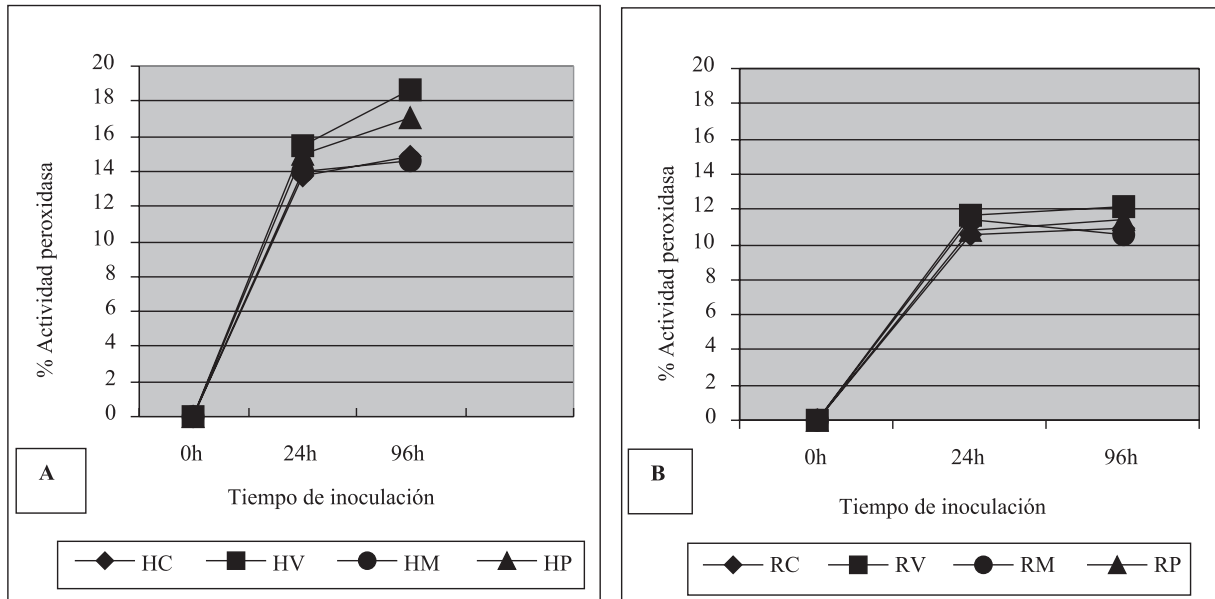


Figura 2. Incremento de la actividad peroxidasa de proteínas de la fracción soluble de hojas [A] y raíces [B] de pimiento tras la inoculación con *P. capsici* más los tratamientos con el antagonista *T. harzianum* durante 24 y 96 horas. Tipos de tratamiento: (V) con esporas de *T. harzianum* vivo, (M) con micelio de *T. harzianum* autoclavado (muerto), (P) con agua de peptona, (C) y con agua sólo (control). La actividad peroxidasa se expresa en % de incremento.

tagonista ni con el patógeno que se inocula en el tallo. En las hojas y raíces se cuantifica la actividad peroxidasa total en las proteínas de la fracción soluble a las 24 y 96 horas, después de los tratamientos. Los resultados se muestran en la Fig. 2 en los que comprobamos que se produce un incremento de actividad peroxidasa en todos los casos estudiados y que la actividad aumenta con el tiempo de inoculación. La mayor actividad se da a las 96 h en plantas tratadas con *T. harzianum* y con peptona, con un incremento de casi un tercio más que en las hojas control. En las raíces también se obtiene un aumento de actividad peroxidasa total con el tiempo de inoculación, pero no existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos y el control. En cualquier caso hay una modulación de la actividad peroxidasa durante la reacción defensiva del pimiento frente a *P. capsici* al ser tratada con *T. harzianum*, que se concreta en una reacción sistémica en las hojas, medida como proteínas-PR con actividad peroxidasa, pero no produce un incremento específico en las raíces, a pesar de que han sido directamente afectadas por el micelio de *T. harzianum*.

La separación de las proteínas por isoelectroenfoque (IEF) de isoperoxidasas de la fracción soluble de tallos y raíces de pimiento tratados, se observa en el Figura 3. En tallos se detectan seis bandas: una básica de pI 9,0, y cinco bandas ácidas de pI 3,6, 3,8, 4,3, 5,2 y 6,3 comunes en los distintos tratamientos pero que se diferencian en su concentración. También

se detecta una isoperoxidasa ácida adicional, de pI 4,1 y dos básicas de pI 7,2 y 8,7, únicamente en hojas procedentes de plantas tratadas con *T. harzianum* a las 24 y 96 horas respectivamente. La posterior separación electroforética en condiciones no disociantes mediante electroforesis en gel de poliacrilamida nativa (Native-PAGE) para proteínas ácidas reveló la presencia de cinco isoenzimas comunes en distintos tratamientos (Rf 0,46, 0,52, 0,83, 0,89, 0,91) a las 24 horas, y una adicional de Rf 0,44, exclusiva en hojas procedentes de plantas tratadas con *T. harzianum*. La Native-PAGE para proteínas básicas reveló la presencia de cuatro isoenzimas comunes en distintos tratamientos (Rf 0,23, 0,25, 0,30 y 0,32) y uno adicional exclusivo en hojas procedentes de plantas tratadas con *T. harzianum* (Rf 0,3).

En las raíces, la separación por isoelectroenfoque (IEF), de las isoperoxidasas revela la presencia de dos bandas: una básica, de pI 9,0, una ácida, de pI 3,6, comunes en las distintas tratamientos pero que se diferencian en su concentración y una ácida de pI 4,3 solamente en raíces tratadas con *T. harzianum* y agua-peptona. También se detecta una isoperoxidasa básica adicional de pI 7,2, únicamente en raíces tratadas con *T. harzianum* a las 96 horas. En Native-PAGE para proteínas ácidas se separan cuatro isoenzimas comunes en distintos tratamientos (Rf 0,66, 0,83, 0,89 y 0,90) y tres peroxidadas adicionales, exclusivamente en las raíces tratadas con *T. harzianum* (Rf 0,16, 0,94 y 0,96). La separación para proteínas básicas reveló

Tabla 2. Actividad peroxidasa de proteínas de la fracción soluble de hojas y raíces de pimiento, a las 24 y 96 horas de los distintos tratamientos con *Trichoderma harzianum* (*T.h.*). La cuantificación se realizó por densitometría con el PHAST-IMAGE (Pharmacia), de la separación cromatográfica mediante isoelectroenfoque (IEF). p.I.= punto isoeléctrico de las isoenzimas.

-**Hojas** procedentes de: plantas tratadas con *T.h.* viva (HV), con *T.h.* autoclavada (muerta) (HM), con agua-peptona (HP), y hojas de plantas sin tratamiento, Control (HC).

-**Raíces** procedentes de plantas tratadas con: *T.h.* viva (RV), con *T.h.* autoclavada (muerta) (RM), con agua peptona (RP), y raíces de plantas sin tratamiento, Control (RC).

Hoja y tratamiento	p.I. 9.0	p.I. 8.7	p.I. 7.2	p.I. 6.3	p.I. 5.2	p.I. 4.3	p.I. 4.1	p.I. 3.8	p.I. 3.6
HV -24h	18,7			111,8	113,3	98,7	67,9	38,8	55,4
HP- 24h	39,4			125,2	112,2	83,6		72,3	62,4
HM-24h	82,2			125,7	122,7	117,9		95,7	86,4
HC - 24h	44,2			127,2	107,1	99,6		81,5	24,1
HV- 96h	70,8	122,4	119,2	127,0	101,2	96,5		81,4	28,2
HP- 96h	78,6			126,2	123,6	99,1		82,9	39,2
HM -96h	56,0			120,3	102,0	102,0		59,2	22,3
RC - 96h	79,3			128,2	102,5	105,5		79,9	48,2

Raíz y tratamiento	p.I. 9.0	p.I. 7.2	p.I. 6.3	p.I. 4.3	p.I. 3.6
RV -24h	17,9		57,3	86,0	7,1
RP- 24h	61,1		86,2	91,3	28,1
RM -24h	79,8		79,7		82,4
RC- 24h	70,1		83,1		83,1
RV -96h	85,6	60,7	87,1	94,4	49,5
RP -96h	70,8		82,6	83,8	39,9
RM- 96h	70,2				58,8
RC -96h	55,3		94,3		61,2

la presencia de cuatro isoenzimas comunes en distintos tratamientos (Rf 0,61, 0,44, 0,30 y 0,23) y dos nuevas, exclusivamente en las raíces tratadas con *T. harzianum* (Rf 0,06 y 0,61).

Los densitogramas (Fig. 3) muestran que tanto en hojas como en raíces, la actividad peroxidasa va aumentando con el tiempo de inoculación, obteniéndose proteínas-PR, ácidas y básicas que se inducen a las 96 horas, únicamente en hojas procedentes de plantas tratadas con *T. harzianum*. En las raíces, la diferencia más notable es la detección de las isoenzimas ácidas de (Rf 0,16, 0,94 y 0,96) y las básicas de (Rf 0,06 y 0,63) que se inducen a las 96 horas, únicamente en las raíces tratadas con *T. harzianum* y que presentan un aumento progresivo con el tiempo.

Los datos cuantitativos de la actividad de cada una de las isoenzimas de la fracción soluble de hojas y raíces a los distintos tratamientos, separados mediante IEF, se recogen en la tabla 2. Lo más significativo es que para los distintos tratamientos se produce un aumento de la actividad peroxidasa con el tiempo de inoculación, siendo el incremento mayor en las hojas procedentes de plantas tratadas con *T. harzianum* que en las raíces tratadas con el mismo hongo. La isoperoxidasa ácida de pI 3,6, común en los distintos tratamientos, es constitutiva del tejido, ya que se pre-

senta también en los controles, sin embargo el aumento más notable de la actividad se produce en hojas procedentes de plantas tratadas con *T. harzianum*, y en las raíces tratadas con el mismo a las 96 horas (tres veces más elevado que el que presenta el tejido no inoculado en el caso de las hojas y siete veces más que el presentado por las raíces, si descartamos las raíces inoculadas con agua-peptona). En las hojas las isoperoxidasas de pI 7,2 y pI 8,7 son las que presentan mayores actividades y además son proteínas que sólo son inducidas en las hojas tratados con *T. harzianum*.

En las raíces la isoperoxidasa de pI 7,2 es la que presenta mayor actividad y además es la proteína que aparece únicamente en las raíces tratadas con *T. harzianum*. La isoperoxidasa básica de pI 9,0 presenta una gran diferencia de valores en las hojas procedentes de plantas tratadas con *T. harzianum* y en las raíces tratadas con el mismo hongo a las 96 horas. Por el contrario, la actividad en hojas y raíces tratadas con *T. harzianum* autoclavada a las tres horas es bastante baja, aunque posteriormente aumenta ligeramente a las 96 horas.

En general, la actividad peroxidasa de las proteínas ácidas es mayor que la de las básicas, y la inducción de nuevas peroxidases, tanto ácidas como bási-



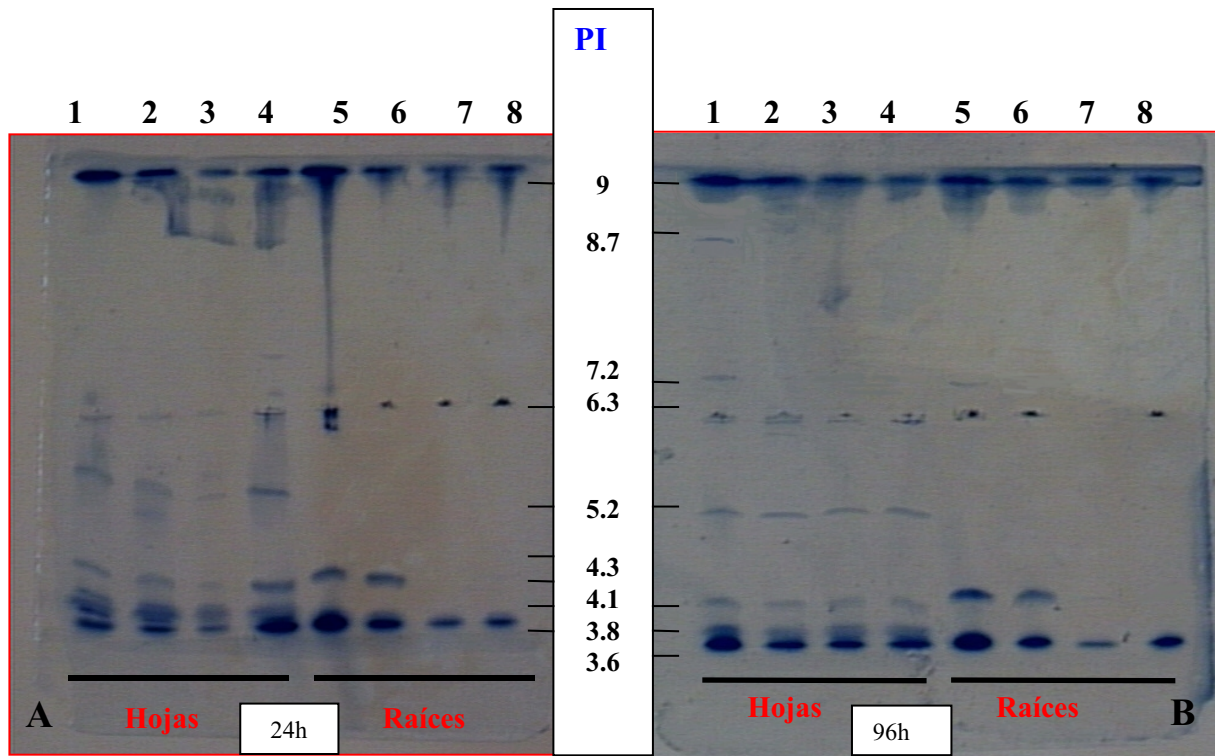


Figura 3. Geles de IEF teñidos con 4-MN, para la detección de las peroxidases de la fracción soluble de hojas y raíces de pimiento, a diferentes tiempos de inoculación con *T. harzianum*. [A] a los 24 horas y [B] a las 96 horas. **Hojas** procedentes de plantas tratadas: 1) con *T.h.* viva, 2) con *T.h.* autoclavada (muerta), 3) con agua-peptona y 4) **hojas** de plantas no tratadas (control). **Raíces** tratadas: 5) con *T.h.*, 6) con *T.h.* autoclavada (muerta), 7) con agua peptona y 8) **raíces** control.

cas, sugiere el reforzamiento de la pared celular mediante la producción de ligninas catalizadas por enzimas peroxidases. El incremento de actividad afecta tanto a las enzimas constitutivas, como a las que se sintetizan “de novo”, pero el incremento de actividad peroxidasa que se detecta en las plantas control es debido al efecto de la herida y no al tratamiento, pues no progresa a lo largo del tiempo. La producción de proteínas-PR con actividad peroxidasa debe formar parte del mecanismo de defensa hipersensible de la planta de pimiento, y es la responsable de la inducción de resistencia desarrollada por la planta después del tratamiento con el hongo antagonista y la infección por el patógeno.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto SENECA de Ref. 00057/PCMC/02. M. Ezziyani disfrutó de una beca MAE durante su realización.

### Referencias

- Alcázar MD, Egea C, Espín A & Candela ME. 1995. Peroxidases isoenzymes in the defense response of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 94: 736- 742.
- Belanger R, Dufour N, Caron J & Benhamou N. 1995. Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: Indirect evidence for sequential role of antibiotics and parasitism. *Biocontrol Science Technology* 5: 41-54.
- Bellone CH, Carrizo de Bellone S & Guerrero O. 1999. Inoculaciones con *Azospirillum brasiliense* incrementan el peso seco y la micorrización en frutilla. II Reunión Científico Técnica- Biología del Suelo- Fijación de Nitrógeno. 225-257.
- Benhamou N, & Chet I. 1997. Cellular and Molecular Mechanisms Involved in the Interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2095-2099.

- Candela ME, Alcázar MD, Espín A, Egea-Gilabert C & Almela L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44: 116-123.
- Chet I & Ibar J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 48: 37-43.
- Chet I, Ibar J & Hadar I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships* (Wicklow DT & Soderstrom B, eds.). New York: Springer Verlag, pp. 165-192.
- De la Fuente L, Bajsa N, Bagnasco P, Quagliotto L, Thomashow L, & Arias A. 2000. Antibiotic production by *Pseudomonas fluorescens* isolated from forage legume rhizosphere. *Journal of Applied Microbiology* 90: 421-429.
- Elad Y & Baker R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamidospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 75: 1053-1058.
- Elad Y & Chet I. 1987. Possible role of competition for nutrients in biocontrol of *Pythium* damping-off by bacteria. *Phytopathology* 77: 190-195.
- Elad Y, Chet I & Henis Y. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 719-725.
- El-Tarabily K A, Soliman M H, Nassar A H, Al-Hassani H A, Sivasithmparam K, Mckenna F & Hardy G E St. J. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology* 49: 573-583.
- Egea C, Alcázar MD & Candela ME. 1996.  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase as pathogenesis-related proteins in the defense reaction of two *Capsicum annuum* cultivars, infected with *Cucumber Mosaic Virus*. *Biologia Plantarum* 38: 437-443.
- Ezziyyani M, Sid Ahmed A, Pérez-Sánchez C, Egea C, & Candela ME. 2001. Interacción de la planta de pimiento (*Capsicum annuum* L.) con *Streptomyces rochei* Ziyani y su efecto sobre la necrosis en el tallo causado por *Phytophthora capsici*. *Actas de la XIV Reunión de la Soc. Española de Fisiología Vegetal & VII Congreso Hispano- Luso de Fisiología Vegetal*. Badajoz, España.
- Ezziyyani M, Requena ME, Pérez Sánchez C, Egea Gilabert C & Candela ME. 2003. Mecanismos de biocontrol de la "tristeza" del pimiento (*Capsicum annuum* L.) por microorganismos antagonistas. *Actas de la XV Reunión de la Sociedad Española & VIII Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal*. Palma de Mallorca, España.
- Ezziyyani M, Pérez Sánchez C, Sid Ahmed A, Requena ME & Candela ME. 2004. *Trichoderma harzianum* as biofungicida in the control of *Phytophthora capsici* in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. *Anales de Biología*. 26: 35-45.
- Kim DS, Cook R J & Weller DM. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for Biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87: 551-558.
- Leeman M, Van Pelt JA, Den Ouden FM, Heinsbroek M & Bakker AHM. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to *Fusarium* wilt, using a novel bioassay. *European Journal of Plant Pathology* 101: 655-664.
- Lorito M, Harman GE, Hayes CK, Broadway RM, Transmo A, Woo SL & Di Pietro A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
- Maurhofer M, Keel C, Haas D, & Defago G. 1994. Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress but not of cucumber. *European Journal of Plant Pathology* 100:221-232.
- Ongena M, Daayf F, Jaques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz TC, Cornélis P, Koedam N, & Bélanger R. 1999. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent *Pseudomonads*: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiotics. *Plant Pathology* 48:66-76.
- Ongena M, Daayf F, Jaques P, Thonart P, Benhamou N, Paulitz TC & Bélanger RR. 2000. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with Fluorescent pseudomonads. *Plant Pathology* 49: 523-530.
- Papavizas GC, Lewis JA & Abd-Elmoity TH. 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to Benomyl and enhanced biocontrol capabilities. *Phytopathology* 72: 126-132.
- Pochard E & Chambonnet D. 1971. Methodes de selection du piment pour la resistance au *Phytophthora capsici* et au virus du concombre. *Annales Faculte Sciences Agraria Universitat Torino*, 7: 270-281.
- Sid Ahmed A, Pérez Sánchez C & Candela ME. 2000. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants (*Capsicum annuum*) to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation. *European Journal of Plant Pathology* 106: 817-824.
- Sid Ahmed A, Ezziyyani M, Pérez Sánchez C & Candela ME. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology* 109: 418-426.
- Smith VL, Wilcox WF & Harman GE. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots

- of apple by *Trichoderma* and *Gliocadium* spp. *Phytopathology* 80: 880-885.
- Van Peer R, Niemann GJY, Schippers B. 1991. Induced resistance and Phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Stain WCS417r. *Phytopathology* 81:129-139.
- Yang CH & Crowley DE. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 345-351.
- Yedidia I, Benhamou N & Chet I. 1999. Induction of defence responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1061-1070.

