

Alteraciones de la actividad peroxidasa y del crecimiento del pimiento (*Capsicum annuum* L.) inducidas por la infección del virus del grabado del tabaco (Tobacco etch virus)

T. FERNÁNDEZ Y R. GÁBORJÁNYI*

*Laboratorio de Virología Vegetal, Dpto. de Botánica,
Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
La Habana, Cuba*

Recibido: 8 de diciembre de 1975

ABSTRACT. Three varieties of pepper (*Capsicum annuum* L.), California Wonder, True Hearth and Keystone Resistant, were inoculated by seven isolates of Tobacco etch virus, in greenhouse conditions. Four weeks after the infection, the symptom development and the growth were compared. All used varieties were susceptible to infection. The severity of symptoms and the stunting induced by pathogen were dependent on the virus isolates. At the same time, the cytoplasm soluble and the cell wall-bound fractions of peroxidase were purified separately and the enzyme activities were measured. Depending on the severity of the isolates a correlation was established between the growth inhibition and the enzyme activity. No new isoperoxidases were formed during the infection. The possible role of peroxidases in the development of virus infected plants is been discussed.

RESUMEN. Tres variedades de pimiento (*Capsicum annuum* L.), California Wonder, True Hearth y Keystone Resistant, fueron inoculadas con siete aislamientos del virus del grabado del tabaco (Tobacco etch virus), en condiciones normales de casa de cristal. Cuatro semanas después de la inoculación, el desarrollo de los síntomas y el crecimiento de las plantas infectadas fueron comparadas con el control. Todas las variedades presentaron susceptibilidad a la infección. La intensidad de los síntomas y el enanismo, dependieron de la severidad de los aislamientos. Al mismo tiempo, las fracciones enzimáticas, soluble en agua y la ligada a la pared celular, soluble en cloruro de sodio, fueron purificadas separadamente y sus actividades fueron medidas. Se estableció una correlación entre el incremento de la actividad de la enzima peroxidasa y la inhibición del crecimiento que dependió de

* Dirección permanente: Plant Protection Research Institute, Budapest, Hungary.

la severidad de los aislamientos utilizados. El papel desempeñado por esta enzima en el desarrollo de las plantas infectadas por virus, está en discusión.

INTRODUCCION

En los últimos tiempos se han acumulado muchos datos sobre la actividad peroxidasa en las plantas infectadas por un patógeno. En forma general es aceptado que el ataque de hongos, bacterias y virus, incrementan la actividad de esta enzima.

En el caso de enfermedades virales se ha demostrado en plantas que son infectadas localmente, que este incremento de la peroxidasa es muy rápida y está acompañada de la formación de nuevas isoenzimas (*Farkas y Stahmann, 1966 y Solymosy y cols., 1967*).

También se ha reportado que en hospederos sistémicos la actividad de la peroxidasa tiene un incremento, pero al mismo nivel y sin producción de nuevas isoperoxidasas. van Loon y Geelen, (1971) y Wood y Barbara, (1971) dijeron que había una relación entre la multiplicación viral y la alteración de la actividad de dicha enzima.

En experiencias anteriores, nosotros (*Gáborjányi y cols., 1973*) investigamos la enzima peroxidasa como un sistema que controla el desarrollo de las plantas (*Galston y Davies, 1969*) y observamos, que en hospederos sistémicos después de una infección viral, en la fracción ligada a la pared celular hay un incremento superior y permanente, mientras que la fracción citoplasmática de la misma enzima no se altera apreciablemente.

Establecimos una correlación negativa entre este efecto y el desarrollo de las plantas.

Recientemente Gómez y cols., (1975) observamos, que después de un mes de infectadas con el virus X de la papa, las plantas de papa presentaron una diferencia significativa en la actividad de dicha enzima comparadas con las plantas sanas, mientras que las plantas sufren una disminución en su tamaño.

El objetivo del presente trabajo es la observación de la correlación de la actividad de la enzima peroxidasa y del desarrollo de las plantas en el caso de aislamientos que presentaron diferencias en su severidad y variedades que son conocidas en su susceptibilidad, resultados que hemos obtenido en el presente año (*Cordero y cols., 1975*).

MATERIALES Y METODOS

Tres variedades de pimiento (*Capsicum annuum* L.) California Wonder, True Hearth y Keystone Resistant, fueron inoculadas con los aislamientos colectados del campo del virus de grabado del tabaco (TEV) TP, To 41, To 42, Pim 12, Pim 13, Verdolaga y Datura (Fernández, 1975).

Como fuente de inóculo se usó tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Samsum) infectado tres semanas antes de utilizarlo. Las plantas inoculadas fueron colocadas en condiciones normales de casa de cristal, en los meses de octubre a diciembre.

La extracción y separación de la enzima se hizo mediante maceración de 10 g de material fresco en morteros de porcelana fríos con doble cantidad de agua destilada fría, centrifugándose durante 20 minutos a 10 000 g.

El sobrenadante fue recuperado, filtrándose a través de lana de vidrio y el precipitado fue nuevamente macerado con igual cantidad de agua. Este proceso se repitió cuatro veces, colectándose de esta forma la fracción soluble. El precipitado final fue macerado en solución de NaCl 0,01 M, centrifugado y filtrado de la misma manera por dos veces, obteniéndose así el sobrenadante que constituye la fracción ligada a la pared celular (Sági, 1971). Todo este proceso se realizó a temperatura de +4°C.

La actividad peroxidasa fue medida según el método de Fehrmann y Diamond, (1967), en un espectrofotómetro a 430 nm, en un tiempo de 0 a 1 minuto en intervalos de 15 segundos y caracterizamos la actividad como OD. La separación de las isoenzimas fue realizada en gel poliacrilamida al 8,5%, el tiempo de corrida de 3 horas y amperage de 2 mA/tubo en los primeros 30 minutos y después 5 mA/tubo. Las bandas de las isoperoxidasas se evidenciaron en solución sobresaturada de benzidina que contenía peróxido de hidrógeno y fijada con ácido acético al 7%.

La altura de las plantas fueron medidas en el momento y al mes de la inoculación.

RESULTADOS

Inhibición del crecimiento. Los 7 aislamientos del virus del grabado del tabaco utilizados mostraron diferencias en su severidad de acuerdo con los síntomas presentados en las plantas inoculadas (Cordero y cols., 1975). En las tres variedades comerciales utilizadas se observó esta dife-

rencia manifestada en la altura de las plantas, la cual fue altamente significativa (Tabla I).

TABLA I

Comparación de la altura en tres variedades de pimiento inoculadas con siete aislamientos del virus del grabado del tabaco (TEV)

Tratamientos (Aislamientos)	Keystone Resistant	Variedades	
		True Hearth	California Wonder
Control	11.92 ^{bc}	14.72 ^{ab}	15.88 ^{ab}
TP	10.45 ^c	12.08 ^{bc}	15.77 ^{ab}
To 41	14.52 ^{ab}	14.12 ^{ab}	14.46 ^{abc}
To 42	10.74 ^c	12.89 ^{ab}	12.75 ^c
Pim 12	15.23 ^a	9.85 ^c	12.82 ^{bc}
Pim 13	11.54 ^c	16.82 ^a	14.43 ^{abc}
Verd	11.17 ^c	13.92 ^{ab}	15.77 ^{ab}
Dat	12.85 ^{abc}	15.11 ^{ab}	17.35 ^a
	$ES_{\bar{x}} = 1.02^{**}$	$ES_{\bar{x}} = 1.11^{**}$	$ES_{\bar{x}} = 0.84^{**}$

Los números muestran la media del incremento en la altura de 12 plantas (cm).

** $p < 0.01$

a, b, c y d Medias de tratamientos con iguales letras no difieren significativamente.

Actividad enzimática. Como sabemos desde el punto de vista del crecimiento, las peroxidasas de la fracción citoplasmática no tienen un papel importante en el crecimiento de las plantas. Esto fue observado en nuestra experiencia, donde no pudimos demostrar ninguna correlación entre la detención del crecimiento y la actividad de dicha fracción.

En la fracción ligada a la pared celular se estableció también diferencia significativa entre los tratamientos (aislamientos del virus) y el control (Tabla II).

TABLA II

Actividad peroxidasa en la fracción ligada a la pared celular y las diferencias significativas entre los tratamientos

Tratamientos (Aislamientos)	Keystone Resistant	Variedades	
		True Hearth	California Wonder
Control	3.80 a	5.10 d	32.0 ab
TP	9.70 c	10.00 b	23.0 abc
To 41	7.63 b	10.00 b	34.0 a
To 42	10.05 c	13.50 a	33.0 a
Pim 12	7.40 b	13.50 a	27.0 abc
Pim 13	9.30 c	6.00 cd	7.5 c
Verd	7.60 b	8.50 bc	29.0 ab
Dat	7.30 b	7.50 bed	24.0 abc
	$ES_{\bar{x}} = 3.74^{**}$	$ES_{\bar{x}} = 0.87^{**}$	$ES_{\bar{x}} = 0.03^*$

Alteraciones de la densidad óptica en 15 segundos a 430 nm, media de tres mediciones.

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

a, b, c y d Medias de tratamientos con iguales letras no difieren significativamente.

Isoenzimas. En la separación de las isoenzimas en los geles de poliacrilamida no se observaron bandas nuevas que correspondieran a isoenzimas. Solamente fue posible observar diferencia en la intensidad de la coloración de las bandas del espectro de isoenzimas comparadas con el control (Fig. 1) en el caso de aislamientos severos, por ej. To 42.

DISCUSION

Entre estos dos fenómenos, la altura de las plantas y la actividad de la peroxidasa en la fracción ligada a la pared celular, existe una correlación lineal inversa. Esto significa que si hay un aislamiento o strain

del virus que ataque a las plantas fuertemente y que produzca enanismo, se incrementará la actividad de la peroxidasa. Por otro lado, si hay un aislamiento ligero que no afecte mucho el desarrollo de las plantas, la peroxidasa en dicha fracción no se altera apreciablemente. El valor de la correlación negativa depende de la severidad de los aislamientos y también de la variedad utilizada, ya que en nuestro caso las variedades de True Hearth, California Wonder y Keystone Resistant presentaron nivel de significación del 1%, 5% y mayor que el 5% respectivamente. Observando los datos individualmente podemos ver que los aislamientos menos severos no mostraron diferencia con el control, por ejemplo, Pim 13, Verdolaga y Datura, mientras que los más severos como TP, To 42 y Pim 12 sí mostraron un alto nivel de significación.

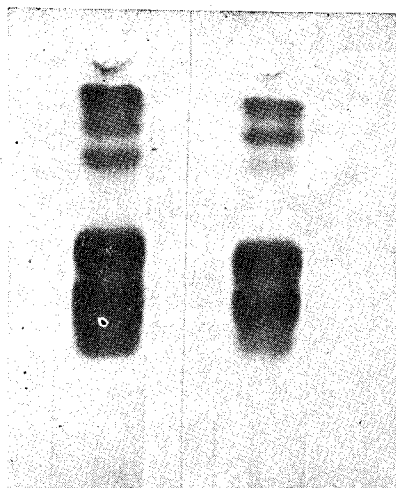


Fig. 1. Espectro de isoenzimas en la variedad de pimiento California Wonder inoculada con el aislamiento To 42 del virus del grabado del tabaco (TEV) comparada con el control sano. Izquierda: planta enferma y derecha: planta sana.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados corroboran lo planteado en la literatura: los aislamientos utilizados muestran correlación inversa con la altura de las

plantas infectadas. Debido a que en la naturaleza, donde la diversidad de los casos es mayor y donde también se presentan relaciones hospedero-parásito menos drásticas, esperamos que los resultados de esta correlación serán menos claros que cuando se utilizan aislamientos más severos y variedades más susceptibles. Por lo que los resultados de esta experiencia nos ayudan a mostrar la tendencia natural hacia la existencia de una correlación en la no aparición de nuevas isoenzimas en plantas infectadas sistémicamente en contraste con las que presentan lesiones locales, acompañada de necrosis del tejido foliar.

RECONOCIMIENTOS

A la Lic. Miriam Alvarez del Dpto. de Biometría del INCA y a las compañeras Reina Rodríguez y Caridad Velázquez del Dpto. de Espectrofotometría del Cenic.

REFERENCIAS

- CORDERO M., FERNÁNDEZ T. Y GÁBORJÁNYI R. Resistencia del pimiento y tomate al virus etch del tabaco. Resumen V Seminario Científico del CNIC, 233, La Habana, 1975.
- FARKAS G. L. AND STAHMANN M. A. On the nature of changes in peroxidase isoenzymes in bean leaves infected with southern bean mosaic virus. *Phytopathology*, 56, 669, 1966.
- FEHRMANN H. AND DIAMOND A. E. Peroxidase activity and *Phytophthora* resistance in different organs of the potato plant. *Phytopathology* 57, 69, 1967.
- FERNÁNDEZ T. Aislamiento del virus etch del tabaco en plantaciones de pimiento y tomate en la provincia de La Habana. Resumen V Seminario del CNIC, 235, La Habana, 1975.
- GALSTON A. W. AND DAVIES P. J. Hormonal relation in higher plants. *Science* 163, 1288, 1969.
- GÁBORJÁNYI R., SÁGI F. AND BALÁZS E. Growth inhibition of virus infected plants: Alterations of peroxidase enzyme in compatible and incompatible host-parasite relations. *Acta Phytopathol. Hung.* 8, 81, 1973.
- GÓMEZ J., FERNÁNDEZ T. Y GÁBORJÁNYI R. Comportamiento de la actividad peroxidasa en plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) después de la infección con el virus X de la papa. I Simposio de Investigaciones Agrícolas, Abstract 17, Santa Clara, 1975.

- SÁGI F. A kötött és aldható indolecetsav oxidáz és peroxidázzal való azonosságának vizsgálata. XIII Biokémiai Vándorgyűlés. Pécs. Abstr. 39, 1971.
- SOLYMOSY F., SZIRMAI J., BECZNER L. AND FARKAS G. L. Changes in peroxidase isoenzyme patterns by virus infection. *Virology*, 18, 117, 1967.
- VAN LOON L. C. AND GEELEN J. L. M. The relation of polyphenoloxidase and peroxidase to symptom expression in tobacco var. Samsun NN after infection with tobacco mosaic virus. *Acta Phytopathol. Hung.* 6, 9, 1971.
- WOOD R. K. AND BARBARA D. J. Virus multiplication and peroxidase activity in leaves of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars systemically infected with the two strains of cucumber mosaic virus. *Physiol. Plant Pathol.* 2, 73, 1971.