



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

RESPUESTA HIPERSENSITIVA DEL CHILE CM-334 RESISTENTE A
Phytophthora capsici* E INFECTADO CON *Nacobbus aberrans

EDGAR VILLAR LUNA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2008

La presente tesis, titulada: **RESPUESTA HIPERSENSITIVA DEL CHILE CM-334 RESISTENTE A *Phytophthora capsici* E INFECTADO CON *Nacobbus aberrans***, realizada por el alumno: **Edgar Villar Luna**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: _____
Dra. Emma Zavaleta Mejía

ASESORA: _____
Dra. Olga Gómez Rodríguez

ASESORA: _____
Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez

ASESORA: _____
Dra. Ana María Hernández Anguiano

ASESOR: _____
Dr. Benito Reyes Trejo

Montecillo, Texcoco, México, 13 de noviembre de 2008

RESPUESTA HIPERSENSITIVA DEL CHILE CM-334 RESISTENTE A *Phytophthora capsici* E INFECTADO CON *Nacobbus aberrans*

Edgar Villar Luna, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2008

Los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Conocer si plantas de Chile, resistentes a *Phytophthora capsici*, del genotipo CM-334 inoculadas con *Nacobbus aberrans* responden hipersensitivamente a las inoculaciones foliares con *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* y *P. capsici*; y 2) Comparar el contenido de capsidiol en plantas infectadas y no infectadas con *N. aberrans* e inoculadas con la bacteria o el oomiceto. En un primer experimento, se evaluaron ocho tratamientos: 1) CM-334 con *N. aberrans* (2000 J2/planta) y *P. syringae* (10^8 ufc mL⁻¹) (R+N+Ps), 2) CM-334 sólo con *P. syringae* (R+Ps), 3) CM-334 sólo infiltrado con agua destilada estéril (R s/N s/Ps), 4) CM-334 con *N. aberrans* y *P. capsici* asperjado (10^5 zoosporas mL⁻¹) (R+N+Oa), 5) CM-334 sólo con *P. capsici* asperjado (R+Oa), 6) CM334 sin nematodo ni oomiceto (R s/N s/O), 7) Susceptible sólo con *P. capsici* asperjado (S+Oa), y 8) Susceptible sólo con *P. syringae* (S+Ps). En seis plantas de los tratamientos R+N+Ps, R+Ps, R s/N s/Ps, y S+Ps se realizaron observaciones durante 7 días. Para determinar el contenido de capsidiol, de cada tratamiento con CM-334 inoculado con el oomiceto o la bacteria se tomó el follaje de 10 plantas a los 3 y 6 días post-inoculación con el patógeno. En otro ensayo se evaluaron los tratamientos: 1) CM-334 con *N. aberrans* y *P. capsici* infiltrado (R+N+Oi), 2) CM-334 sólo con *P. capsici* infiltrado (R+Oi), 3) CM-334 sólo infiltrado con agua destilada estéril (R s/N s/O), y 4) Susceptible infiltrado con *P. capsici* y sin nematodo (S+Oi), se realizaron observaciones durante 30 días para registrar la aparición de síntomas de tizón foliar o de la reacción de hipersensibilidad (RH). La infección de CM-334 por *N. aberrans* no inhibió la RH en la parte aérea de la planta, pero sí causó un retraso importante en su expresión, ya que en ausencia del nematodo el inicio de la respuesta se observó a las 5 h y la típica RH se expresó a las 7 h posteriores a la inoculación con la bacteria, mientras que en presencia del nematodo a este último tiempo, apenas se apreció una clorosis incipiente. En el segundo ensayo, a pesar de que el nematodo retrasó la expresión de la defensa en la planta, tal retraso no fue suficiente para permitir el establecimiento exitoso de *P. capsici* en el follaje. A los 3 días post-inoculación con el oomiceto o la bacteria en hojas de CM-334, previamente inoculadas con *N. aberrans*, la acumulación de capsidiol fue reducida (23 y 63 %, respectivamente) en comparación con aquellas sin nematodo.

Palabras clave: Capsidiol, fitoalexinas, interacciones incompatibles, mecanismos de defensa, nematodos agalladores.

HYPERSENSITIVE RESPONSE OF CHILI PEPPER CM-334 RESISTANT TO *Phytophthora capsici* AND INFECTED BY *Nacobbus aberrans*

Edgar Villar Luna, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2008

The objectives of this research were: 1) To know if chilli plants of the CM-334 genotype, resistant to *Phytophthora capsici* and previously inoculated with *Nacobbus aberrans*, respond hypersensitively to foliar inoculations with *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* and *P. capsici*; and 2) To compare the contents of capsidiol in plants infected and noninfected with *N. aberrans* and inoculated with the bacteria or the oomycete. In a first experiment, eight treatments were evaluated: 1) CM-334 with *N. aberrans* (2000 J2/plant) and *P. syringae* (108 cfu mL⁻¹) (R+N+Ps), 2) CM-334 only with *P. syringae* (R + Ps), 3) CM-334 only infiltrated with distilled water (R s/N s/Ps), 4) CM-334 with *N. aberrans* and *P. capsici* sprayed (10⁵ zoospores mL⁻¹) (R+N+Oa), 5) CM-334 only with *P. capsici* sprayed (R+Oa), 6) CM-334 without nematode or oomycete (R s/N s/O), 7) Susceptible only with *P. capsici* sprayed (S+Oa), and 8) Susceptible only with *P. syringae* (S+Ps). Observations during 7 days were carry out in six plants of the treatments R+N+Ps, R+Ps, R s/N s/Ps, and S+Ps. To determine the capsidiol content, from each treatment of CM-334 inoculated with the oomycete or the bacteria, the foliage of 10 plants was taken at 3 and 6 days after pathogen inoculation. In other assay the treatments: 1) CM-334 with *N. aberrans* and *P. capsici* infiltrated (R+N+Oi), 2) CM-334 only with *P. capsici* infiltrated (R+Oi), 3) CM-334 only infiltrated with distilled sterile water (R s/N s/O), and 4) Susceptible infiltrated with *P. capsici* and without nematode (S+Oi), were established. Observations were carried out during 30 days to register the appearance of leaf blight symptoms or the hypersensitive reaction (HR). The infection of CM-334 by *N. aberrans* did not inhibit the HR in the plant foliage, but it caused an important delay in its expression, since in the absence of the nematode the onset of the response was observe at 5 h and the typical HR was expressed at 7 h after the bacterial inoculation, while in the presence of nematode by this time there was an incipient chlorosis. In the second trial, even though the nematode delayed the expression of the plant defense, such a delay was not sufficient to enable the successful establishment of *P. capsici* in the foliage. At 3 days after leaf inoculation with the oomycete or bacteria in plants previously inoculated with *N. aberrans*, the accumulation of capsidiol was reduced (by 23 and 63%, respectively) as compared with those without nematode.

Keywords. Capsidiol, phytoalexins, incompatible interactions, defense mechanisms, root-knot nematodes.

Dedico esta tesis:

A mis padres, José y María, por su ejemplo de lucha, honestidad y perseverancia, por su confianza en la realización de mis sueños y por el apoyo absoluto que siempre me han brindado; a mis hermanos, Griselda y Hernán, ejemplos de generosidad, valentía, tenacidad y superación, y a mi hermano José Iván[†] en cualquier lugar en que se encuentre..... Por ellos y para ellos!!!

*Lo importante es no dejar de cuestionarse,
la curiosidad tiene sus razones de existir.*

(Albert Einstein)

AGRADECIMIENTOS

A los millones de mexicanos que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

A los integrantes de mi Consejo Particular (Doctores: Emma Zavaleta-Mejía, Olga Gómez-Rodríguez, Reyna I. Rojas Martínez, Ana M. Hernández Anguiano, y Benito Reyes-Trejo) por el esfuerzo, dedicación, tiempo y el apoyo brindado, pero sobre todo por la infinita paciencia para conmigo al compartir sus conocimientos. A todos ellos, mi más profundo agradecimiento por haberme impulsado en el mundo de la ciencia, su apoyo permanente y orientaciones dieron forma y estructura a este proyecto.

A todos los individuos, llámense familia, profesor, compañero o amigo, quienes de alguna manera me han apoyado hasta hoy, aun en la distancia.

Hago extensivo mi agradecimiento a toda mi familia por su paciencia y comprensión ante mis ausencias todos estos años de vida.

Por último y no por ser menos importante, doy gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi espíritu e iluminar mi mente, hoy y siempre.

Este trabajo de investigación fue realizado como parte del proyecto “Implicación de los genes *pal* y *hmg* en el fenómeno de Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* por *Nacobbus aberrans* en Chile CM-334”, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 46331-Z).

CONTENIDO

	Página
CAPITULO 1. INTRODUCCION GENERAL	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Marchitez del chile por <i>Phytophthora capsici</i>	5
Resistencia genética a <i>P. capsici</i>	7
Mecanismos de resistencia a <i>P. capsici</i>	8
Rompimiento de resistencia a <i>P. capsici</i> en chile CM-334.....	10
<i>Nacobbus aberrans</i>	12
Inducción de los sitios especializados de alimentación.....	14
Defensa hipersensitiva en chile.....	17
Implicación del capsidiol en la resistencia a <i>P. capsici</i>	18
Literatura citada.....	21
CAPITULO 2. RESPUESTA HIPERSENSITIVA DEL CHILE CM-334 RESISTENTE A <i>Phytophthora capsici</i> E INFECTADO CON <i>Nacobbus aberrans</i>	30
INTRODUCCIÓN.....	30
MATERIALES Y METODOS.....	33
Material vegetal y producción de inóculo.....	33
Plántulas de chile.....	33
Preparación de inóculo e inoculación con <i>N. aberrans</i>	33
Producción de inóculo de <i>P. capsici</i> y <i>P. syringae</i> pv. <i>tagetis</i> , e inoculación.....	33
Experimento 1.....	35
Experimento 2.....	35

Extracción, determinación y cuantificación de capsidiol	36
Obtención del estándar	36
Determinación del contenido de capsidiol en plantas CM-334	37
Detección y cuantificación de capsidiol	37
RESULTADOS	38
Respuesta hipersensitiva de chile CM-334 a <i>P. syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	38
Respuesta hipersensitiva de chile CM-334 a <i>P. capsici</i>	40
Contenido de capsidiol en plantas de CM-334 inoculadas con <i>P. capsici</i> y con <i>P. syringae</i> pv. <i>tagetis</i>	42
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES.....	50
LITERATURA CITADA.....	51
ANEXOS	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ruta biosintética del capsidiol.....	20
Figura 2. Figura 2. Respuesta hipersensitiva en hojas de chile resistente CM-334 (R) inoculadas con <i>P. syringae</i> pv. <i>tagetis</i> (Ps): (a) inoculada sólo con la bacteria (R+Ps) y (b) con ambos patógenos (R+N+Ps) a las 7 h post-inoculación, nótese la deshidratación del tejido en (a) mientras que en (b) sólo se aprecia un área clorótica; (c) infiltrada sólo con agua destilada estéril (R s/N s/Ps), (d) inoculada sólo con la bacteria (R+Ps) y (e) con la bacteria y el nematodo (R+N+Ps) a las 24 h post-inoculación. N= <i>N. aberrans</i>	39
Figura 3. Respuesta hipersensitiva en hojas de chile resistente CM-334 (R) inoculadas por infiltración con zoosporas de <i>P. capsici</i> (O): (a) inoculada sólo con el oomiceto (R+Oi, y (b) con ambos patógenos (R+N+Oi) a las 16 h post-inoculación, nótese la deshidratación del tejido en (a) mientras que en (b) sólo se aprecia un área clorótica; (c) R+Oi y (d) R+N+Oi a las 24 h post-inoculación; y (e) R+Oi y (f) R+N+Oi, a las 48 h post-inoculación. N= <i>N. aberrans</i>	41
Figura 4. Síntomas en hojas de chile J. E. Parker susceptible a <i>P. capsici</i> a las 24 (a) y 48 h (b) postinoculación con el oomiceto.....	42
Figura 5. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno-1 del capsidiol.....	
Figura 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 del capsidiol.....	43
Figura 7. Concentración de capsidiol en chile resistente CM-334 (R): A) Hojas asperjadas con zoosporas de <i>P. capsici</i> (O): inoculadas solo con el oomiceto (R+Oa), con ambos patógenos (R+N+Oa), y sin nematodo ni oomiceto (R s/N s/O); B) Hojas infiltradas con <i>P. syringae</i> pv. <i>tagetis</i> (Ps): inoculadas solo con la bacteria (R+Ps), con ambos patógenos (R+N+Ps), e infiltradas solo con agua destilada estéril (R s/N s/Ps). A los 3 y 6 días post inoculación. N= <i>N. aberrans</i>	46

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

La marchitez inducida por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian, es una de las enfermedades más destructivas y que afecta la producción de chile (*Capsicum annum* L.) en todo el mundo (Redondo y Rodríguez, 1987; Erwin y Ribeiro, 1996; Ristaino y Johnston, 1999). Una estrategia ambientalmente amigable para el manejo de esta enfermedad la constituye el uso de variedades resistentes. Sin embargo, se ha demostrado que la resistencia de algunas variedades a ciertos hongos y oomicetos con origen en el suelo es frecuentemente inhibida cuando éstos son infectados previamente por nematodos agalladores tales como *Meloidogyne* spp y *Nacobbus* spp, presentes en diversas áreas productoras de chile en México. Materiales de chile resistentes a *P. capsici*, desarrollados por el Centro de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias del Bajío se han comportado como susceptibles cuando son infectados por *Nacobbus aberrans* (Hernández *et al.*, 1992; Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). El genotipo de chile tipo serrano Criollo de Morelos (CM-334) destaca por un alto grado de resistencia a *P. capsici*, misma que ha sido comprobada en diferentes partes del mundo aún cuando se ha inoculado con las cepas más patogénicas del oomiceto (Redondo y Rodríguez, 1987; Palloix *et al.*, 1988; Ortega *et al.*, 1991; Glosier *et al.*, 2008). Se considera que CM-334 también puede ser una excelente fuente de resistencia contra el tizón foliar inducido por este mismo patógeno (Oelke *et al.*, 2003).

Genotipos resistentes a *Phytophthora capsici* reaccionan de forma hipersensitiva (muerte celular programada) con el propósito de detener, aminorar y contrarrestar el desarrollo de una enfermedad. Así, tanto plantas resistentes como susceptibles a enfermedades poseen mecanismos de defensa, y la incompatibilidad o compatibilidad patógeno-hospedante está determinada por la prontitud y la magnitud con la que ocurre la expresión de los genes responsables de la manifestación de los mecanismos de defensas y que restringen el desarrollo de un patógeno potencial (Kuc, 1997; Desender *et al.*, 2007). Los mecanismos involucrados en la resistencia al oomiceto involucran diferentes metabolitos cuya síntesis se dispara durante la respuesta hipersensitiva, tal

es el caso del capsidiol, la principal fitoalexina sesquiterpénica de *Capsicum annuum* cuya acumulación en cantidades inhibitorias frecuentemente se relaciona con la resistencia. Se ha reportado que durante la interacción incompatible de *P. capsici* con CM-334, se incrementa la síntesis de esta fitoalexina en el sitio de infección; resultados similares han sido observados con otros materiales que de igual forma exhiben resistencia al oomiceto (Üstün, 1995; Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000). Recientemente, Ueeda y colaboradores (2006) encontraron que los mecanismos de resistencia al oomiceto se expresaron también en la parte aérea de plantas de chile CM-334 aún cuando macroscópicamente no se observó la típica reacción de hipersensibilidad; sin embargo, hubo muerte celular programada a nivel microscópico en los sitios donde se depositó una suspensión de 100 000 zoosporas mL⁻¹; tal respuesta hipersensitiva se asoció con un incremento en los niveles de los ácidos jasmónico y salicílico.

A pesar del alto grado de resistencia de CM-334 a la marchitez, se ha consignado que plantas previamente inoculadas con *N. aberrans* se vuelven susceptibles al oomiceto, es decir se rompe su resistencia (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005), probablemente debido a los cambios metabólicos y/o fisiológicos inducidos por el nematodo en la raíz de la planta hospedante (Zavaleta-Mejía, 2002; López-Martínez y Zavaleta-Mejía, 2007; Godínez-Vidal *et al.*, 2008a).

Los nematodos endoparásitos sésiles como *Meloidogyne* sp y *Nacobbus aberrans* y los formadores de quistes *Heterodera* sp y *Globodera* sp establecen una interacción íntima y sofisticada con sus hospedantes que resulta en la formación de sitios especializados de alimentación (células gigantes y sincitios) para la obtención de nutrientes imprescindibles para su crecimiento y reproducción (Jones y Payne *et al.*, 1977; Davis *et al.*, 2000; Manzanilla-López *et al.*, 2002; Williamson y Gleason, 2003). Con frecuencia la planta hospedante infectada por el nematodo es más propensa a la infección por otros patógenos con origen en el suelo tales como hongos u oomicetos, constituyendo así las enfermedades complejas que resultan en una interacción sinérgica o aditiva (Powell, 1971; Back *et al.*, 2002; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; De Waele y Elsen, 2007). Al respecto, se sabe que las células gigantes y sincitios son

metabólicamente hiperactivas, y que tales modificaciones repercuten en una reprogramación génica (represión y/o sobreexpresión) de las células del hospedante induciendo cambios morfológicos (hipertrofia e hiperplasia) y fisiológicos en la raíz que subsecuentemente se expresan a nivel sistémico modificando profundamente el metabolismo normal de la planta hospedante (Jones, 1981; Vercauteren *et al.*, 2001; Back *et al.*, 2002; Gheysen y Fenoll, 2002; Abad *et al.*, 2003; Baum *et al.*, 2007; Caillaud *et al.*, 2008). La cascada de señales bioquímicas asociadas con la expresión de los mecanismos de defensa de las plantas, es modificada por la infección por nematodos; la expresión de tales mecanismos se reduce y podría estar ligada al desarrollo del sitio especializado de alimentación (Back *et al.*, 2002; Abad *et al.*, 2003; Davis, *et al.* 2005; Jammes *et al.*, 2005; Caillaud *et al.*, 2008). La interacción compatible nematodo-planta resulta en un incremento de la susceptibilidad e inhibición de los mecanismos de defensa de la planta contra otros patógenos (Bowman y Bloom, 1966; Powell, 1971; Mai y Abawi, 1987; France y Abawi, 1994;; Vargas *et al.*, 1996; Back *et al.* 2002; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005).

Nuestro grupo de investigación ha demostrado que durante la interacción CM-334- *N. aberrans*-*P. capsici* la inhibición de la resistencia al oomiceto es más evidente a partir de los 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo, tiempo que coincide con la aparición de hembras inmaduras de *N. aberrans* responsables de inducir los sitios especializados de alimentación en la raíz del hospedante (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Zavaleta-Mejía, 2002; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). También, de manera consistente se ha observado que las plantas CM-334 infectadas con *N. aberrans* presentan una reducción en la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y peroxidasas (López-Martínez y Zavaleta-Mejía, 2007; Godínez-Vidal *et al.*, 2008a). PAL es una enzima reguladora en la ruta de los fenilpropanoides, la cual deriva en la síntesis de múltiples metabolitos secundarios tales como los fenoles, tanto de aquellos involucrados en la lignificación de tejidos infectados, como los que poseen actividad antimicrobiana. Así mismo, el incremento en la actividad de PAL se asocia de manera consistente con la respuesta de hipersensibilidad, la cual se presenta en genotipos de

chile resistentes a *P. capsici*, incluyendo a CM-334 (Candela *et al*, 1995; Fernández-Pavia, 1997; García-Pérez *et al*, 1998; Gayoso *et al*, 2004).

Hasta ahora en nuestro grupo los estudios se han enfocado a conocer los cambios inducidos por *N. aberrans* en la expresión de genes y cambios bioquímico-fisiológicos, asociados con los mecanismos de defensa en la raíz (Vargas, 1998; López-Martínez y Zavaleta-Mejía, 2007; Godínez-Vidal *et al.*, 2008a). Sin embargo, también es de interés conocer la repercusión de la reprogramación génica inducida por el nematodo en la raíz en la expresión de los mecanismos de defensa en la parte aérea del chile CM-334.

Con base en estos antecedentes en la presente investigación se probaron las siguientes hipótesis: 1) “Plantas de chile CM-334 infectadas con *N. aberrans* no responden hipersensitivamente a otros patógenos inoculados en el follaje; 2) Plantas de CM-334 infectadas con *N. aberrans* presentan una baja acumulación de capsidiol en la parte aérea cuando son inoculadas foliarmente con *P. capsici* o *P. syringae* pv *tagetis*”.

Por lo anterior los objetivos planteados fueron: 1) Conocer si plantas de chile CM-334 inoculadas con *N. aberrans* responden hipersensitivamente a las inoculaciones foliares con *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* y *P. capsici*; y 2) Comparar el contenido de capsidiol en plantas infectadas y no infectadas con *N. aberrans* e inoculadas con *P. capsici* o *P. syringae* pv *tagetis*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Marchitez del chile por *Phytophthora capsici*

La marchitez inducida por el oomiceto *P. capsici* es una de las principales enfermedades en México y a nivel mundial, que causa pérdidas económicas significativas en la mayoría de las áreas productoras de chile (*C. annuum* L.) de nuestro país, y que bajo condiciones favorables oscilan entre 60 y el 100% de la producción (Redondo y Rodríguez, 1987; Erwin y Ribeiro, 1996; Ristaino y Johnston, 1999). El agente causal con origen en el suelo, es capaz de infectar cualquier estrato de la planta hospedante, induciendo pudriciones radicales y del cuello, y tizones en hojas, tallos y frutos. La enfermedad fue descrita por vez primera en 1922 en plantas de chile en Nuevo México, USA (Leonian, 1922). Además del chile, afecta un amplio rango de cucurbitáceas y otras solanáceas a nivel mundial, como berenjena, tomate, pepino, sandía, calabaza (Ristaino y Johnston, 1999; Hausbeck y Lamour, 2004).

El patosistema *C. annuum-P. capsici* es el más complejo de los inducidos por el resto de especies de *Phytophthora*; así, virtualmente es capaz de infectar cualquier parte de la planta de chile, en cualquier etapa fenológica siendo la enfermedad más devastadora en la etapa reproductiva de un hospedante susceptible; forma parte del grupo de patógenos que causan la enfermedad conocida como damping-off en almácigos. Causa una pudrición radical y también formas distintivas de lesiones necróticas en el tallo; en las hojas causa lesiones circulares, café grisáceas y acuosas; este tipo de lesiones son comunes cuando el inóculo es dispersado en forma de salpique del suelo a partes bajas de la planta. La infección radical interfiere con la absorción y el transporte del agua y nutrientes, provocando la marchitez. En el tejido infectado el patógeno se desarrolla óptimamente entre 25 y 28°C produciendo cantidades conspicuas de esporangios (Erwin y Ribeiro, 1996; Ristaino y Johnston, 1999; Hausbeck y Lamour, 2004; Liu *et al.*, 2008). La alta humedad del suelo, el exceso de agua provocado por periodos lluviosos muy prolongados o riegos pesados

combinados con un drenaje deficiente del terreno de cultivo; son condiciones que favorecen el desarrollo de la enfermedad.

El agente causal presenta micelio cenocítico y forma parte de las especies heterotálicas de *Phytophthora*, presenta dos tipos de compatibilidad A1 y A2; cada tipo de compatibilidad produce hormonas que son las responsables para la diferenciación de los gametangios en el tipo de conjugado opuesto, produce un gametangio masculino conocido como anteridio, y un femenino el oogonio; el anteridio es anfígeno en esta especie; la meiosis ocurre dentro del gametangio, y la plasmogamia y cariogamia resulta en la formación de oosporas, las cuales representan a las esporas sexuales que sirven como estructuras de reposo. Las oosporas pueden germinar ya sea directamente mediante la formación de un tubo germinativo o indirectamente con la formación de un esporangio; son altamente resistentes a condiciones ambientales adversas y capaces de sobrevivir por meses y hasta por años en ausencia de su hospedante. La producción de clamidosporas es por lo regular rara en aislamientos que infectan al Chile (Erwin y Ribeiro, 1996; Ristaino y Johnston, 1999; Hausbeck y Lamour, 2004).

El patógeno posee el potencial de reproducirse asexualmente mediante la formación de esporangios, los cuales son generalmente ovoides y tienen una papila prominente en su ápice y se originan de esporangióforos ramificados. El esporangio es fácilmente desprendible del esporangióforo y puede ser dispersado en los campos por el viento, lluvia e irrigación (Erwin y Ribeiro, 1996; Ristaino y Johnston, 1999). La germinación es de forma indirecta liberando zoosporas móviles biflageladas bajo condiciones de alta humedad en la superficie del hospedero o en suelos saturados que favorecen su fácil desplazamiento. Las zoosporas constituyen la principal fuente de infección radical, exhiben un geotropismo negativo y quimiotácticamente siguen el gradiente de nutrientes mientras nadan y una vez que entran en contacto con la planta se enquistan y germinan mediante la formación de una hifa que es la responsable para iniciar la invasión del tejido (Ristaino y Johnston, 1999; Tyler, 2002; Hausbeck y Lamour, 2004).

Ningún método actualmente disponible proporciona un control adecuado de la marchitez del chile. Para el manejo de esta enfermedad se han probado diferentes estrategias que involucran al control químico, cultural (rotación de cultivos, solarización, acolchado, incorporación de materia orgánica al suelo y riego adecuado, entre otros), biológico (antagonistas como, *Tricoderma harzianum* y *Burkholderia cepacia*) y uso de variedades resistentes; que en combinación llegan a minimizar en parte las pérdidas ocasionadas por este patógeno (Ahmed *et al.*, 2000). El control químico mediante fungicidas del grupo de los fenilamidos tales como el mefenoxam y metalaxil ha sido una práctica común; sin embargo, el éxito de estos productos es restringido por el surgimiento de aislamientos resistentes al producto (Ristaino y Johnston, 1999; Parra y Ristaino, 2001). El uso de variedades resistentes y las prácticas culturales constituyen estrategias ambientalmente amigables para el manejo de este patosistema (Ristaino y Johnston, 1999; Hausbeck y Lamour, 2004).

Resistencia genética a *P. capsici*

El uso de genotipos con niveles aceptables de resistencia a este tipo de enfermedades es considerado como la mejor alternativa, puesto que involucra la reducción de costos y de efectos negativos al ambiente. El requisito fundamental para el desarrollo de cultivares resistentes es la disponibilidad de fuentes confiables de resistencia. La resistencia a *P. capsici* en Chile ha sido estudiada desde 1960 (Kim *et al.*, 1989) y de entonces a la fecha, se han desarrollado múltiples trabajos en México y en el mundo, tendientes a la búsqueda de genotipos que exhiban una resistencia completa y duradera contra el oomiceto. De todos los genotipos resistentes hasta ahora conocidos, destaca el Chile tipo serrano Criollo de Morelos 334 (CM-334) cuya alta resistencia ha sido comprobada en diferentes partes del mundo aún cuando se ha inoculado con las cepas más patogénicas del oomiceto (Redondo y Rodríguez, 1987; Palloix *et al.*, 1988; Ortega *et al.*, 1991; Bosland y Lindsay, 1991; Glosier *et al.*, 2008). Se reporta también que constituye una excelente fuente de resistencia a las infecciones foliares y del tallo por *P. capsici* (Walker y Bosland, 1999; Oelke *et al.*, 2003; Sy *et al.*, 2005). La evidencia experimental obtenida por Sy y colaboradores (2005), sugiere que en CM-

334 existen tres genes de resistencia que de manera independiente gobiernan la resistencia en la raíz, el tallo y el follaje. Similarmente se ha documentado que posee además resistencia a nematodos agalladores del género *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* (Djian-Caporalino *et al.*, 1999; Pegard *et al.*, 2005); y a los virus Y de la papa (PVY) y del moteado del chile (PeMV) (Palloix y Kyle, 1995; Pickersgill, 1997; Arnedo *et al.*, 2006).

Mecanismos de resistencia a *P. capsici*

En genotipos resistentes a *P. capsici*, se expresan diferentes mecanismos bioquímicos que se activan durante la respuesta hipersensitiva. Así, durante esta interacción se ha documentado: la inducción y acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis, como β -1, 3-glucanasas que hidrolizan a las β -1, 3-glucanas, principal componente de la pared celular del oomiceto (Hwang *et al.*, 1997; Egea *et al.*, 1999; Taller, 2006); incrementos en la actividad de peroxidasas acídicas y fenilalanina amonio-liasa (PAL) (Mozetti *et al.*, 1995; Fernández-Pavía, 1997; Taller, 2006); generación de óxido nítrico; ácidos salicílico y jasmónico (Requena *et al.*, 2005; Ueeda *et al.*, 2006); activación temprana de la enzima 5-*epi*-aristolóqueno sintasa y el subsecuente incremento en la acumulación de capsidiol (Molot *et al.*, 1981; Egea *et al.*, 1996a; García-Pérez *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 2000; Alcázar *et al.*, 2007); y cambios cualitativos y cuantitativos de compuestos fenólicos, principalmente el ácido trans-cinámico (Fernández-Pavía, 1997; Candela *et al.*, 1995; Lizzi *et al.*, 1995). Tanto el capsidiol como los fenoles libres inhiben el crecimiento del oomiceto *in vitro* (Egea *et al.*, 1996a; Fernández-Pavía, 1997; Arreola-Cortés *et al.*, 2007).

En CM-334 la resistencia a *P. capsici* no está conferida por barreras físicas que impidan la penetración del oomiceto en las raíces (Fernández-Pavía y Liddell, 1997); el oomiceto al ingresar a la raíz dispara el incremento en los niveles de mensajeros que codifican para la enzima PAL, que a su vez se asocia con cambios cuantitativos y cualitativos de compuestos fenólicos con propiedades tóxicas al oomiceto. Aun cuando el oomiceto es capaz de penetrar en las raíces su desarrollo es lento, produce menos esporangios y la colonización del tejido por el micelio es finalmente detenida,

presentándose solo leve necrosis en las puntas de las raíces sin que la planta llegue a mostrar los síntomas de marchitez; en contraste, las plantas susceptibles mueren al cabo de 7 a 10 días. La presencia de pequeñas áreas necrosadas sugiere que el oomiceto dispara una respuesta hipersensitiva imposibilitando el avance de la infección (Fernández-Pavía, 1997).

En la parte aérea de CM-334, existen defensas estructurales preexistentes representadas por la presencia de vellosidades en hojas y tallos, que restringen la habilidad del patógeno para adherirse fácilmente al tejido de la planta lo cual retrasa la invasión, y una vez que penetra la colonización es detenida por una respuesta hipersensitiva (Ueeda *et al.*, 2006; Egea-Gilabert *et al.*, 2008). En hojas de CM-334 inoculadas con zoosporas del oomiceto, se presentó un rápido incremento en los niveles de ácido jasmónico que indujo la generación de peróxido de hidrógeno, que subsecuentemente disparó la respuesta hipersensitiva, misma que estuvo asociada a una acumulación tardía de ácido salicílico (Ueeda *et al.*, 2006). De manera similar, en tallos decapitados inoculados con micelio del oomiceto, se generaron altas concentraciones de óxido nítrico, molécula de señalización, que se asoció con incrementos en la producción de proteínas relacionadas con patogénesis, compuestos fenólicos y capsidiol (Candela *et al.*, 2000; Requena *et al.*, 2005).

A pesar del alto grado de resistencia mostrado por CM-334 a infecciones radicales por *P. capsici*, nosotros hemos demostrado que las plantas de este genotipo se comportan como susceptibles cuando han sido previamente infectadas por el nematodo agallador *Nacobbus aberrans* (Vargas *et al.*, 1996; Zavaleta-Mejía, 2002; Trujillo *et al.*, 2005), es decir se rompe su resistencia. El fenómeno de rompimiento de resistencia ha sido ampliamente documentado por diversos investigadores (Bowman y Bloom, 1966; Powell, 1971; Sidhu y Webster, 1977; Mai y Abawi, 1987; France y Abawi, 1994; Marley y Hillocks, 1994; Vargas *et al.*, 1996; Uma-Maheswari *et al.*, 1995; Back *et al.*, 2002; Zavaleta-Mejía, 2002).

Rompimiento de resistencia a *P. capsici* en chile CM-334

Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que plantas de chile del genotipo Criollo de Morelos CM-334 se comportan como susceptibles al oomiceto *P. capsici*, cuando son previamente infectadas con el nematodo agallador *N. aberrans*; y que la máxima expresión de este fenómeno se observa a los 21 días posteriores a la inoculación con 2000 larvas del segundo estadio, utilizando un nivel de inóculo de 300 000 zoosporas del oomiceto por planta, tiempo que coincide con la aparición de hembras inmaduras de *N. aberrans* responsables de inducir los sitios especializados de alimentación en la raíz del hospedante. El rompimiento de resistencia se da aún cuando se inoculan plantas con doble sistema radical en las cuales existe una separación física entre el nematodo y el hongo u oomiceto, lo cual claramente indica que la pérdida de resistencia es debida a cambios metabólicos y fisiológicos inducidos por *N. aberrans* y no por el daño físico causado en la raíz (Hernández, *et al.*, 1992; Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Zavaleta-Mejía, 2002).

Considerando por un lado la información que existe en relación con los mecanismos asociados con la resistencia a *P. capsici* en variedades resistentes de chile en general y en particular del genotipo CM-334 y en el conocimiento que en la actualidad se tiene respecto a que: (1) la infección por el nematodo agallador *Meloidogyne incognita* resulta en una represión y una estimulación de los genes *PAL* (Fenilalanina-amonioliasa, *PAL*) (Goddijn *et al.*, 1993) y *hmg* (Hidroximetil-glutaril-CoA reductasa, *HMGCoA-r*), respectivamente, en hospedantes compatibles (Cramer, 1992; Cramer *et al.*, 1993); (2) que la actividad de *PAL* fue reducida en plantas de chile CM-334 resistentes a *P. capsici* inoculadas con el nematodo *N. aberrans* (Vargas, 1998; López-Martínez y Zavaleta-Mejía, 2007; Godínez-Vidal *et al.*, 2008a), y (3) que la resistencia a *P. capsici* en chile CM-334 se ha asociado con un incremento en la expresión de los genes *PAL* y peroxidasas (*Pox*) y, con una menor expresión del gen *hmg* (Fernández-Pavía, 1997); se ha propuesto la hipótesis de que: “El rompimiento de la resistencia a *P. capsici* por el nematodo agallador *N. aberrans* en chile CM-334, se explica en parte por una estimulación del gen *hmg*, y una represión de los genes *Pox* y *PAL*, y el consecuente

incremento y reducción en la actividad enzimática de Hidroximetil Glutaril CoA reductasa y de Peroxidasas, y de la Fenilalanina Amonio Liasa, respectivamente (Zavaleta-Mejía, 2002). Actualmente la hipótesis propuesta es que el rompimiento de la resistencia a *P. capsici* por el nematodo agallador *N. aberrans* en Chile CM-334, se asocia en parte con una estimulación del gen *hmg1*, y una represión de los genes *Pox* y *PAL*, así como la modificación en la expresión de otros genes involucrados en la ruta de isoprenoides y de fenilpropanoides (comunicación personal Dra. Emma Zavaleta-Mejía).

De manera consistente se ha observado que las plantas CM-334 infectadas simultáneamente con *N. aberrans* y *P. capsici*, presentan una reducción en la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), así como de peroxidasas (López-Martínez y Zavaleta-Mejía, 2007; Godínez-Vidal *et al.*, 2008a), lo cual contrasta con la mayor actividad mostrada en plantas inoculadas solo con el oomiceto. PAL es una enzima reguladora en la ruta de los fenilpropanoides, la cual deriva en la síntesis de múltiples metabolitos secundarios tales como los fenoles, tanto de aquellos involucrados en la lignificación de tejidos infectados, como los que poseen actividad antimicrobiana. En este sentido, durante la interacción compatible *N. aberrans*-Chile CM-334, se ha reportado que el contenido de fenoles solubles totales se reduce con respecto a plantas no inoculadas con el nematodo, particularmente, el ácido clorogénico (López, 2007); en contraste, en la interacción incompatible *Meloidogyne* spp.-CM334, el contenido de este compuesto se incrementa hasta 59 veces más con respecto a plantas no inoculadas y 7 veces más con respecto a plantas susceptibles inoculadas y por ello se considera que está implicado en la resistencia a dicho nematodo (Pegard *et al.*, 2005). En plantas CM-334 inoculadas con *N. aberrans* en combinación con *P. capsici* también se ha registrado un menor contenido de fenoles solubles totales (López-Martínez y Zavaleta-Mejía, 2007). Lo anterior sugiere que el nematodo reduce la expresión de algunos mecanismos de defensa de CM-334 contra el oomiceto.

Fernández-Pavía y Liddell (1997) reportaron que durante la interacción CM-334-*P. capsici*, la expresión del gen *hmg* fue menor en comparación con el material susceptible NM6-4 y en consecuencia concluyeron que la enzima HMGC_oA-r no está

involucrada en la resistencia, dado que la actividad de esta enzima está relacionada con la síntesis de capsidiol. Sin embargo, ellos no consideran el hecho de que dicha enzima también está asociada con la síntesis de esteroides, que son fundamentales para el desarrollo de *P. capsici*.

Recientemente, Godínez-Vidal y colaboradores (2008b) han demostrado que durante la interacción compatible *N. aberrans*-CM-334 existe un incremento en la acumulación de transcritos del gen *hmg1* (asociados con la biosíntesis de fitoesteroides) con respecto a transcritos del gen *hmg2* (asociados con la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas). Los genes *hmg* constituyen una familia multigénica que incluye a *hmg1*, *hmg2*, *hmg3* que codifican para la enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCoA-), la cual es clave en la ruta de los isoprenoides a través de la cual se sintetizan los esteroides y fitoalexinas sesquiterpénicas como el capsidiol (Chappell, 1995; Ha *et al.*, 2003). Así, una represión del gen *hmg2* puede en parte inducir cambios en la acumulación del capsidiol en CM-334 y una sobreexpresión del gen *hmg1* podría incrementar la biosíntesis de esteroides. Está documentado que los nematodos y oomicetos son incapaces de sintetizar sus propios esteroides, condición que los hace totalmente dependientes de sus hospedantes para la obtención de estos compuestos; en *P. capsici* son necesarios para su crecimiento, reproducción sexual y formación de zoosporas. Con base en esto, se especula que el crecimiento limitado del oomiceto en las plantas CM-334 puede en parte estar asociado con un contenido inadecuado de esteroides (Zavaleta-Mejía, 2002), aunado a la presencia de capsidiol, fenoles y otros compuestos con propiedades tóxicas al oomiceto (Elliot, 1983; Hohl, 1983; Chitwood y Lusby, 1991; Erwin y Ribeiro, 1996; Riou *et al.*, 2007).

Nacobbus aberrans

N. aberrans y otros nematodos endoparásitos sésiles como *Meloidogyne* sp y los formadores de quistes como *Globodera* sp, *Heterodera* sp frecuentemente interactúan con otros fitopatógenos con origen en el suelo. La función de estos nematodos (patógenos biotróficos obligados) en el desarrollo de enfermedades inducidas por hongos u oomicetos con origen en el suelo ha sido demostrada en

muchos cultivos en todo el mundo. Los nematodos agalladores y formadores de quistes establecen con sus hospedantes una interacción íntima y sofisticada que resulta en la formación de sitios especializados de alimentación (células gigantes o sincitios) para la obtención de nutrientes imprescindibles para su crecimiento y reproducción (Jones y Payne *et al*, 1977; Williamson y Gleason, 2003; Davis *et al*, 2000; Manzanilla-López *et al*, 2002)

N. aberrans induce la formación de agallas pequeñas en el sistema radical de plantas hospedantes, similares a las inducidas por *Meloidogyne hapla* y *M. arenaria*, por lo que se le conoce como “falso agallador”, término que consideramos un tanto inapropiado dado que al tener la capacidad de inducir agallas, estrictamente hablando es un nematodo agallador que induce la formación de nódulos en las raíces de sus hospedantes. Infecta naturalmente a plantas de tomate, chile, remolacha, papa y frijol, entre muchas otras. Las plantas infectadas exhiben reducción del crecimiento apical, hojas cloróticas con márgenes enrollados y marchitamiento, y presencia de agallas en las raíces. El nematodo, presenta un fuerte dimorfismo sexual, el macho adulto es vermiforme y la hembra obesa; todos los estadios juveniles, hembras vermiformes, y machos son parásitos migratorios; en el estadio adulto la hembra es obesa y es la responsable de establecer el sitio especializado de alimentación conocido como “sincitio” con la subsecuente hiperplasia e hipertrofia de la raíz (formación de agallas). Su ciclo de vida inicia con los huevos existentes en una matriz gelatinosa secretada por la hembra; el primer estadio juvenil (J1) se desarrolla dentro del huevo, que ocurre una semana después de la primera división celular a una temperatura óptima de 20°C; la primera muda ocurre dentro del huevo, después de la eclosión el J2 puede permanecer en la raíz o iniciar eventos de salida y entradas frecuentes, moviéndose intracelularmente, penetra las paredes celulares terminal y lateralmente causando lesiones necróticas; la muda a J3 ocurre entre 7-10 días post penetración en la raíz o en el suelo, este estadio es poco activo se asemeja inicialmente al J2 pero adopta una forma de “C” aun cuando posteriormente se observa en forma de espiral en la corteza radical; la muda a J4 similarmente puede ocurrir en ambos ambientes alrededor de los 18 días post penetración en la raíz, aunque la del macho se restringe a la corteza

radical; la muda a el estadio adulto igualmente puede ocurrir dentro y fuera de la raíz, las hembras inmaduras son vermiformes, se establecen cerca del cilindro vascular e inducen la formación del sincitio (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Franco y Main, 2008).

Las modificaciones celulares e histológicas en raíces afectadas están acompañadas de cambios fisiológicos y bioquímicos en el hospedante. Las células afectadas que se constituyen en el sincitio muestran citoplasma denso, núcleos hipertrofiados, vacuolización, formación de gránulos de almidón y lisis celular. El establecimiento permanente del nematodo estimula una mitosis en el periciclo y formación de raíces laterales en áreas agalladas. El sincitio es inducido por la hembra inmadura vermiforme y también por la hembra J4, esta estructura tiene forma de huso o acorazonada conformada por una creciente masa de células; el núcleo es largo e irregular, la cromatina y el nucléolo pueden ser desorganizados. Como en la mayoría de los nematodos agalladores, las secreciones con efecto lítico producidas por *N. aberrans* e inyectadas en la célula con su estilete pueden ser las responsables de la inducción del sincitio (Manzanilla-López, *et al.*, 2002; Jones y Payne, 1977).

Inducción de los sitios especializados de alimentación

Los nematodos inductores de sitios especializados de alimentación son parásitos sedentarios de raíces de muchas especies de plantas cultivadas; y aún cuando utilizan estrategias parasíticas muy similares para completar sus ciclos de vida, como es la secreción de un amplio rango de enzimas que incluyen celulasas, quitinasas, pectinasas y extensinas que facilitan la invasión de los tejidos durante la fase migratoria (Lambert *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2001; Williamson y Gleason, 2003; Baum *et al.*, 2007), existen marcadas diferencias entre ellos. El juvenil motil muda al segundo estadio (J2) y eclosiona de los huevos en el suelo; el J2 es el estadio infectivo y es guiado por señales emitidas por la planta hospedante para la localizar tejidos del ápice radical e inicia la penetración; una vez que penetran el proceso de migración difiere entre estos nematodos, las especies de *Meloidogyne* sp lo hacen intercelularmente, pero *N. aberrans* y los formadores de quistes se mueven intracelularmente, dirigiéndose al cilindro vascular. Los generos de *Meloidogyne* y los

formadores de quistes, difieren con respecto a *Nacobbus aberrans* en el inicio de su proceso de alimentación; así, en los dos primeros, el estadio responsable de inducir el sitio especializado es el J2, mientras que en *N. aberrans* lo hace la hembra inmadura (Sigmons *et al.*, 1994; Gheysen y Fenoll, 2002; Manzanilla-López *et al.*, 2002; Williamson y Gleason, 2003; Karczmarek *et al.*, 2004; Baum *et al.*, 2007).

Los sitios especializados de alimentación inducidos por nematodos agalladores y los formadores de quistes difieren en su ontogenia y apariencia. *Meloidogyne* spp induce un agrandamiento sustancial y cambios en un pequeño grupo de células de alimentación situadas alrededor de la cabeza del nematodo resultando cada una de ellas en una célula gigante de las cuales se alimenta hasta completar su ciclo, en cada célula gigante el núcleo experimenta divisiones sucesivas dando lugar a un estado multinucleado; por otra parte, los formadores de quistes y el nematodo *N. aberrans*, inicialmente inducen cambios en una sola célula y mediante la disolución de paredes celulares culmina en la fusión de muchas células vecinas (que a veces superan las 200) que no necesariamente están en contacto directo con el nematodo, formando una masa citoplasmática multinucleada conocida como sincitio; los núcleos de las células sincitiales experimentan una endoreduplicación de su contenido de ADN pero no llegan a dividirse. Los cambios morfológicos durante el desarrollo de estos sitios son acompañados de una alteración dramática de los patrones de expresión génica en la planta hospedante. Una hipótesis actual, indica que los mecanismos moleculares implicados en la formación de células gigantes son similares en las diversas especies de plantas que parasitan los nematodos inductores de agallas; en contraste, los que inducen sincitios presentan diferencias en los mecanismos que promueven la formación de los sitios de alimentación entre especies de plantas hospedantes. Aún cuando el mecanismo preciso de la inducción del sitio especializado se desconoce, algunas evidencias sugieren que las secreciones de las glándulas esofágicas están implicadas (Sigmons *et al.*, 1994; Gheysen y Fenoll, 2002; Manzanilla-López *et al.*, 2002; Karczmarek *et al.*, 2004; Baum *et al.*, 2007; Lilley *et al.*, 2008).

La formación de células gigantes y sincitios derivan de una rediferenciación celular que involucra una reprogramación de la expresión génica (represión y/o sobreexpresión) de

las células hospedantes que se constituyen en el sitio especializado, que finalmente resultan en cambios morfológicos y fisiológicos de la raíz que se expresan a nivel sistémico y que modifican profundamente el metabolismo normal de la planta hospedante (Jones, 1981; Vercauteren *et al.*, 2001; Back *et al.*, 2002; Gheysen y Fenoll, 2002; Abad *et al.*, 2003; Baum *et al.*, 2007; Caillaud *et al.*, 2008). La cascada de señales bioquímicas asociadas con la expresión de los mecanismos de defensa de las plantas, es modificada por la infección por nematodos; la expresión de tales mecanismos se reduce y podría estar ligada al desarrollo del sitio especializado de alimentación (Back *et al.*, 2002; Abad *et al.*, 2003; Davis, *et al.* 2005; Jammes *et al.*, 2005; Caillaud *et al.*, 2008). Así, un análisis global de los genes regulados durante la interacción *M. incognita*-*Arabidopsis thaliana*, sugiere que el 70% de éstos están implicados en rutas biosintéticas de defensa y que fueron reprimidos localmente, así el establecimiento exitoso del nematodo está asociado con una supresión activa de los mecanismos de defensa generando susceptibilidad de la planta hospedante. Tal supresión incluye efectos cruciales sobre genes de resistencia, asociados con las rutas dependientes del ácido jasmónico y etileno, y productos de genes con potencial antimicrobiano. Por otro lado, los factores sobreexpresados involucran a aquellos relacionados con el establecimiento y permanencia del sitio especializado de alimentación. Aunado a esto, se ha dilucidado que durante la fase temprana del parasitismo, los nematodos formadores de quistes y agalladores producen enzimas corismato mutasas que potencialmente inactivan los mecanismos de defensa que involucran a los flavonoides, ácido salicílico y fitoalexinas (Doyle y Lambert, 2003; Jammes *et al.*, 2005; Caillaud *et al.*, 2008; Baum *et al.*, 2007).

Poco se sabe de la implicación de los nematodos inductores de sitios especializados de alimentación, en la inhibición biosintética de fitoalexinas durante el rompimiento de resistencia. Marley y Hillocks (1993) reportan que la resistencia del cultivar ICP 9145 de *Cajanus cajan* a *Fusarium udum*, se asoció con la acumulación de la fitoalexina isoflavonoide “cajanol”; y la pérdida de la resistencia al hongo durante la interacción con *M. incognita* y *M. javanica*, se asoció con un decremento en la acumulación de cajanol (Marley y Hillocks (1994).

Defensa hipersensitiva en Chile

El reconocimiento de un patógeno incompatible con la planta, frecuentemente dispara una reacción de resistencia localizada, conocida como respuesta hipersensitiva (RH), comúnmente asociada a una muerte celular rápida, con el subsecuente colapso de las células implicadas y necrosis local en el sitio de infección, inhibiendo la multiplicación y avance del patógeno (Goodman y Novacky, 1994; Durrant y Dong, 2004; Desender *et al.*, 2007). Este fenómeno está mediado por una serie de respuestas de defensa, cambios en el potencial de membrana, flujo de iones (salida de electrolitos, que ocasionan pérdida de turgencia de células involucradas), producción de especies reactivas de oxígeno, peroxidación de lípidos y fosforilación de proteínas que alteran la fisiología celular y generan mensajeros químicos implicados en la activación de una defensa local y/o sistémica. La respuesta también involucra el reforzamiento de paredes celulares por deposición de calosa y lignina, producción de enzimas líticas como quitinasas y glucanasas, biosíntesis de compuestos fenólicos, fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis (Desender *et al.*, 2007).

En células en suspensión de tres cultivares de Chile con diferente grado de susceptibilidad a *P. capsici* (Yolo Wonder, Americano y Smith-5; susceptible, parcialmente resistente y muy resistente, respectivamente) tratadas con elicitores del oomiceto, se observó que el cultivar más resistente Smith-5 presentó una más rápida e intensa reacción hipersensitiva en comparación con los otros dos genotipos; tal respuesta se asoció con incrementos en la acumulación de capsidiol y proteínas relacionadas con patogénesis (García-Pérez *et al.*, 1998). En el cultivar de Chile Hanbyul inoculado con una cepa avirulenta de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* se incrementaron los niveles de especies reactivas de oxígeno, particularmente el peróxido de hidrógeno, a las 24 horas después de la inoculación; coincidiendo con el tiempo en el que la respuesta hipersensitiva fue más evidente (Do *et al.*, 2003). Los incrementos de especies reactivas de oxígeno relacionadas con mecanismos de defensa, se asociaron con una fuerte acumulación de transcritos de genes que

codifican para la síntesis de ascorbato peroxidasa y thioredoxina peroxidasa en el follaje (Do *et al.*, 2003).

El genotipo Criollo de Morelos (CM-334) reacciona de manera hipersensitiva a *P. capsici*, presentándose áreas necrosadas en las puntas de las raíces que inhiben el crecimiento y multiplicación del patógeno (Fernandez-Pavia, 1997). Otros investigadores reportan que el avance de la necrosis en tallos inoculados, es inversamente proporcional al grado de resistencia y que la RH está asociada a la generación de altas concentraciones de óxido nítrico que actúa como molécula señal que dispara el incremento en la producción de proteínas relacionadas con patogénesis, compuestos fenólicos y capsidiol (Candela *et al.*, 2000; Requena *et al.*, 2005; Egea-Gilabert *et al.*, 2008). En inoculaciones foliares de CM-334, la muerte celular programada fue evidente sólo a nivel microscópico (Ueeda *et al.*, 2006), la invasión micelial fue detenida por una respuesta hipersensitiva rápida y efectiva, en contraste, en el material susceptible California Wonder la invasión micelial progresó exitosamente. Similarmente Pegard y colaboradores (2005), asociaron la resistencia de CM-334 a tres especies de *Meloidogyne*, con la expresión de una respuesta hipersensitiva observada a nivel histológico; en las tres especies, aparentemente la RH previno diferencialmente la migración, el desarrollo y la multiplicación del nematodo dependiendo del grado de resistencia mostrado a las tres especies de *Meloidogyne*; la resistencia al nematodo se asoció con un incremento en el contenido de ácido clorogénico. CM-334 también muestra una resistencia hipersensitiva al virus Y de la papa (PVY), expresada mediante lesiones necróticas locales; tal resistencia es controlada por un gen dominante (Pickersgill, 1997).

Implicación del capsidiol en la resistencia a *Phytophthora capsici*

Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas que se acumulan en las plantas expuestas a un estrés biótico o abiótico. Se acumulan en grandes cantidades tanto en el sitio de penetración como en las células y tejidos adyacentes a las células que reaccionan hipersensitivamente; no obstante, la información genética para su síntesis se encuentra

tanto en plantas susceptibles como en resistentes; sin embargo, en plantas resistentes las fitoalexinas se acumulan en mayor cantidad y más rápidamente (Kuc, 1997).

El capsidiol, una potente fitoalexina antifúngica, es un sesquiterpeno bicíclico dihidroxilado sintetizado por algunas especies de solanáceas, que incluyen a *Capsicum annuum*, *C. frutescens*, *Nicotiana tabacum* y *Datura stramonium* en respuesta a desafíos por patógenos o elicitores abióticos, y es considerado como la fitoalexina primaria biosintetizada por plantas de tabaco y chile en respuesta a varios estímulos ambientales (Stoessl *et al.*, 1972; Zhao *et al.*, 2004). La propiedad antifúngica (inhibición de la germinación y crecimiento micelial) está ampliamente documentada e inicia con los trabajos pioneros de Stoessl y colaboradores (1972), al dilucidar el poder inhibitorio en el crecimiento micelial de: *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Trichoderma viridae*, *Aspergillus fumigatus*, *Monilinia fructicola* y *Phytophthora capsici*.

En genotipos de chile altamente resistentes al oomiceto *P. capsici*, la implicación de este metabolito está ampliamente documentada. Así, Egea y colaboradores (1996a) bajo condiciones *in vitro*, evaluaron el efecto del capsidiol sobre el crecimiento micelial del oomiceto, y demostraron que a niveles de 3.75 mM exhibe una propiedad fungistática y fungicida a niveles superiores a 5 mM, dicha concentración fue similar a la máxima acumulada en la zona necrótica durante la interacción del oomiceto con el genotipo resistente Smith-5 al sexto día post-inoculación, al reaccionar de forma hipersensitiva (Arreola-Cortés *et al.*, 2007). La acumulación de capsidiol es más temprana e intensa en los genotipos resistentes con respecto a los susceptibles (Molot *et al.*, 1981; Egea *et al.*, 1996b; García-Pérez *et al.*, 1998). Candela y colaboradores (2000), reportan que durante la interacción incompatible CM-334-*P. capsici* la máxima concentración acumulada en tallos decapitados inoculados con micelio del oomiceto, fue de 362.7 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco a los 6 días después de la inoculación; resultados similares de la dinámica de acumulación de este compuesto en otros genotipos de chile resistentes al oomiceto han sido documentados (Molot *et al.*, 1981; Hwang, 1995; Taller, 2006).

El capsidiol se sintetiza a través de la ruta de isoprenoides, su biosíntesis (Figura 1) está regulada por la expresión de dos enzimas clave, 5-epiaristoliqueno sintasa (EAS) que cataliza la ciclización del farnesil difosfato (FPP) a el precursor bicíclico 5-epiaristoliqueno (EA) y es responsable para la desviación del farnesil difosfato de la ruta mevalónica hacia la biosíntesis de este metabolito; subsecuentemente las hidroxilaciones al carbono-1 y carbono-3 de la molécula son catalizadas por la enzima 5-epiaristoliqueno dihidroxilasa (EAH) (Starks *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 2005).

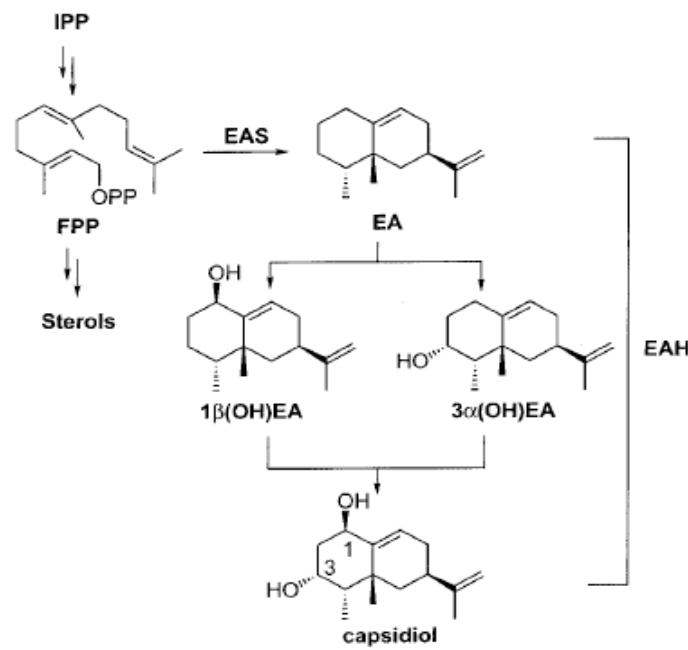


Figura 1. Ruta biosintética del capsidiol (Takahashi *et al.*, 2005).

El metabolismo de isoprenoides en plantas está sujeto a una regulación tanto positiva como negativa. Bajo condiciones normales del crecimiento vegetal, cerca del 40% del flujo de carbonos a través de la ruta mevalónica es dirigida a la biosíntesis de escualeno, el precursor común de todos los triterpenos (por ejemplo, esteroides); pero si la planta es atacada por un patógeno o tratada con compuestos elicitores, la biosíntesis de esteroides es suprimida y aproximadamente el 20% del flujo de carbonos es desviado hacia biosíntesis *de novo* de fitoalexinas sesquiterpénicas (Vögeli y Chapell, 1988).

LITERATURA CITADA

- Abad, P., B. Favery, M. N. Rosso, and P. Castagnone-Sereno. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology* 4: 217-224.
- Ahmed, S. A., C. P. Sanchez, and M. E. Candela. 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.
- Alcázar, M. C., A. Requena, M. E. Requena, M. Ezziyanni, M. E. Candela, y C. Egea-Gilabert. 2007. Cambios transcripcionales en la producción de fitoalexinas en la interacción pimiento-*Phytophthora capsici*. *Actas de Horticultura* 48: 89-92.
- Arnedo, A. M. S., M. L. Arteaga, and R. G. Ortega. 2006. New inheritance studies related to *Potato Virus Y* (PVY) resistance in *Capsicum annuum* L. "Serrano Criollo de Morelos-334". *Euphytica* 151: 95-101.
- Arreola-Cortés, A., E. L. Soriano-Bello, E. Lozoya-Gloria, A. Barriga-Guzmán, and E. García-Pineda. 2007. The effect of acetylation of capsidiol phytoalexin on fungitoxic activity. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 40: 69-73.
- Back, M. A., P. P. J. Haydock and P. Jenkinson. 2002. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. *Plant Pathology* 51: 683-697.
- Baum T., J., R. S. Hussey, and E. L. Davis. 2007. Root-Knot and cyst nematode parasitism genes: The molecular basis of plant parasitism. *Genetic Engineering* 28:17-43.
- Bosland, P.W., and Lindsay D.L. 1991. A seedling screen for *Phytophthora* root rot of pepper, *Capsicum annuum*. *Plant Disease* 75: 1048-1050.
- Bowman, P., and J.R. Bloom. 1966. Breaking the resistance of tomato varieties to *Fusarium* wilt by *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology* 56: 871.
- Candela, M. E., M.D. Alcázar, A. Espin, C. Egea and L. Almela. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44: 116-123.
- Candela, M.E., C. Egea, M. D. García-Pérez, J. Costa, and M. Candela. 2000. Breeding papryka type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Horticulturae* 522: 79-86.

- Caillaud, M. C., G. Dubreuil, M. Quentin, L. Perfus-Barbeoch, P. Lecomte, J. de Almeida E., P. Abad, M.N. Rosso, and B. Favery. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* 165: 104-113.
- Chitwood, D.J., and W.R. Lusby. 1991. Metabolism of plant sterols by nematodes. *Lipids* 26: 619-627.
- Cramer, C.L. 1992. Regulation of defense-related gene expression during plant pathogen interaction. *Journal of Nematology* 24: 586-587.
- Cramer, C.L., D.Weissenborn, C.K. Cottingham, C.J. Denbow, J.D. Eisenback, D.N. Radin and X. Yu. 1993. Regulation of defense-related gene expression during plant-pathogen interactions. *Journal of Nematology* 25: 507-518.
- Davis, E. L., R. S. Hussey, T. J. Baum, J. Bakker, A. Schots, M. N. Rosso, and P. Abad. 2000. Nematode Parasitism Genes. *Annual Review of Phytopathology* 38: 365-396.
- Davis, E. L., and M. G. Mitchum. 2005. Nematodes: Sophisticated Parasites of Legumes. *Plant Physiology* 137: 1182-1188.
- Desender, S., D. Andrivon, and F.Val. 2007. Activation of defense reactions in *Solanaceae*: where is the specificity?. *Cellular Microbiology* 9: 21-30.
- De Waele, D., and A. Elsen. 2007. Challenges in tropical plant nematology. *Annual Review of Phytopathology* 45: 457-487.
- Ding, X. J. Shields, R. Allen, and R. S. Hussey. 2000. Molecular cloning and characterization of a venom allergen AG5-like cDNA from *Meloidogyne incognita*. *International Journal of Parasitology* 30: 77-81.
- Djian-Caporalino, C., L. Pijarowski, A. Januel, V. Lefebvre, A. Daubèze, A. Palloix, A. Dalmasso, and P. Abad. 1999. Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 99: 496-506.
- Do, H. M., J. K. Hong, H. W. Jung, S. H. Kim, J. H. Ham, and B. K. Whang. 2003. Expression of Peroxidase-like Genes, H₂O₂ Production, and Peroxidase Activity During the Hypersensitive Response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 16: 196-205
- Doyle, E. A., and K. N. Lambert. 2003. *Meloidogyne javanica* Chorismate Mutase 1 Alters Plant Cell Development. *Molecular Plant Microbe Interaction* 16: 123-131.

- Durrant, W. E., and X. Dong. 2004. Systemic Acquired Resistance. Annual Review of Phytopathology. 42: 185-209.
- Egea, C. M. D. Alcazar y M. E. Candela. 1996a. Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. Physiologia Plantarum 98: 737-742.
- Egea, C., M.D. García P., and M.E. Candela. 1996b. Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. Journal of Plant Physiology 149: 762-764.
- Egea, E., M. J. Dickinson, M. Candela, and M. E. Candela. 1999. β -1, 3-Glucanase isoenzymes and genes in resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici*. Physiologia Plantarum 107: 312-318.
- Egea-Gilabert, C., G. Bilotti, M. E. Requena, M. Ezziyyani, J .M. Vivo-Molina, and M. E. Candela. 2008. Pepper morphological traits related with resistance to *Phytophthora capsici*. Biologia Plantarum 52:105-109.
- Elliot, C. G. 1983. Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*. Pp. 71-80. In: *Phytophthora*. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. D.C. Erwin, S. Bartniki-Garcia and P.H. Tsao eds. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota.
- Erwin, D. C., and O. K. Ribeiro.1996. *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. Pp: 262-268
- Fernandez-Pavía, S. 1997. Host-Pathogen interactions in the root rot *Phytophthora capsici* / *Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph. D. Dissertation. New Mexico State University. 109 p.
- Fernandez-Pavía, S., and C.M. Liddell. 1997. Resistance of *Capsicum annuum* CM-334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. Phytopathology 87: 529.
- France, R. A., and G. S. Abawi. 1994. Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* on selected bean genotypes. Journal of Nematology 26: 467-74.
- Franco, J., and G. Main. 2008. Management of nematodes of Andean tuber and grain crops. Pp. 99-117. In: Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes. A. Ciancio, and K. G. Mukerji (eds.). ©2008 Springer.
- Gao B., R. Allen, T. Maier, E. L. Davis, T. J. Baum, and R. S. Hussey. 2001. Molecular characterisation and expression of two venom allergen-like protein genes in *Heterodera glycines*. International Journal of Parasitology 31: 1617-1625.

- García- Pérez, M. D., C. Egea y M. E. Candela. 1998. Defense response of pepper (*Capsicum annuum*) suspension cells to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 103: 527-533.
- Gayoso, C. F. Pomar, F. Merino and M.A. Bernal. 2004. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae* 102: 1-13.
- Gheysen, G. and C. Fenoll. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology* 40: 191-219.
- Glosier, B. R., E.A. Ogundiwin, G. S. Sidhu, D. R. Sischo, J. P. Prince. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiologica races of P. capsici in pepper*. *Euphytica* 162: 23-30.
- Goddijn, O.J.M., K. Lindsey, F.M. Van der Lee, L.C. Klap, and P.C. Sijmons. 1993. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harboring promoter-gusA fusion constructs. *Plant Journal* 4: 863-873.
- Godínez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, E. B. Sepúlveda-García, J. Lara-Reyna, R. Rojas-Martínez and E. Zavaleta-Mejía. 2008a. Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology* 120: 299-303.
- Godínez-Vidal, D. E. Zavaleta-Mejía, M. Rocha-Sosa, P. León-Mejía, R. I. Rojas-Martínez, y L. Guevara-Olvera. 2008b. Expression of *Hmg* genes in chilli CM-334 infected by *Nacobbus aberrans* and its relationship with the breakdown of resistance to *Phytophthora capsici*. *In: Memorias del X Congreso Internacional/XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*, A. C. Julio 20-24. Monterrey, Nuevo León, México. Resumen C-95.
- Goodman, R. N., and A.J. Novacky. 1994. The hypersensitive reaction in plants to pathogens. A Resistance Phenomenon. APS Press, The American Phytopathological Society St. Paul Minnesota, USA.
- Hernández, A. A. M., E. Zavaleta-Mejía y G. Carrillo. 1992. Efecto de *Nacobbus aberrans* (Thorne y Allen, 1944) en la infección de *Phytophthora capsici* Leo. en Chile. *Revista Mexicana de Fitopatología* 10: 166-174.
- Hausbeck, M. K., and K. H. Lamour. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Disease* 88: 1292-1303.

- Hohl, H.R. 1983. Nutrition of *Phytophthora*. Pp. 41-54. In: *Phytophthora*. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. D.C. Erwin, S. Bartniki-Garcia and P.H. Tsao (eds.). The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota.
- Hwang, B. K. 1995. Effects of age-related resistance and metalaxyl on capsidiol production in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. Pp. 503-523. In: Handbook of phytoalexins of metabolism and action. M. Daniel, and R. P. Purkayastha (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York, NY.
- Hwang, B. K., J. Y. Sunwoo, Y. J. Kim, and B. S. Kim. 1997. Accumulation of β -1, 3-glucanase and chitinase isoforms, and salicylic acid in the DL- β -amino-n-butyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51: 305-322.
- Jammes, F., P. Lecomte, J. de Almeida-Engler, F. Bitton, M. L. Martin-Magniette, J. P. Renou, P. Abad, and B. Favery. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. *The Plant Journal* 44: 447-458.
- Jones, M. G. K. 1981. Host cell responses to endoparasitic attack: structure and function of giant cells and syncytia. *Annals of Applied Biology* 97: 353-72.
- Jones, M. G. K., and H. L. Payne. 1977. The structure of syncytia induced by the phytoparasitic nematode *Nacobbus aberrans* in tomato roots, and the possible role of plasmodesmata in their nutrition. *Journal Cell Science* 23: 293-313
- Karczmarek, A., H. Overmars, J. H. Helder, and A. Goverse. 2004. Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and transient activation of a specific auxin-inducible promoter element. *Molecular Plant Pathology* 5: 343-346
- Kim, Y. J., B.K. Hwang and K. W. Park. 1989. Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Disease*. 73: 745-747
- Kuc, J. 1997. Molecular aspects of plant responses to pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* 19: 551-559.
- Lambert, K. N., K. D. Allen, and I. M. Sussex. 1999. Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Molecular Plant Microbe Interaction* 12: 328-336.
- Leonian, L. H. 1922. Stem and fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici* species. *Phytopathology* 12: 401-408.
- Lilley, C. J., W. L. Charlton, M. Bakhetia, and P. E. Urwin. 2008. The potential of RNA interference for the management of phytoparasitic nematodes. Pp. 185-203. In:

- Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes. A. Ciancio, and K. G. Mukerji (eds.). ©2008 Springer.
- Liu, X., Y. Zhou, and L. Li. 2008. Infection of *Phytophthora capsici* on pepper-Models and affecting factors. *Front. Agric. China* 2: 66-71.
- Lizzi, Y., J.P. Roggero, and P.J. Coulomb. 1995. Behavior of the phenolic compounds on *Capsicum annuum* leaves infected with *Phytophthora capsici*. *Journal Phytopathology* 143: 619-627.
- López, M. N. 2007. Actividad enzimática y fenoles solubles en chile (*Capsicum annuum* L.) "CM-334" durante la pérdida de resistencia a *Phytophthora capsici* inducida por *Nacobbus aberrans*. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados Montecillo, Edo. de México. 68 p.
- López-Martínez, N., y E. Zavaleta-Mejía. 2007. Respuestas de defensa en chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici* y *Nacobbus aberrans*. In: XXXIX Reunión anual. Organización de Nematólogos de los Trópicos Americanos (ONTA). 29 de octubre-2 de noviembre. Córdoba, Argentina. Resumen O6.
- Manzanilla-López, R. H., M. A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R.N. Inserra, P.S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R. M. Souza, y K.Evans. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, Distribution, Biology and management. *Nematropica* 32: 150-227.
- Mai, W. F., and G. S. Abawi. 1987. Interactions among root-knot nematodes and *Fusarium* wilt fungi on host plants. *Annual Review of Phytopathology* 25: 317–338.
- Marley, P. S., and R. J. Hillocks. 1993. The role of phytoalexins in resistance to *Fusarium* wilt in pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Plant Pathology* 42: 212–218.
- Marley, P. S., and R. J. Hillocks. 1994. Effect of root-knot nematodes on cajanol accumulation in the vascular tissues of pigeonpea after stem inoculation with *Fusarium udum*. *Plant Pathology* 43:172–176.
- Molot, P. M., P. Mas, M. Conus, H. Ferriere, and Ricci P. 1981. Relations between capsidiol concentration, speed of fungal invasion and level of induced resistance in cultivars of pepper (*Capsicum annuum*) susceptible or resistant to *Phytophthora capsici*. *Physiological Plant Pathology* 18: 379-389.
- Mozzetti, C., L. Ferraris, G. Tamietti and A. Matta. 1995. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*-pepper interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46: 95-107.

- Oelke, L. M., P. W. Bosland, and R. Steiner. 2003. Differentiation of race specific resistance to phytophthora root and foliar blight in *Capsicum annuum*. Journal of the American Society of Horticultural Sciences 128(2):213-218.
- Ortega, G. R., C. Palazón E., and J. Cuartero Z. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the Mexican pepper SCM-334. Plant Breeding 107: 50-55.
- Palloix, A. A. M. Daubeze, E. Pochard. 1988. Time sequences of root infection and resistance expression in an artificial inoculation method of pepper with *Phytophthora capsici*. Journal of Phytopathology 123:12-24.
- Palloix, A., and M. Kyle. 1995. Proposal revision of gene nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum* sp. *Capsicum* and Eggplant Newsletter 14: 26-29.
- Parra, G., and J. B. Ristaino. 2001. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing Phytophthora blight of bell pepper. Plant Disease 85:1069-1075.
- Pegard, A., G. Brizzard, A. Fazari, O. Soucaze, P. Abad, and Djian-Caporalino. 2005. Histological Characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. Nematology 95: 158-165.
- Pickersgill, B. 1997. Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. Euphytica 96: 129-133.
- Powell, N. T. 1971. Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. Annual Review of Phytopathology 9: 253-74.
- Redondo, E. J., y R. Rodríguez M. 1987. Mecanismos de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici*. Agrociencia 77: 123-137.
- Requena, M. E., C. Egea-Gilabert, and M. E. Candela. 2005. Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. Physiologia Plantarum 124: 50-60
- Ristaino, J. B., and S. B. Johnston. 1999. Ecologically based approaches to management of Phytophthora blight on bell pepper. Plant Disease 83: 1080-1089.
- Riou, M., I. Grasseau, E. Blesboi, and D. Kerboeuf. 2007. Relationships between sterol/phospholipid composition and xenobiotic transport in nematodes. Parasitology Research 100: 1125-1134.

- Sidhu, G., and J. M. Webster. 1977. Predisposition of tomato to the wilt fungus *Fusarium oxysporum* by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 23: 436–42.
- Sijmons, P. C., H. J. Atkinson, and U. Wyss. 1994. Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Annual Review of Phytopathology* 32: 235–259.
- Starks, C.M., K. Back, J. Chappell, and J. P. Noel. 1997 Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. *Science* 277: 1815–1820.
- Stoessl, A. C. H., Unwin, and E. W. B Ward. 1972. Postinfectious inhibitors from plants. I. Capsidiol, an antifungal compound from *Capsicum frutescens*. *Phytopathologische Zeitschrift* 74: 141–52.
- Sy, O., P. W. Bosland, and R. Steiner. 2005. Inheritance of phytophthora stem blight resistance as compared to phytophthora root rot and phytophthora foliar blight resistance in *Capsicum annum* L. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 130: 75-78.
- Takahashi, S., Y. Zhao, P. E. O'Maille, B. T. Greenhagen, J. P. Noel, R. M. Coates, and J. Chapell. 2005. Kinetic and molecular analysis of 5-epiaristolochene 1,3-dihydroxylase, a cytochrome P450 enzyme catalyzing successive hydroxylation of sesquiterpenes. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 3686–3696.
- Taller, J. 2006. Gene functioning in pepper. *Acta Agronomica Hungarica* 54: 233-269.
- Tyler, B. M. 2002. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annual Review of Phytopathology* 40: 137–167
- Trujillo-Viramontes, F., E. Zavaleta-Mejía, R. I. Rojas-Martínez, y J. Lara R. 2005. Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile. *Nematropica* 35: 37-44.
- Ueeda, M., M. Kubota, and K. Nishi. 2006. Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annum* cv. SCM334. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 149-154
- Uma-Maheswari, T., S. B. Sharma, D. D. R. Reddy, and M. P. Haware, 1995. Co-infection of wilt-resistant chickpeas by *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri* and *Meloidogyne javanica*. *Journal of Nematology* 27: 649–53.

- Üstün, A. S. 1995. Effects of the some elicitors on the capsidiol amount in the leaves of peppers (*Capsicum annuum* L.) having different sensitivities to root rot (*Phytophthora capsici*). *Turkisch Journal of Phytopathology* 24: 101-114.
- Vargas, E. M.T., E. Zavaleta-Mejía y A. M. Hernández A. 1996. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en chile serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26: 159-166.
- Vargas, E. M.T. 1998. Cambios inducidos por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen en la actividad de fenil-alanina-amonio-liasa (pal) en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) serrano CM-34 resistentes A *Phytophthora capsici* Leo. Tesis Maestría Colegio de Postgraduados Montecillo, Edo. de México. 41p.
- Vercauteren, I., E. V. D. Schueren, M. V. Montagu, and G. Gheysen. 2001. *Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematodes. *Molecular Plant Microbe Interaction* 14: 288-299.
- Vögeli, U., and J. Chappell. 1988. Induction of sesquiterpene cyclase and supression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiology* 72: 864- 869.
- Walker, S.J., and P. W. Bosland. 1999. Inheritance of *Phytophthora* root rot and foliar blight resistance in pepper. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 124: 14-18.
- Whalen, M. C. 2005. Host defense in a developmental context. *Molecular Plant Pathology* 6: 347-360.
- Williamson, V. M., and C. A. Gleason. 2003. Plant-nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 327-333.
- Zavaleta-Mejía, E. 2002. Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparasitos, una hipótesis. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 118-122.
- Zhao, Y. D.J. Schenk, S. Takahashi, J. Chappell, and R. M. Coates. 2004. Eremophilane Sesquiterpenes from Capsidiol. *Journal of Organical Chemistry*. 69: 7428-7435.

CAPITULO 2

RESPUESTA HIPERSENSITIVA DEL CHILE CM-334 RESISTENTE A *Phytophthora capsici* E INFECTADO CON *Nacobbus aberrans*

INTRODUCCIÓN

La marchitez inducida por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian, es una de las enfermedades más destructivas y que afecta la producción de chile (*Capsicum annuum* L.) en todo el mundo (Redondo y Rodríguez, 1987; Erwin y Ribeiro, 1996; Ristaino y Johnston, 1999). Una estrategia ambientalmente amigable para el manejo de esta enfermedad la constituye el uso de variedades resistentes. Sin embargo, se ha demostrado que la resistencia de algunos cultivos a ciertos hongos y oomicetos con origen en el suelo es frecuentemente inhibida cuando éstos son infectados previamente por nematodos agalladores tales como *Meloidogyne* spp y *Nacobbus* spp, presentes en diversas áreas productoras de chile en México. Materiales de chile resistentes a *P. capsici*, desarrollados por el Centro de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias del Bajío se han comportado como susceptibles cuando son infectados por *Nacobbus aberrans* (Hernández *et al.*, 1992; Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). El genotipo de chile tipo serrano Criollo de Morelos (CM-334) destaca por un alto grado de resistencia a *P. capsici*, misma que ha sido comprobada en diferentes partes del mundo aún cuando se ha inoculado con las cepas más patogénicas del oomiceto (Redondo y Rodríguez, 1987; Palloix *et al.*, 1988; Ortega *et al.*, 1991; Glosier *et al.*, 2008). La evidencia experimental obtenida por Sy y colaboradores (2005), sugiere que en CM-334 existen tres genes de resistencia *P. capsici* que de manera independiente gobiernan la resistencia en la raíz, el tallo y el follaje. Se considera que CM-334 también puede ser una excelente fuente de resistencia contra el tizón foliar inducido por este mismo patógeno (Oelke *et al.*, 2003).

Genotipos resistentes a *Phytophthora capsici* reaccionan de forma hipersensitiva (muerte celular programada) con el propósito de detener, aminorar y contrarrestar el desarrollo de una enfermedad. Sin embargo, tanto plantas resistentes como

susceptibles a enfermedades poseen mecanismos de defensa, y la incompatibilidad o compatibilidad patógeno-hospedante está determinada por la prontitud y la magnitud con la que ocurre la expresión de los genes responsables de la manifestación de los mecanismos de defensas y que restringen el desarrollo de un patógeno potencial (Kuc, 1997; Desender *et al.*, 2007). Los mecanismos involucrados en la resistencia al oomiceto comprenden diferentes metabolitos cuya síntesis se dispara durante la respuesta hipersensitiva, tal es el caso del capsidiol, la principal fitoalexina sesquiterpénica de *C. annuum* cuya acumulación en cantidades inhibitorias frecuentemente se relaciona con la resistencia. Se ha reportado que durante la interacción incompatible de *P. capsici* con CM-334, se incrementa la síntesis de esta fitoalexina en el sitio de infección; resultados similares han sido observados con otros materiales que de igual forma exhiben resistencia al oomiceto (Hwang, 1995; Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000). La capacidad de este metabolito para inhibir el crecimiento del oomiceto *in vitro* ha sido reportada por varios investigadores y se ha determinado que a una concentración de 3.5 mM tiene un efecto fungistático y fungicida en niveles superiores a 5 mM (Egea *et al.*, 1996a; Arreola-Cortés *et al.*, 2007). Recientemente, Ueeda y colaboradores (2006) encontraron que los mecanismos de resistencia al oomiceto se expresaron también en la parte aérea de plantas de chile CM-334 aún cuando macroscópicamente no se observó la típica reacción de hipersensibilidad; sin embargo, hubo muerte celular localizada a nivel microscópico en los sitios donde se depositó una suspensión de 10 000 zoosporas mL⁻¹; tal respuesta hipersensitiva se asoció con un incremento en los niveles de los ácidos jasmónico y salicílico.

A pesar del alto grado de resistencia a la marchitez mostrado por CM-334, se ha consignado que plantas previamente inoculadas con *N. aberrans* se vuelven susceptibles al oomiceto, es decir se rompe su resistencia (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005), probablemente debido a los cambios metabólicos y/o fisiológicos inducidos por el nematodo en la raíz de la planta hospedante (Zavaleta-Mejía, 2002; López-Martínez y Zavaleta-Mejía, 2007; Godínez-Vidal *et al.*, 2008a). Nuestro grupo de investigación ha demostrado que durante la interacción CM-334- *N. aberrans*-*P. capsici* la inhibición de la resistencia al oomiceto es más evidente a partir

de los 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo, tiempo que coincide con la aparición de hembras inmaduras de *N. aberrans* responsables de inducir los sitios especializados de alimentación en la raíz del hospedante (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Zavaleta-Mejía, 2002; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). También, de manera consistente se ha observado que las plantas CM-334 infectadas con *N. aberrans* presentan una reducción en la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), así como de peroxidasas (López-Martínez y Zavaleta-Mejía, 2007; Godínez-Vidal *et al.*, 2008a). PAL es una enzima reguladora en la ruta de los fenilpropanoides, la cual deriva en la síntesis de múltiples metabolitos secundarios tales como los fenoles, tanto de aquellos involucrados en la lignificación de tejidos infectados, como los que poseen actividad antimicrobiana. Así mismo, el incremento en la actividad de PAL se asocia de manera consistente con la respuesta de hipersensibilidad, la cual se presenta en genotipos de chile resistentes a *P. capsici*, incluyendo a CM-334 (Candela *et al.*, 1995; Fernández-Pavía, 1997; García-Pérez *et al.*, 1998; Gayoso *et al.*, 2004).

Hasta ahora en nuestro grupo los estudios se han enfocado a conocer los cambios inducidos por *N. aberrans* en la expresión de genes y cambios bioquímico-fisiológicos, asociados con los mecanismos de defensa en la raíz (Vargas, 1998; López-Martínez y Zavaleta-Mejía, 2007; Godínez-Vidal *et al.*, 2008a). Sin embargo, también es de interés conocer la repercusión de la reprogramación génica inducida por el nematodo en la raíz en la expresión de los mecanismos de defensa en la parte aérea del chile CM-334. Con base en estos antecedentes en la presente investigación se probaron las siguientes hipótesis: 1) “Plantas de chile CM-334 infectadas con *N. aberrans* no responden hipersensitivamente a otros patógenos inoculados en el follaje; 2) Plantas de CM-334 infectadas con *N. aberrans* presentan una baja acumulación de capsidiol en la parte aérea cuando son inoculadas foliarmente con *P. capsici* o *P. syringae* pv *tagetis*”. Bajo este contexto los objetivos planteados fueron conocer: 1) si plantas de chile CM-334 inoculadas con *N. aberrans* responden hipersensitivamente a las inoculaciones foliares con *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* y *P. capsici*; y 2) si la acumulación de capsidiol se reduce en plantas infectadas por *N. aberrans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y producción de inóculo

Plántulas de chile. Semillas de chile “tipo serrano” CM-334 resistente a *P. capsici*, se desinfestaron con hipoclorito de sodio comercial al 1 % por 1 min, se enjuagaron secaron y colocaron en cajas Petri sobre toallas de papel humedecidas con agua destilada estéril y se mantuvieron a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$. Las plántulas se transplantaron en macetas conteniendo 150 cc de arena estéril como sustrato (una plántula por maceta). Los riegos se realizaron cada 48 h, aplicando una solución nutritiva [(630 g de Nitrofoska 12-12-12 en 20 L de agua estéril; dilución 1:10 (Nitrofoska:agua)] y agua estéril de forma alterna. Las macetas se mantuvieron en cámaras bioclimáticas a temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 de oscuridad y una intensidad luminosa de 6768 lux (luz fluorescente). También se incluyeron plantas de chile var. J. E. Parker susceptibles al oomiceto como referencia de la patogenicidad de *P. capsici* y de la eficacia de la inoculación.

Preparación de inóculo e inoculación con *N. aberrans*. De raíces de jitomate agalladas por *N. aberrans*, se extrajeron masas de huevos, las cuales se incubaron a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ en cajas Petri con agua destilada estéril conteniendo el fungicida Captan^{MR} y el antibiótico Cloranfenicol^{MR} al 0.1%. Una vez que eclosionaron lo juveniles (J_2), se cuantificó el número de larvas por mL. La inoculación se realizó cuando la mayoría de las plantas presentaron entre cuatro y cinco hojas verdaderas, aplicando una suspensión de 2000 J_2 por planta en la base del tallo.

Producción de inóculo de *P. capsici* y *P. syringae* pv. *tagetis*, e inoculación. La cepa 6143 de *P. capsici* proporcionada por la Dra. Fernández-Pavía se cultivó en cajas Petri conteniendo medio V8 (jugo V8; CaCO_3 4 g; agar 16 g; en 1000 mL de agua destilada). En el centro de cada caja se colocó un disco de 0.5 cm de diámetro con medio de cultivo conteniendo micelio del oomiceto. Las cajas se incubaron en oscuridad a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ y una vez que el micelio cubrió la superficie del medio, el

contenido de la caja se fragmentó en cuatro porciones, cada porción se trató con una solución isotónica de Cloruro de Sodio al 0.9% (Abbott^{MR}) por 10 min, y posteriormente cada fragmento se transfirió a una caja Petri conteniendo 20 mL de agua destilada estéril. Las cajas se mantuvieron bajo luz fluorescente a temperatura ambiente por 48 h. Para inducir la liberación de las zoosporas, las cajas se expusieron a -20 °C durante 15 min y luego 20 min a temperatura ambiente. Se cuantificó el número de zoosporas por mililitro de agua utilizando un hematocitómetro (Marienfeld®) y la densidad de inóculo se ajustó a 10^5 zoosporas mL⁻¹.

Una cepa de *P. syringae* pv. *tagetis* proporcionada por el Dr. Leopoldo Fucikovsky Zak (Profesor del Colegio de Postgraduados) se transfirió a cajas Petri conteniendo medio B de King (20 g de proteosa peptona, 1.5 g de K₂HPO₄, 1.5 g de MgSO₄ · 7H₂O, 15 mL de glicerol y 15 g de agar; en 1000 mL de agua destilada) (Schaad *et al*, 2001). Estas se incubaron a 28±1°C por 48 h, al cabo de las cuales se preparó una suspensión bacteriana (Klement *et al*, 1990) que se ajustó a 10^8 ufc mL⁻¹ mediante espectrofotometría (Perkin Elmer®) a una longitud de onda de 380 nm.

La inoculación foliar de las plantas con uno u otro patógeno se realizó a los 21 días después de haber inoculado al nematodo. La suspensión de zoosporas del oomiceto (10^5 zoosporas mL⁻¹) se asperjó sobre la parte aérea de las plantas o se infiltró en el envés de cinco a seis hojas cercanas al ápice de cada planta, con una jeringa hipodérmica desprovista de aguja; en este último caso cada planta recibió una carga de inóculo de 300 000 zoosporas. Con el fin de evitar el contacto del inóculo con el sustrato, la parte superior de las macetas se cubrió con un plástico. La suspensión de células bacterianas (10^8 ufc mL⁻¹) se infiltró en el envés de cinco hojas cercanas al ápice de cada planta.

Las plantas inoculadas se sometieron a una humedad relativa de 75±1% durante 12 h para favorecer la infección y se mantuvieron en una cámara bioclimática en las condiciones anteriormente descritas.

Experimento 1

En un primer experimento, se evaluaron ocho tratamientos: 1) CM-334 con *N. aberrans* y *P. syringae* (R+N+Ps), 2) CM-334 sólo con *P. syringae* (R+Ps), 3) CM334 sólo infiltrado con agua destilada estéril (R s/N s/Ps), 4) CM-334 con *N. aberrans* y *P. capsici* asperjado (R+N+Oa), 5) CM-334 sólo con *P. capsici* asperjado (R+Oa), 6) CM-334 sin nematodo ni oomiceto (R s/N s/O), 7) Susceptible sólo con *P. capsici* asperjado (S+Oa), y 8) Susceptible sólo con *P. syringae* (S+Ps). En seis plantas de los tratamientos R+N+Ps, R+Ps, R s/N s/Ps, y S+Ps se realizaron observaciones durante 7 días para darle seguimiento a la aparición de los síntomas típicos de la reacción de hipersensibilidad inducidos por la bacteria. Además, para determinar el contenido de capsidiol, de cada tratamiento con CM-334 inoculado con el oomiceto o la bacteria se establecieron otras 20 plantas y a los 3 y 6 días posteriores a la inoculación con el patógeno se tomaron 10 plantas por tiempo de cada tratamiento. Se separó el follaje de las plantas y se mezcló formando una muestra compuesta por tratamiento, la cual se congeló con Nitrógeno (N₂) líquido y se almacenó a -80° C.

Experimento 2

En otro ensayo se evaluaron los siguientes tratamientos: 1) CM-334 con *N. aberrans* y *P. capsici* infiltrado (R+N+Oi), 2) CM334 sólo con *P. capsici* infiltrado (R+Oi), 3) CM-334 sólo infiltrado con agua destilada estéril (R s/N s/O), y 4) Susceptible infiltrado con *P. capsici* y sin nematodo (S+Oi). Los tratamientos que involucraron al material resistente CM-334 constaron de seis plantas y aquellos correspondientes a plantas susceptibles constaron sólo de tres. Se realizaron observaciones durante 30 días para darle seguimiento a la aparición de los síntomas de tizón foliar o de la reacción de hipersensibilidad inducidos por el oomiceto.

Extracción, determinación y cuantificación del contenido de capsidiol

Obtención del estándar. Con la finalidad de contar con capsidiol para ser utilizado como estándar, primeramente se llevó a cabo la extracción del compuesto siguiendo la metodología descrita por Zhao y colaboradores (2004), con algunas modificaciones. Se utilizaron 50 frutos de chile poblano adquiridos del mercado local, a los cuales se les hicieron dos aberturas en la parte cercana al pedúnculo con la ayuda de una aguja estéril, por las que se infiltró una solución de celulasa (*Trichoderma viride*) (Sigma-Aldrich^{MR}) a una concentración de 1.1 mg L^{-1} de agua desionizada; los frutos tratados se incubaron por 72 h a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, se separó la solución acuosa, filtrándola a través de una manta de cielo. Por cada 250 mL de solución acuosa se efectuaron tres extracciones de CH_2Cl_2 (60 mL por extracción). Al final de este proceso, el extracto de CH_2Cl_2 se secó con Na_2SO_4 anhidro, filtrando y evaporándolo a sequedad en un rotavapor modelo Büchi RE111[®]; obteniendo 327.7 mg de una pasta aceitosa color café oscuro; la cual se preabsorbió en CH_2Cl_2 adicionando 500 mg de silica gel 60 (70-230 mesh ASTM) se agitó y evaporó el disolvente hasta la completa preabsorción.

El extracto preabsorbido fue aplicado a una columna de vidrio empacada con 10 gramos de silica gel 60, eluyendo inicialmente con hexano y posteriormente eluciones sucesivas con mezclas de hexano:acetato de etilo en orden creciente de polaridad; el seguimiento de la columna se realizó empleando placas analíticas de silica gel 60 F₂₅₄ (Merck[®]) como absorbente las cuales se desarrollaron con hexano:acetato de etilo (1:6) las fracciones eluidas en la columna con hexano:acetato de etilo (3:2) revelaron la presencia de una mancha de color azul-grisáceo al asperjar las cromatoplasmas con una solución de Sulfato Cérico amoniacal 2N en H_2SO_4 . La identidad del compuesto obtenido fue corroborada por su punto de fusión, y por análisis de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C a 500 y 125 MHz, respectivamente, en un espectrómetro Bruker DMX 500 en una solución de CDCl_3 .

Determinación del contenido de capsidiol en plantas CM-334. La extracción del capsidiol de las muestras de follaje de los tratamientos R+N+Ps, R+Ps, R s/N s/Ps, R+N+Oa, R+Oa, y R s/N s/O, se realizó siguiendo la metodología descrita por Egea y colaboradores (1996b), con algunas modificaciones. Se hicieron tres extracciones por cada tratamiento a partir de 1 g de tejido por extracción. El tejido se maceró utilizando una mezcla de disolventes CH₂Cl₂:MeOH (2:1) en un mortero conteniendo N₂ líquido. Cada extracto se filtró y evaporó a sequedad a temperatura ambiente, redisolviéndolos posteriormente con CH₂Cl₂ para el subsecuente análisis por cromatografía en capa fina la cual se desarrolló con una mezcla de hexano:acetato de etilo (1:6). Para cada tratamiento, las muestras fueron cromatografiadas en banda y eluidas conjuntamente con una muestra de capsidiol puro. Se recortó la porción correspondiente al estándar y se reveló con sulfato cérico amoniacal 2N en H₂SO₄ y se confrontó físicamente con la porción eluida y no revelada de cada tratamiento, las regiones correspondientes al factor de retención (R_f=0.28) característico del capsidiol se rasparon y posteriormente se lavaron con CH₂Cl₂, filtraron y evaporaron a sequedad.

Detección y cuantificación de capsidiol. Las determinaciones del contenido de capsidiol se realizaron siguiendo la metodología descrita por Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria (1996) con algunas modificaciones. Así, las muestras se redisolviéron en metanol, preparándose una mezcla de reacción en la proporción 1:1, extracto: vainillina al 2% en ácido sulfúrico. Las muestras tratadas se incubaron por una hora a temperatura ambiente y se cuantificaron por espectrofotometría (Nanodrop®) a una longitud de onda de 640 nm, utilizando una curva de calibración previamente elaborada con capsidiol puro (Anexo 2).

Los resultados obtenidos de concentración de capsidiol ($\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido) se sometieron a un Análisis de varianza (ANOVA) y a un análisis de comparación de medias con el método de Tukey ($P \leq 0.05$), mediante el programa computacional SAS para Windows 6.12 (SAS Institute, 1997).

RESULTADOS

Respuesta hipersensitiva de chile CM-334 a *P. syringae* pv. *tagetis*

En las plantas de la variedad J. E. Parker susceptible a *P. capsici*, la respuesta de hipersensibilidad a *P. syringae* pv. *tagetis* se desarrolló muy lentamente y comenzó a ser evidente hasta las 24 h posteriores a la inoculación con la bacteria; lo opuesto se observó en las plantas resistentes. El 100 % de las plantas CM-334 inoculadas foliarmente con con la bacteria en presencia o ausencia de *N. aberrans* exhibieron la reacción de hipersensibilidad; sin embargo, entre tratamientos se observaron diferencias importantes con respecto al tiempo en que empezaron a aparecer los síntomas típicos de la respuesta hipersensitiva. En plantas que sólo fueron inoculadas con la bacteria (R+Ps) la reacción comenzó a evidenciarse a las 5 h post-inoculación, observándose pequeñas manchas de color verde pálido en el sitio de infiltración; en contraste, en las plantas inoculadas con el nematodo e infiltradas con la bacteria (R+N+Ps) tales síntomas se empezaron a detectar hasta las 7 h post-inoculación, (Figura 2 a y b). En las plantas resistentes infiltradas solamente con agua (R s/N s/Ps), no se desarrolló ningún síntoma foliar (Figura 2 c).

El síntoma de “deshidratación” típico de la reacción de hipersensibilidad fue clara en CM-334 sin el nematodo (R+Ps) a las 7 h post-inoculación, mientras que en las inoculadas con *N. aberrans* (R+N+Ps), fué hasta después de las 10 h en que tal síntoma se hizo evidente. A las 24 h post-inoculación ya no se observaron diferencias en la respuesta disparada en las plantas de ambos tratamientos (Figura 2 d y e). Después de 10 días, en las plantas de los dos tratamientos las hojas infiltradas con la bacteria mostraron flacidez y se fueron colapsando paulatinamente; pero la abscisión de hojas inoculadas fue más rápida en ausencia del nematodo (R+Ps) que en su presencia (R+N+Ps).

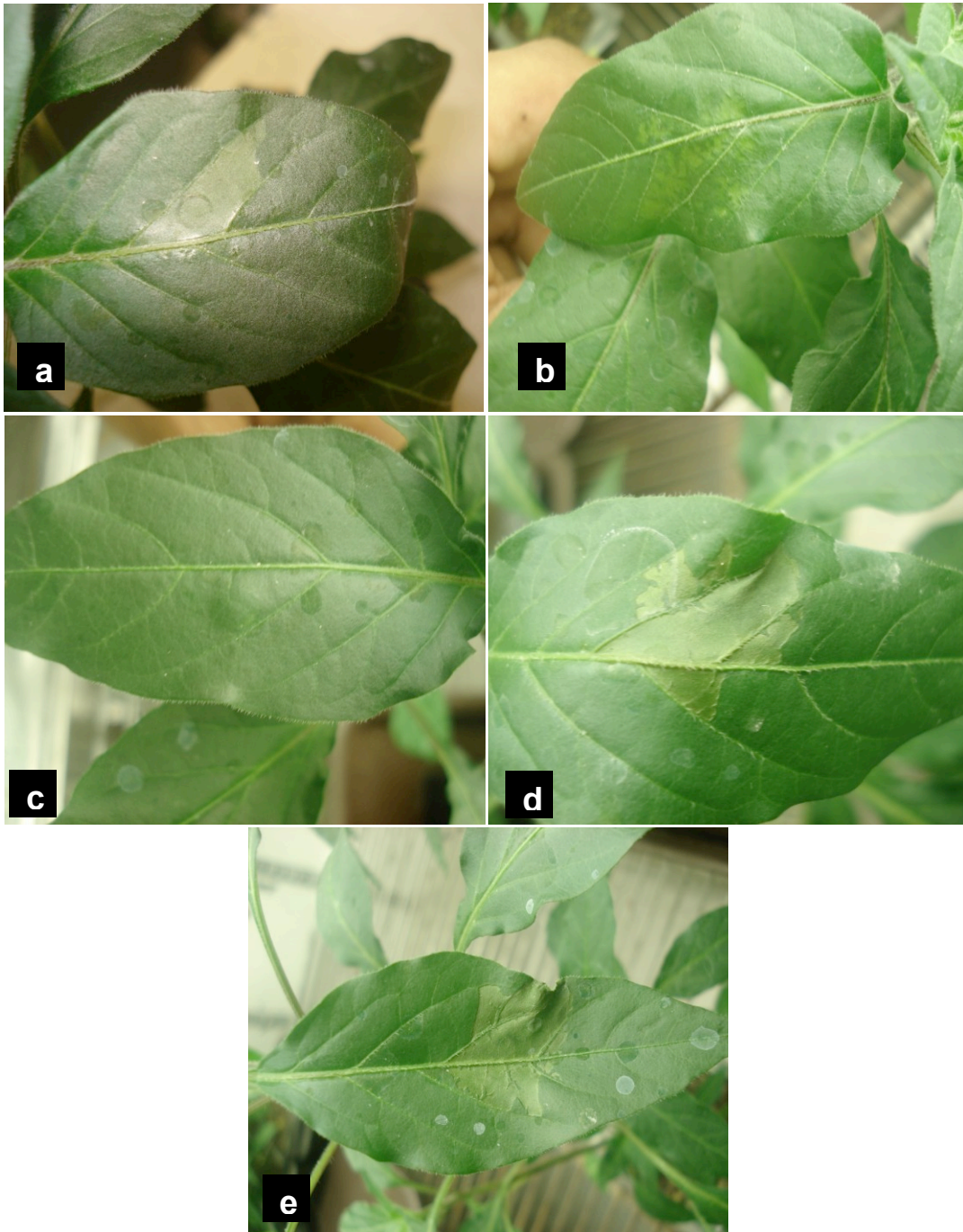


Figura 2. Respuesta hipersensitiva en hojas de chile resistente CM-334 (R) inoculadas con *P. syringae* pv. *tagetis* (Ps): (a) inoculada sólo con la bacteria (R+Ps) y (b) con ambos patógenos (R+N+Ps) a las 7 h post-inoculación, nótese la deshidratación del tejido en (a) mientras que en (b) sólo se aprecia un área clorótica; (c) infiltrada sólo con agua destilada estéril (R s/N s/Ps), (d) inoculada sólo con la bacteria (R+Ps) y (e) con la bacteria y el nematodo (R+N+Ps) a las 24 h post-inoculación. N= *N. aberrans*.

Respuesta hipersensitiva de chile CM-334 a *P. capsici*

En el segundo experimento, las plantas de CM-334 cuyas hojas fueron inoculadas por infiltración (R+Oi y R+N+Oi) exhibieron la reacción de hipersensibilidad (Figura 3); fue evidente que el desarrollo del síntoma se dio con mayor rapidez en las plantas sin nematodo, de manera similar como ocurrió con la inoculación con la bacteria; así, en las plantas que no fueron previamente inoculadas con el nematodo dicha reacción comenzó a ser evidente alrededor de las 12 h post inoculación con el oomiceto, en contraste con aquellas que involucraban al nematodo donde la respuesta se presentó horas más tarde; sin embargo, a las 24 h posteriores a la inoculación las respuestas en ambos tratamientos se tornaron similares (Figura 3 c y d). En cambio, las plantas J. E. Parker susceptibles a *P. capsici* comenzaron a exhibir síntomas de marchitez a las 24 h posteriores a la inoculación con el oomiceto (Figura 4), y al cabo de 10 días el 100% de ellas perecieron. La mayoría de las hojas infiltradas en plantas de ambos tratamientos (R+N+Oi y R+Oi) se fueron colapsando paulatinamente y finalmente se desprendieron de la planta; sin embargo, la abscisión fue mucho más rápida en plantas que no fueron inoculadas con el nematodo. Ninguna de las plantas de ambos tratamientos desarrolló el síntoma típico de tizón foliar inducido por el oomiceto, durante el periodo de 30 días de observación.

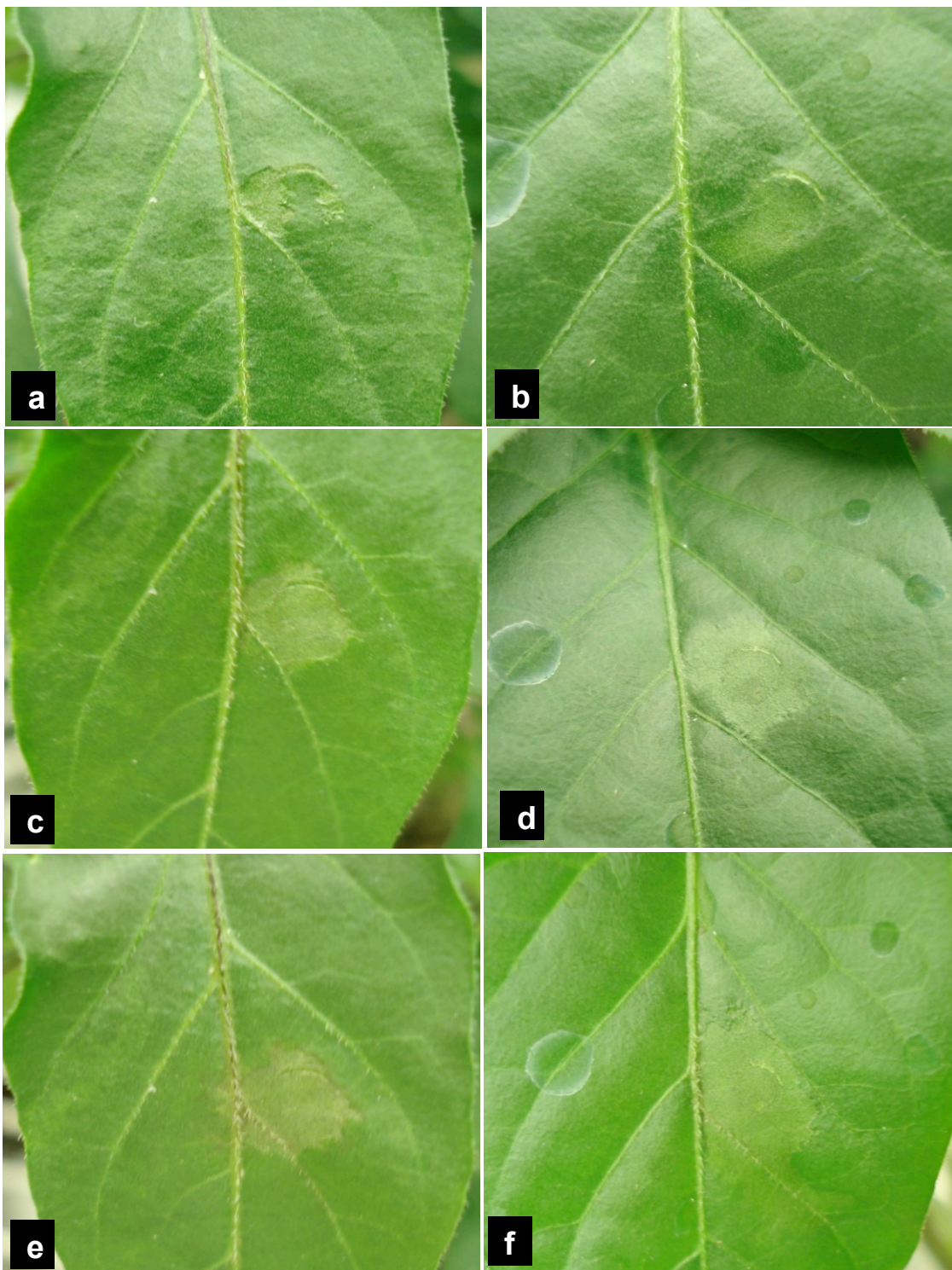


Figura 3. Respuesta hipersensitiva en hojas de chile resistente CM-334 (R) inoculadas por infiltración con zoosporas de *P. capsici* (O): (a) inoculada sólo con el oomiceto (R+Oi, y (b) con ambos patógenos (R+N+Oi) a las 16 h post-inoculación, nótese la deshidratación del tejido en (a) mientras que en (b) sólo se aprecia un área clorótica; (c) R+Oi y (d) R+N+Oi a las 24 h post-inoculación; y (e) R+Oi y (f) R+N+Oi, a las 48 h post-inoculación. N= *N. aberrans*.

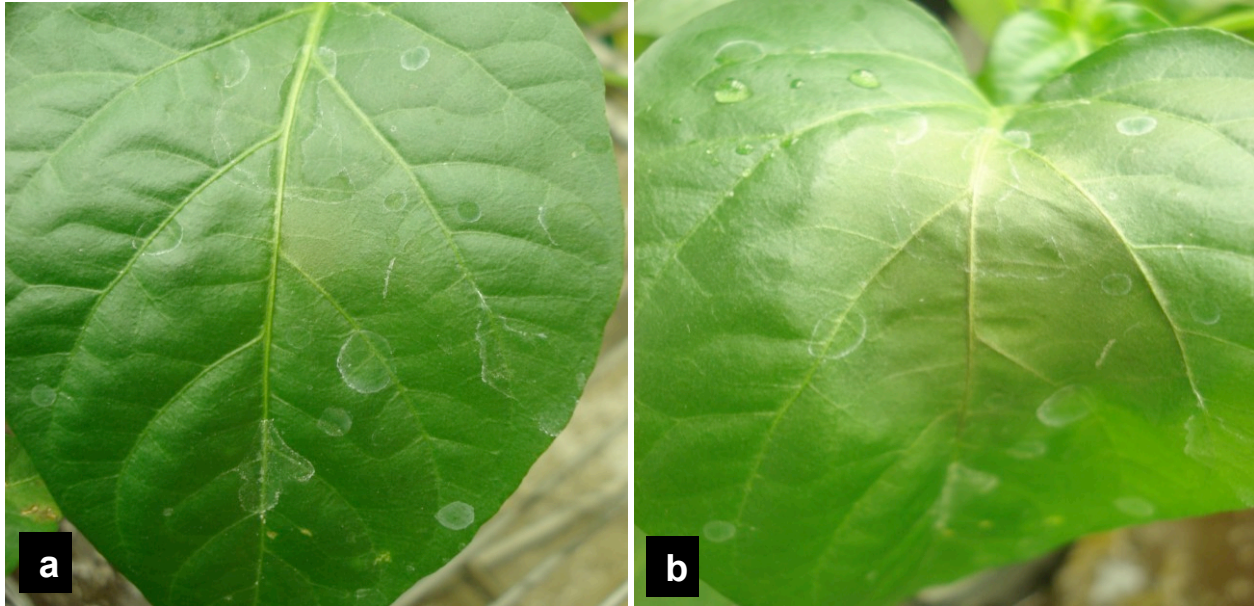


Figura 4. Síntomas en hojas de chile J. E. Parker susceptible a *P. capsici* a las 24 (a) y 48 h (b) postinoculación con el oomiceto.

Contenido de capsidiol en plantas de CM-334 inoculadas con *P. capsici* y con *P. syringae* pv. *tagetis*

El revelado con sulfato cérico amoniacal 2N en H_2SO_4 de cromatoplasmas obtenidas a partir del extracto proveniente de frutos de chile tratados con celulosa, indicó la presencia de una banda que presentó un R_f de 0.28; además, el compuesto purificado en forma de polvo blanco cristalino (106.4 mg) presentó un punto de fusión de 149-152° C. Ambos valores corresponden a los reportados en la literatura para el capsidiol (Zhao *et al.*, 2004). Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogeno 1 (^1H) y Carbono 13 (^{13}C) coincidieron con los reportados en la literatura antes mencionada; permitiendo así confirmar la identidad de este metabolito (Figuras 5 y 6).

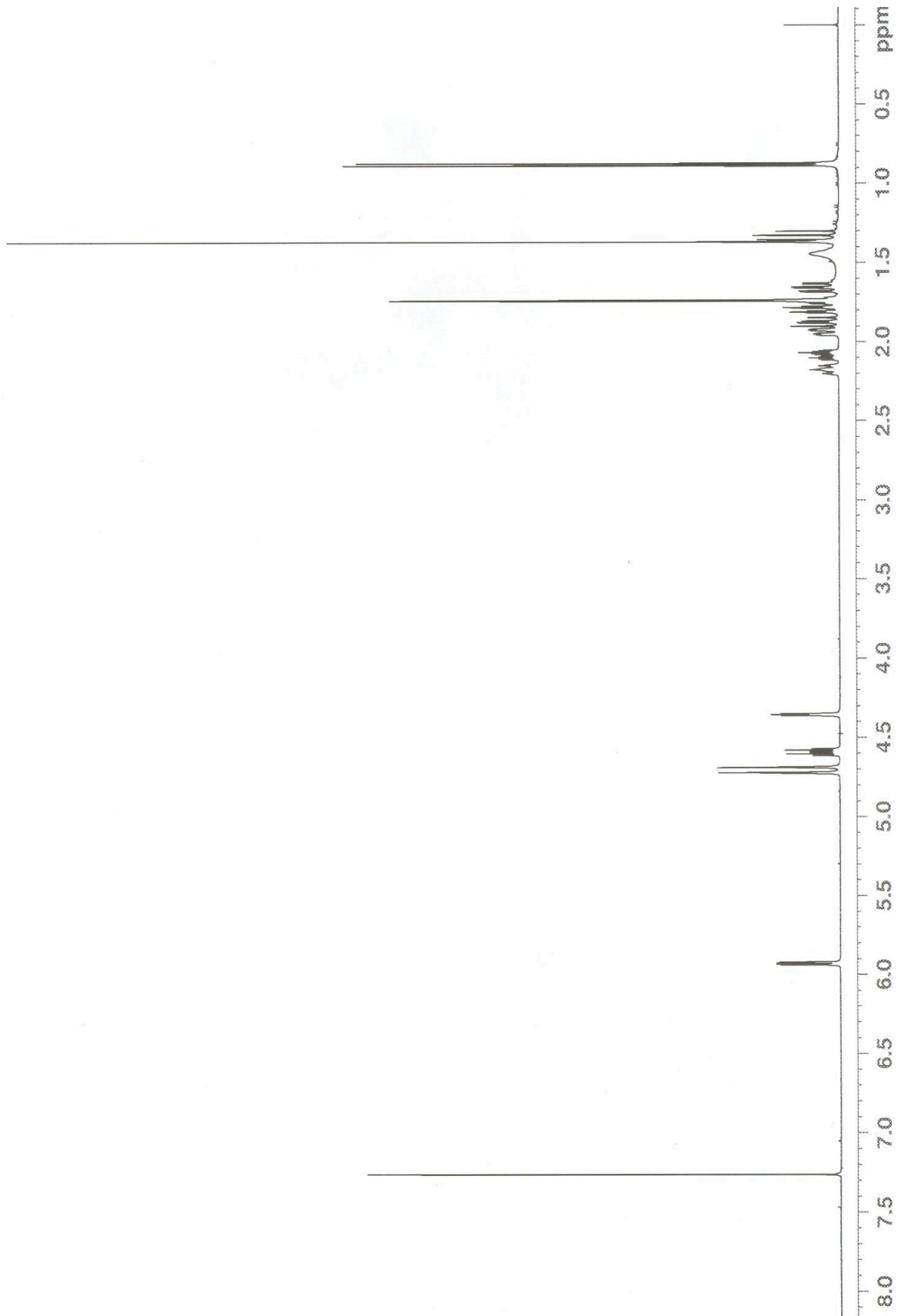


Figura 5. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno-1 del capsidiol

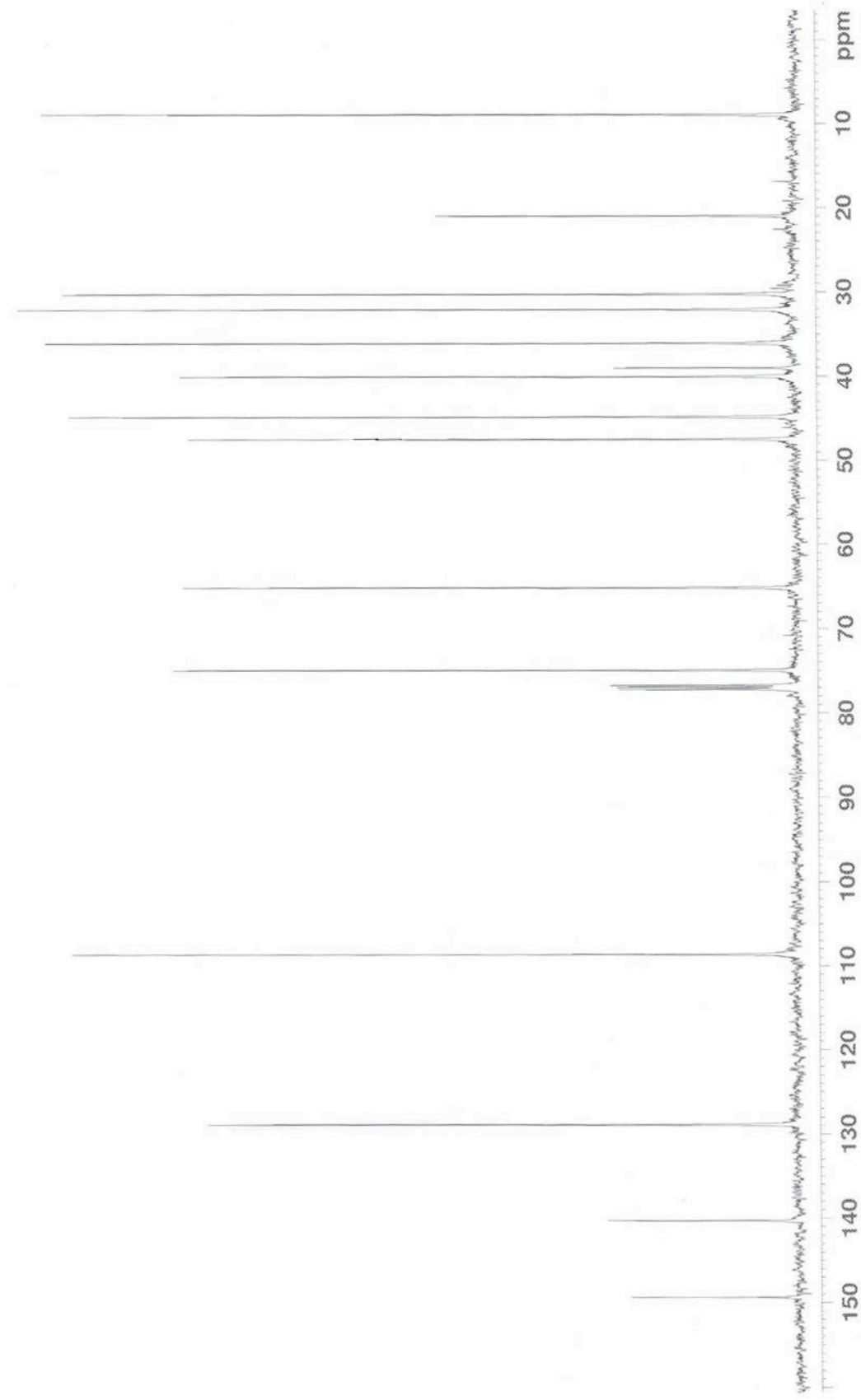


Figura 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 del capsidiol

La concentración del capsidiol fue generalmente de 94 a 280 % mayor en plantas asperjadas con zoosporas del oomiceto en comparación con las infiltradas con la bacteria; asimismo, altos niveles de capsidiol se mantuvieron hasta el sexto día después de la inoculación con *P. capsici*, mientras que la acumulación bajó drásticamente en hojas infiltradas con *P. syringae*. A los 3 días posteriores a la inoculación con uno u otro patógeno, en las plantas que habían sido previamente inoculadas con el nematodo hubo consistentemente una menor acumulación del capsidiol en comparación con aquellas sin nematodo ($P \leq 0.05$).

A los 3 y 6 días post inoculación con el oomiceto se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el contenido de capsidiol entre tratamientos (Figura 7A). En los dos tiempos de evaluación la menor acumulación de la fitoalexina ocurrió en plantas testigo (29.17 y 31.16 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido a los 3 y 6 dpi, respectivamente) en comparación con aquellas inoculadas con el oomiceto (R+Oa y R+N+Oa). Fue también evidente que al tercer día la acumulación de la fitoalexina fue menor en aquellas plantas previamente inoculadas con el nematodo. En el sexto día, los tratamientos R+Oa y R+N+Oa fueron estadísticamente similares entre ellos pero diferentes con respecto al testigo ($P \leq 0.05$) (Figura 7A) y los niveles de fitoalexina acumulada fueron parecidos a los encontrados en el primer tiempo de evaluación.

En las plantas infiltradas con la bacteria, se detectaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el contenido de capsidiol entre los tres tratamientos a los 3 dpi pero no a los 6 dpi cuando el nivel acumulado disminuyó alrededor de 37 % y fue similar en todos los tratamientos (Figura 7 B). Al tercer día, la acumulación fue significativamente menor (20.03 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido) en aquellas plantas previamente inoculadas con el nematodo (R+N+Ps) en comparación con R+Ps (53.89 $\mu\text{g g}^{-1}$ de tejido); asimismo, las plantas testigo infiltradas solamente con agua acumularon el doble de la fitoalexina en comparación con las del tratamiento con bacteria y nematodo (R+N+Ps). Al sexto día la acumulación de capsidiol fue estadísticamente igual en todos los tratamientos.

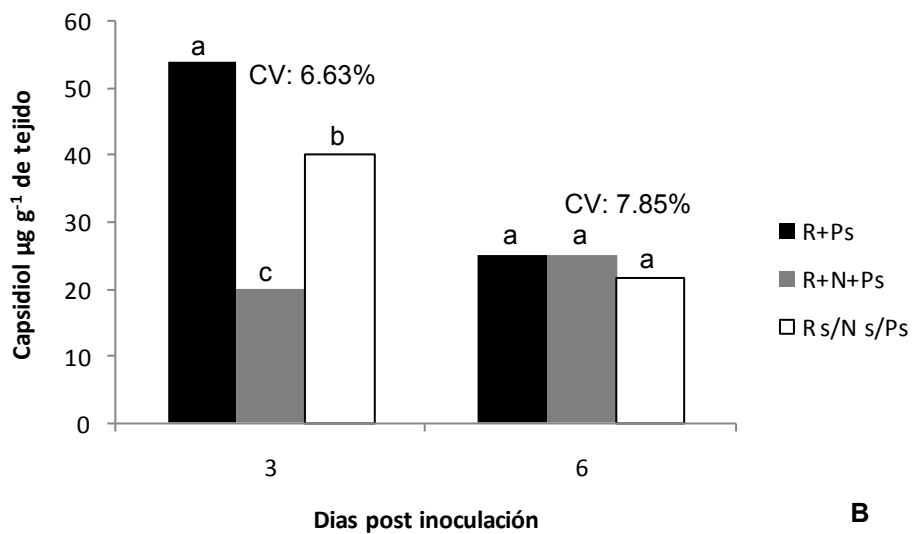
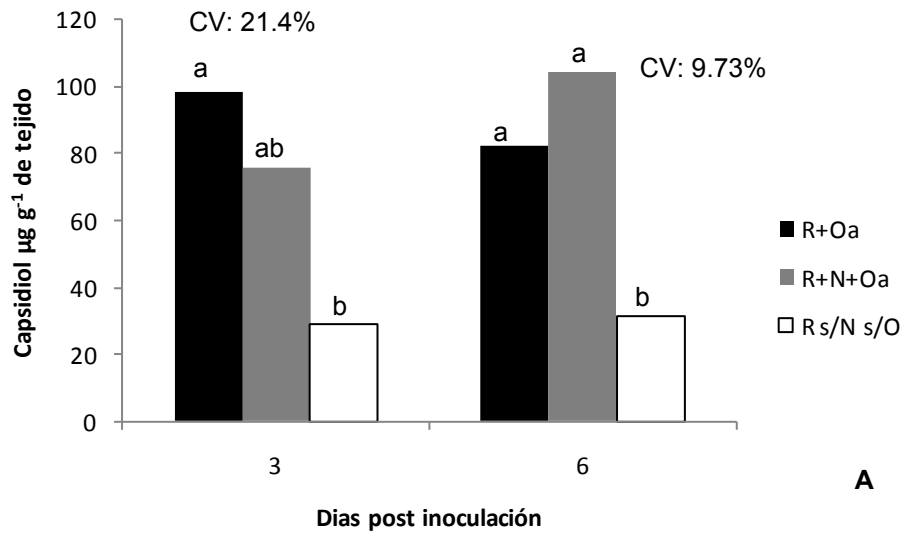


Figura 7. Concentración de capsidiol en chile resistente CM-334 (R): A) Hojas asperjadas con zoosporas de *P. capsici* (O): inoculadas solo con el oomiceto (R+Oa), con ambos patógenos (R+N+Oa), y sin nematodo ni oomiceto (R s/N s/O); B) Hojas infiltradas con *P. syringae* pv. *tagetis* (Ps): inoculadas solo con la bacteria (R+Ps), con ambos patógenos (R+N+Ps), e infiltradas solo con agua destilada estéril (R s/N s/Ps). A los 3 y 6 días post inoculación. N= *N. aberrans*.

DISCUSIÓN

CM-334 es altamente resistente a *P. capsici*; a *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* (Ortega *et al.*, 1991; Djian-Caporalino *et al.*, 1999; Pegard *et al.*, 2005; Ueeda *et al.*, 2006); y a los virus Y de la papa (PVY) y del moteado del chile (PeMV) (Arnedo *et al.*, 2006; Palloix y Kyle, 1995). La resistencia a dichos patógenos se ha asociado con una respuesta hipersensitiva dada por el hospedante. En el presente estudio la rápida respuesta observada a las 5 h post-inoculación con la bacteria *P. syringae* pv. *tagetis* utilizada como elicitador, indica que CM-334 posee defensas bioquímicas eficientes, que de acuerdo con lo reportado podrían incluir: incrementos en la acumulación de la fitoalexina sesquiterpénica “capsidiol” y en la actividad de las enzimas PAL y peroxidasa acídica, cambios cuantitativos y cualitativos de fenoles con propiedades fungitóxicas (Fernández-Pavía, 1997; Fernández-Pavía y Liddell, 1997; Candela *et al.*, 2000), y producción de óxido nítrico que actúa como molécula señal conjuntamente con las fitohormonas ácidos jasmónico y salicílico, implicados en las respuestas de defensa a nivel sistémico (Requena *et al.*, 2005; Ueeda *et al.*, 2006). La activación temprana de estas estrategias podría imposibilitar el establecimiento exitoso del patógeno en CM-334, en comparación con la lentitud de la respuesta (24 h post-inoculación) observada en las plantas J. E. Parker susceptibles a *P. capsici*. Existe suficiente evidencia experimental que demuestra que tanto las plantas resistentes como las susceptibles a enfermedades poseen mecanismos de defensa, y que la incompatibilidad o compatibilidad patógeno-hospedante está determinada por la velocidad y la magnitud con la que ocurre la expresión de los genes responsables de la manifestación de dichas defensas que restringen el desarrollo de un patógeno potencial (Kuc, 1997; Whalen, 2005; Desender *et al.*, 2007).

En hojas de CM-334 infiltradas con una suspensión de 100 000 zoosporas mL⁻¹ se observó una respuesta hipersensitiva, tanto en las plantas inoculadas como en las no inoculadas previamente con el nematodo; sin embargo, fue evidente que el desarrollo del síntoma se dio con mayor rapidez en las plantas sin nematodo, de manera similar como ocurrió con la inoculación con la bacteria. Tanto las plantas inoculadas

solamente por infiltración con *P. capsici*, como aquellas inoculadas con los dos patógenos no desarrollaron los síntomas de tizón inducidos por las infecciones foliares por el oomiceto; esto sugiere que la infección de las raíces por *N. aberrans* no modificó la resistencia de CM-334 al oomiceto en el follaje, aún cuando el nematodo retrasó las respuestas de defensa de la planta. Sy y colaboradores (2005), con base en evidencias experimentales, sugieren que en CM-334 existen tres genes de resistencia a *P. capsici*, que de manera independiente gobiernan la resistencia en la raíz, el tallo y el follaje.

La defensa hipersensitiva es un eficiente mecanismo de resistencia que frecuentemente se dispara en una interacción planta-patógeno incompatible, la cual tiene lugar durante las primeras 72 horas en que se da el reconocimiento (Goodman y Novacky, 1994). Así, en suspensiones de células, tratadas con elicitores de *P. capsici*, de tres cultivares de Chile con diferente grado de susceptibilidad: Yolo Wonder susceptible, Americano parcialmente resistente y Smith-5 muy resistente, la reacción hipersensitiva fue más rápida e intensa en Smith-5 en comparación con los otros dos genotipos (García-Pérez *et al.*, 1998).

En interacciones compatibles nematodo agallador-hospedante, el patógeno induce una reprogramación de la expresión génica de células de la planta que se constituyen en el sitio especializado de alimentación (células gigantes o sincitio), que provee al nematodo de los metabolitos necesarios para completar su ciclo de vida (Williamson y Gleason, 2003). En esta interacción se ha observado que el contenido de fenoles solubles totales, y del ácido clorogénico en particular, se redujo con respecto a plantas no inoculadas con el nematodo (López, 2007); lo opuesto fue reportado en la interacción incompatible *Meloidogyne* spp-CM334 (Pegard *et al.*, 2005). Similarmente, plantas CM-334 inoculadas con *N. aberrans* en combinación con *P. capsici*, mostraron una reducción en la actividad de las enzimas PAL y peroxidasas (Vargas, 1998; López-Martínez y Zavaleta-Mejía, 2007; Godínez-Vidal *et al.*, 2008a). Todo lo anterior indica que en presencia del nematodo los mecanismos de defensa de CM-334 son reducidos, lo cual favorece el establecimiento del oomiceto en la raíz, rompiéndose así la resistencia. Los resultados de la presente investigación indican que la infección de raíces por *N. aberrans* también retrasó la expresión de los mecanismos de defensa en

el estrato aéreo de la planta, pero tal retardo aparentemente no fue suficiente para crear un ambiente favorable que permitiera el establecimiento exitoso de *P. capsici* en el follaje.

El capsidiol es la principal fitoalexina de plantas de Chile y la rapidez de su acumulación en cantidades inhibitorias en tejidos infectados por *P. capsici*, está estrechamente relacionada con la resistencia al oomiceto; tal asociación ha sido demostrada en varios genotipos de Chile incluyendo a CM-334 (Molot *et al.*, 1981; Egea *et al.*, 1996a; García-Pérez *et al.*, 1998; Hwang, 1995). La mayor acumulación del capsidiol asociada a la respuesta de hipersensibilidad en plantas inoculadas solo con *P. capsici* (R+O) al tercer día post inoculación, contrastó con la menor acumulación observada en la interacción compleja *N. aberrans*-CM-334-*P. capsici*; tal resultado sugiere que los cambios metabólicos y fisiológicos inducidos en la raíz por este nematodo, reducen la velocidad de respuesta en la acumulación de esta fitoalexina en el estrato aéreo. En hojas de CM-334 infiltradas con *P. syringae* pv. *tagetis*, bacteria no patógena a Chile, también se encontró que la respuesta hipersensitiva, estuvo asociada con un incremento en la acumulación de capsidiol; sin embargo, la cantidad acumulada fue menor en comparación con *P. capsici*, asimismo los niveles de acumulación bajaron considerablemente al sexto día, mientras que en las plantas infiltradas con el oomiceto se mantuvieron concentraciones similares a las registradas a los 3 días post-inoculación. Resultados similares fueron reportados por Üstün y colaboradores (1996), quienes encontraron mayores concentraciones de capsidiol en frutos de Chile inoculados con *P. capsici* en comparación con aquellas obtenidas cuando se inocularon con *P. syringae* pv. *tomato* y otras bacterias no patógenas para Chile.

La influencia de la infección por nematodos en la reducción de metabolitos antimicrobianos como fitoalexinas (Marley y Hillocks, 1994) y fenoles (López-Martínez y Zavaleta-Mejía *et al.*, 2007), ha sido documentada. Por ejemplo Marley y Hillocks (1994) encontraron que la pérdida de resistencia a *Fusarium udum* en el cultivar ICP 9145 de *Cajanus cajan* inducida por *Meloidogyne incognita* y *M. javanica*, se asoció con un decremento en la acumulación de la fitoalexina cajanol, principal metabolito

responsable de la resistencia. También Godínez-Vidal y colaboradores (2008b), encontraron que durante la interacción compatible *N. aberrans*-CM-334 existe un decremento en la acumulación de transcritos del gen *hmg2* (implicados en la biosíntesis de capsidiol), miembro de la familia multigénica de *hmg* (*hmg1*, *hmg2*, *hmg3*), que codifica para la enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa, clave en la ruta de isoprenoides (Chapell, 1995; Ha *et al.*, 2003). Lo anterior permite especular que la represión del gen *hmg2* puede estar relacionada con la reducción en la acumulación del capsidiol en las plantas CM-334 infectadas por *N. aberrans*.

CONCLUSIONES

- 1) La infección de CM-334 por el nematodo agallador *N. aberrans* no inhibió la respuesta de hipersensibilidad en la parte aérea de la planta, pero sí causó un retraso importante en su expresión, ya que en ausencia del nematodo el inicio de la respuesta se observó a las 5 h y la típica respuesta de hipersensibilidad se expresó a las 7 h posteriores a la inoculación con la bacteria, mientras que en presencia de *N. aberrans* a este último tiempo, apenas se apreció una clorosis incipiente.
- 2) A pesar de que el nematodo retrasó la expresión de la defensa en la planta, tal retraso no fue suficiente para permitir el establecimiento exitoso de *P. capsici* en el follaje.
- 3) La infección por el nematodo *N. aberrans* redujo la acumulación de capsidiol en plantas de Chile CM-334 resistentes a *P. capsici*.

LITERATURA CITADA

- Arnedo, A. M. S., M. L. Arteaga, and R. G. Ortega. 2006. New inheritance studies related to *Potato Virus Y* (PVY) resistance in *Capsicum annuum* L. "Serrano Criollo de Morelos-334". *Euphytica* 151: 95-101.
- Arreola-Cortés, A., E. L. Soriano-Bello, E. Lozoya-Gloria, A. Barriga-Guzmán, and E. García-Pineda. 2007. The effect of acetylation of capsidiol phytoalexin on fungitoxic activity. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 40: 69-73.
- Candela, M. E., M.D. Alcázar, A. Espin, C. Egea and L. Almela. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44: 116-123.
- Candela, M.E., C. Egea, M. D. García-Pérez, J. Costa, and M. Candela. 2000. Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Horticulturae* 522: 79-86.
- Chappell, J. 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annual Review Plant Physiology Molecular Biology* 46: 521–547
- Chávez-Moctezuma, M.P., and E. Lozoya-Gloria. 1996. Biosynthesis of the sesquiterpenic phytoalexin capsidiol in elicited root cultures of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Reports* 15: 360-366.
- Desender, S., D. Andrivon, and F.Val. 2007. Activation of defense reactions in *Solanaceae*: where is the specificity?. *Cellular Microbiology* 9: 21-30.
- Djian-Caporalino, C., L. Pijarowski, A. Januel, V. Lefebvre, A. Daubèze, A. Palloix, A. Dalmasso, and P. Abad. 1999. Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 99: 496-506.
- Egea, C. M. D. Alcazar y M. E. Candela. 1996a. Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 98: 737-742.
- Egea, C., M.D. García P., and M.E. Candela. 1996b. Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *J of Plant Physiol.* 149: 762-764.
- Erwin, D. C., and O. K. Ribeiro.1996. *Phytophthora diseases worldwide*. American Phytopathological Society, APS Press. Saint Paul, MN. Pp: 262-268

- Fernandez-Pavía, S. 1997. Host-Pathogen interactions in the root rot *Phytophthora capsici* / *Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph. D. Dissertation. New Mexico State University. 109 p.
- Fernandez-Pavía, S., and C.M. Liddell. 1997. Resistance of *Capsicum annuum* CM-334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. *Phytopathology* 87: 529.
- García- Pérez, M. D., C. Egea y M. E. Candela. 1998. Defense response of pepper (*Capsicum annuum*) suspension cells to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 103: 527-533.
- Gayoso, C. F. Pomar, F. Merino and M.A. Bernal. 2004. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae* 102: 1-13.
- Glosier, B. R., E.A. Ogundiwin, G. S. Sidhu, D. R. Sischo, J. P. Prince. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiologica races of P. capsici* in pepper. *Euphytica* 162: 23-30.
- Godínez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, E. B. Sepúlveda-García, J. Lara-Reyna, R. Rojas-Martínez and E. Zavaleta-Mejía. 2008a. Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology* 120:299-303.
- Godínez-Vidal, D. E. Zavaleta-Mejía, M. Rocha-Sosa, P. León-Mejía, R. I. Rojas-Martínez, y L. Guevara-Olvera. 2008b. Expression of *Hmg* genes in chilli CM-334 infected by *Nacobbus aberrans* and its relationship with the breakdown of resistance to *Phytophthora capsici*. In: *Memorias del X Congreso Internacional/XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*, A. C. Julio 20-24. Monterrey, Nuevo León, México. Resumen C-95.
- Goodman, R. N., and A.J. Novacky. 1994. The hypersensitive reaction in plants to pathogens. A Resistance Phenomenon. APS Press, The American Phytopathological Society St. Paul Minnesota, USA.
- Ha, S. H., J. B. Kim, Y. S. Hwang, and S. W. Lee. 2002. Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced *Hmg2* from pepper (*Capsicum annuum*). *BBA-Gene Structure and Expression* 1625:253–260.
- Hernández, A. A. M., E. Zavaleta-Mejía y G. Carrillo. 1992. Efecto de *Nacobbus aberrans* (Thorne y Allen, 1944) en la infección de *Phytophthora capsici* Leo. en Chile. *Revista Mexicana de Fitopatología* 10: 166-174.
- Hwang, B. K. 1995. Effects of age-related resistance and metalaxyl on capsidiol production in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*. Pp. 503-523. In:

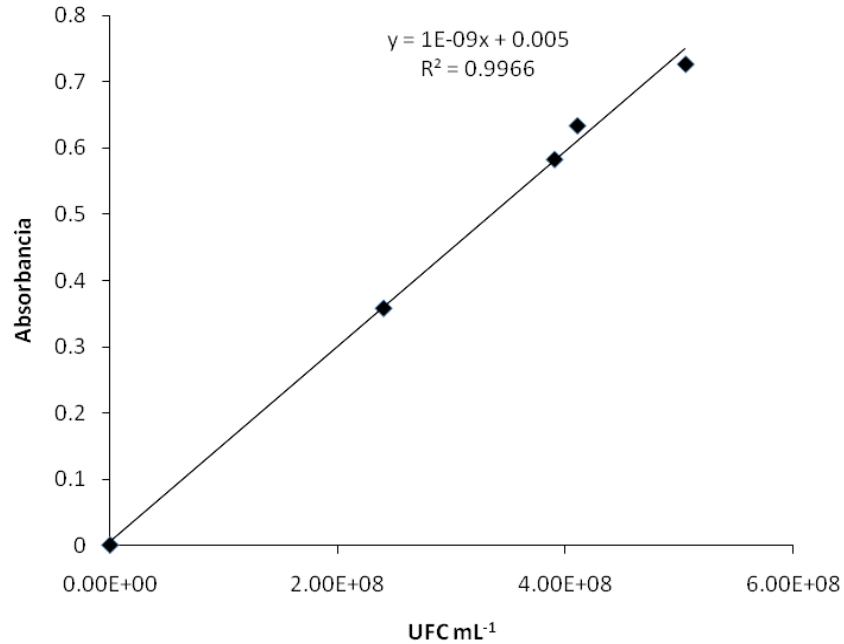
- Handbook of phytoalexins of metabolism and action. M. Daniel, and R. P. Purkayastha (eds.). Marcel Dekker, Inc. New York, NY.
- Klement, Z. K. Rudolph K., and D.C. Sands. 1990. Methods in phyto bacteriology. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Kuc, J. 1997. Molecular aspects of plant responses to pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* 19: 551-559.
- López, M. N. 2007. Actividad enzimática y fenoles solubles en chile (*Capsicum annum* L.) "CM-334" durante la pérdida de resistencia a *Phytophthora capsici* inducida por *Nacobbus aberrans*. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados Montecillo, Edo. de México. 68 p.
- López-Martínez, N., y E. Zavaleta-Mejía. 2007. Respuestas de defensa en chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici* y *Nacobbus aberrans*. In: XXXIX Reunión anual. Organización de Nematólogos de los Trópicos Americanos (ONTA). 29 de octubre-2 de noviembre. Córdoba, Argentina. Resumen O6.
- Manzanilla-López, R. H., M. A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R.N. Inserra, P.S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R. M. Souza, y K.Evans. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, Distribution, Biology and management. *Nematropica* 32: 150-227.
- Marley, P. S., and R. J. Hillocks. 1994. Effect of root-knot nematodes on cajanol accumulation in the vascular tissues of pigeonpea after stem inoculation with *Fusarium udum*. *Plant Pathology* 43:172–176.
- Oelke, L. M., P. W. Bosland, and R. Steiner. 2003. Differentiation of race specific resistance to phytophthora root and foliar blight in *Capsicum annum*. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 128(2):213-218.
- Ortega, G. R., C. Palazón E., and J. Cuartero Z. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the Mexican pepper SCM-334. *Plant Breeding* 107: 50-55.
- Palloix, A. A. M. Daubeze, E. Pochard. 1988. Time sequences of root infection and resistance expression in an artificial inoculation method of pepper with *Phytophthora capsici*. *Journal of Phytopathology* 123:12–24.
- Palloix, A., and M. Kyle. 1995. Proposal revision of gene nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum* sp. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 14: 26-29.
- Pegard, A., G. Brizzard, A. Fazari, O. Soucaze, P. Abad, and Djian-Caporalino. 2005. Histological Characterization of resistance to different root-knot nematode

- species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Nematology* 95: 158-165.
- Redondo, E. J., y R. Rodríguez M. 1987. Mecanismos de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 77: 123-137.
- Requena, M. E., C. Egea-Gilabert, and M. E. Candela. 2005. Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiologia Plantarum* 124: 50-60
- Ristaino, J. B., and S. B. Johnston. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Disease* 83: 1080-1089.
- SAS Institute. 1997. User's guide. SAS STAT software for windows release 6.12. SAS Institute, Cary, N. C. USA.
- Schaad, N. W., J.B. Jones, and W. Chun (eds). 2001. *Plant Pathogenic Bacteria*. Third Edition, APS Press. St. Paul Minnesota. 373 p.
- Sy, O., P. W. Bosland, and R. Steiner. 2005. Inheritance of phytophthora stem blight resistance as compared to phytophthora root rot and phytophthora foliar blight resistance in *Capsicum annuum* L. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 130: 75-78.
- Trujillo-Viramontes, F., E. Zavaleta-Mejía, R. I. Rojas-Martínez, y J. Lara R. 2005. Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile. *Nematropica* 35: 37-44.
- Ueeda, M., M. Kubota, and K. Nishi. 2006. Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 149-154
- Üstün, A.S., C. Çökmüş, and S. C. Saçılık. 1996. Accumulation of capsidiol in the pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) inoculated with some biotic elicitors. *Türkisch Journal of Agriculture and Forestry* 20: 431-438.
- Vargas, E. M.T., E. Zavaleta-Mejía y A. M. Hernández A. 1996. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en Chile serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26: 159-166.
- Vargas, E. M.T. 1998. Cambios inducidos por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen en la actividad de fenil-alanina-amonio-liasa (PAL) en plantas de Chile (*Capsicum*

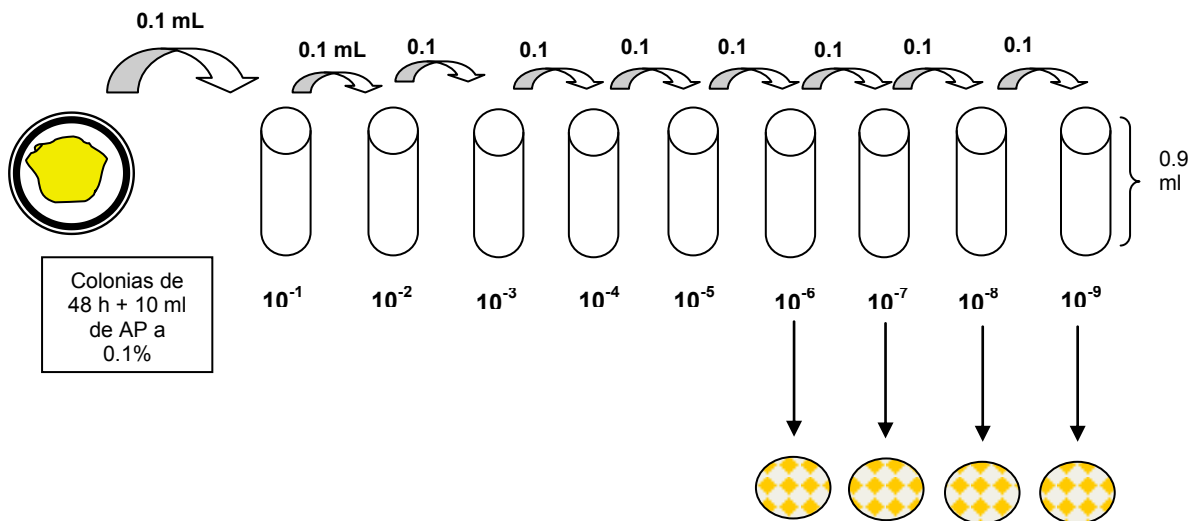
- annuum* L.) serrano CM-34 resistentes A *Phytophthora capsici* Leo. Tesis Maestría Colegio de Postgraduados Montecillo, Edo. de México. 41p.
- Whalen, M. C. 2005. Host defense in a developmental context. *Molecular Plant Pathology* 6: 347-360.
- Williamson, V. M., and C. A. Gleason. 2003. Plant-nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 327-333.
- Zavaleta-Mejía, E. 2002. Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparasitos, una hipótesis. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 118-122.
- Zhao, Y. D.J. Schenk, S. Takahashi, J. Chappell, and R. M. Coates. 2004. Eremophilane Sesquiterpenes from Capsidiol. *Journal of Organical Chemistry*. 69: 7428-7435.

ANEXOS

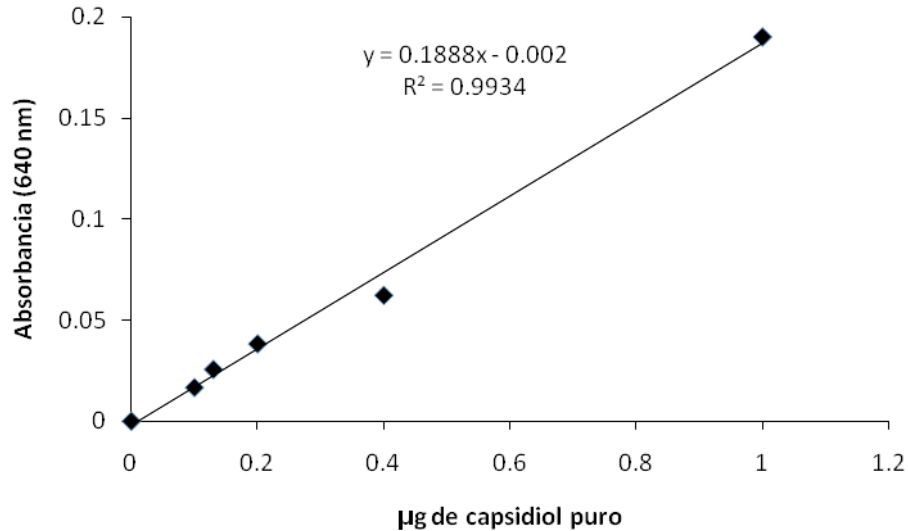
1. Curva de calibración para la determinación del No. de Unidades Formadoras de Colonias de *P. syringae* pv. *tagetis*



Se sembró una colonia de 48 h de crecimiento y después de un periodo similar de incubación a 28°C, se adicionaron 10 mL de agua peptonada (AP) a 0.1% para suspender las células bacterianas, esparciendo con una varilla de vidrio. De esta suspensión se tomó 0.1 mL para realizar diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁹. De las suspensiones 10⁻⁶ a 10⁻⁹ se tomaron 0.1 mL y se sembraron por separado en cajas Petri con B de King. Después de 24 h a 28°C, se registró el número de UFC de aquellas cajas con números entre 30 y 300 colonias.



2. Curva de calibración para la determinación del contenido de capsidiol en Chile CM-334



- Se utilizó una concentración conocida de capsidiol ($10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) disuelta en metanol (Solución madre).
- A partir de la solución madre se prepararon diluciones en serie, en tubos Eppendorf: 1:10, 1:25, 1:50, 1:75, 1:100.
- Se preparó una mezcla de reacción consistente en dilución :vainillina 2% + H_2SO_4 (1:1).
- Los tubos se vortexearon e incubaron por 1 hora; y transcurrido este tiempo las soluciones exhibieron diferentes tonalidades de color verde turquesa y se realizaron lecturas en un espectrofotómetro Nanodrop® a una longitud de onda de 640 nm,
- La curva estándar resultante se utilizó para la cuantificación de la fitoalexina en las muestras.