



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

GENES DE DEFENSA, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CONTENIDO DE
CAPSIDIOL EN CHILE CM-334 RESISTENTE A *Phytophthora capsici* E

INFECTADO POR *Nacobbus aberrans*

ERNESTO FERNÁNDEZ HERRERA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2011

La presente tesis, titulada: **GENES DE DEFENSA, ACTIVIDAD ENZIMATICA Y CONTENIDO DE CAPSIDIOL EN CHILE CM-344 RESISTENTE A *Phytophthora capsici* E INFECTADO POR *Nacobbus aberrans*** realizada por el alumno: **Ernesto Fernández Herrera**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: _____

DRA. EMMA ZA VALETA MEJÍA

ASESORA: _____

DRA. REYNA ISABEL ROJAS MARTÍNEZ

ASESORA: _____

DRA. MARÍA ESTHER RIVAS DÁVILA

ASESORA: _____

DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR: _____

DR. LORENZO GUEVARA OLVERA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero de 2011

**GENES DE DEFENSA, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CONTENIDO DE
CAPSIDIOL EN CHILE CM-344 RESISTENTE A *Phytophthora capsici* E
INFECTADO POR *Nacobbus aberrans***

Ernesto Fernández Herrera, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

Se determinó la acumulación de transcritos de los genes *POX*, *GLU*, *PR-1* (responsables de codificar para peroxidasas, β -1,3-glucanasas y proteína PR-1, respectivamente) y *EAS* (5-epiaristológeno sintasa, involucrada en la biosíntesis de capsidiol), la actividad de β -1,3-glucanasas, peroxidasas, y el contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*, *P. capsici* y ambos patógenos. Plantas de CM-334 se inocularon con 300, 000 zoosporas de *P. capsici* y/o 2000 J₂ del nematodo. A las 6, 12, 24 y 48 h posteriores a la inoculación (hpi) con el oomiceto se analizó por PCR en tiempo real la acumulación de transcritos de los genes mencionados y se determinó la actividad de las enzimas β -1,3-glucanasas y peroxidasas, y el contenido de capsidiol. En general, la inoculación de chile CM-334 con *P. capsici* incrementó significativamente la acumulación de los genes *POX*, *GLU* y *PR-1* desde las 6 hpi y los mayores incrementos se registraron a las 48 hpi. *EAS* alcanzó sus máximas acumulaciones a las 6 y 12 hpi. También, la actividad de glucanasas y peroxidasas, y el contenido de capsidiol se incrementó significativamente ($P \leq 0.05$) en raíces inoculadas con *P. capsici* en comparación con las no inoculadas. En la interacción CM-334-*Na-Pc* la expresión de *EAS* fue tardía en comparación con las plantas inoculadas sólo con el oomiceto. La inoculación de CM-334 con *N. aberrans* registró niveles bajos de transcritos de *EAS* y de los genes PRs, lo cual contrastó significativamente con la acumulación en la interacción CM-334-*P. capsici*. La actividad de β -1,3-glucanasas y peroxidasas y el contenido de capsidiol en plantas de CM-334 inoculadas con *N. aberrans* fue baja con respecto a las inoculadas con *P. capsici* o ambos patógenos, donde la actividad fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) a las 12, 24 y 48 hpi.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, *Nacobbus aberrans*, *Phytophthora capsici*, capsidiol, genes *EAS*, *GLU*, *POX* y *PR-1*, proteínas relacionadas con patogénesis.

**DEFENSE GENES, ENZIMATIC ACTIVITY AND CONTENT OF CAPSIDIOL IN
CHILLI CM-334 RESISTANT TO *Phytophthora capsici* AND INOCULATED WITH
*Nacobbus aberrans***

Ernesto Fernández Herrera, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

Transcripts accumulation of the genes *POX*, *GLU*, *PR-1* (responsible to codify for peroxidase, β -1,3-glucanase and protein PR-1, respectively) and *EAS* (5-*epi*-aristolocheno synthase, involved in capsidiol biosynthesis), β -1,3-glucanase and peroxidase activity, and the content of capsidiol in roots of chilli CM-334 infected by *N. aberrans*, *P. capsici* and both pathogens were determinate. Plants of CM-334 were inoculated with 300, 000 zoosporas of *P. capsici* and/or 2,000 J₂ of the nematode. At 6, 12, 24 and 48 h after the inoculation (hai) with the oomycete the accumulation of the mentioned genes were analyzed by real time PCR, and the activity of β -1,3-glucanase and peroxidase and the content of capsidiol were determinate. Generally, the inoculation of chilli CM-334 with *P. capsici* significantly increased the accumulation of *POX*, *GLU* and *PR-1* genes from the 6 hpi and the higher increases were registered at 48 hai. *EAS* transcripts were higher at 6 and 12 hai. Also, the activity of glucanase and peroxidase, and the content of capsidiol was increased significantly ($P \leq 0.05$) in roots inoculated with *P. capsici* as compare to those non-inoculated. In the interaction CM-334-*Na-Pc* the *EAS* expression was delayed in comparison with the plants inoculated only with the oomycete. The inoculation of CM-334 with *N. aberrans* registered low levels of *EAS*, as well as of the PRs genes, which contrasted significantly with gene transcripts accumulation in the interaction CM-334-*P. capsici*. The activity of β -1,3-glucanase and peroxidase, and the content of capsidiol in plants of CM-334 inoculated with *N. aberrans* was low with respect to those inoculated with *P. capsici* or both pathogens, where the activity was significantly greater ($P \leq 0.05$) at 12, 24 and 48 hai.

Palabras clave: *Capsicum annum*, *Nacobbus aberrans*, *Phytophthora capsici*, capsidiol, *EAS*, *GLU*, *POX* y *PR-1*, pathogenesis-related proteins.

DEDICATORIA

Con todo el cariño, respeto y admiración:

A mis padres:

Estela Herrera y Ernesto Fernández

A mis hermanos:

Benito, Viviana, Blanca, Isidro y Jesús

A ti Nadia: por estar conmigo en los
buenos y malos momentos de la vida

Por ser fuente constante de apoyo, amistad
y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

Al **pueblo de México**, que a través de su **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) hicieron posible la obtención del presente grado académico.

Al **Colegio de Postgraduados**, especialmente al **Programa de Fitosanidad** por brindarme la oportunidad de continuar con mi preparación profesional.

A la **Dra. Emma Zavaleta Mejía**, quien como consejera, demostró ser una fuente constante de apoyo durante mi formación académica, así como en la realización, culminación y publicación de la presente investigación.

A la **Dra. Reyna I. Rojas Martínez**, por el apoyo, sugerencias y su amplia disposición para la realización del presente trabajo.

A la **Dra. María Esther Rivas Dávila, Dr. Lorenzo Guevara Olvera y Dra. Ernestina Valadez Moctezuma** por su apoyo y disposición en la realización del presente trabajo.

A la **Dra. Olga Gómez Rodríguez** por el apoyo brindado durante el establecimiento de los experimentos del presente trabajo.

A los **profesores del Programa en Fitopatología** por compartir sus conocimientos, tiempo y experiencia para mi formación académica.

A mis **compañeros del Laboratorio 209 (Diana, Edgar, Damaris, Jose María, Antonio, Abimael, Lupita, Moises, Yolanda, Ruth, Alba, Noe)** por los buenos y agradables momentos compartidos. A todas las personas que no he nombrado, pero que de una u otra forma contribuyeron en mi formación y en la elaboración del presente trabajo.

NOTA

El presente trabajo fue realizado como parte del proyecto de investigación 46331-Z, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN GENERAL	<i>iii</i>
GENERAL SUMMARY	<i>iv</i>
INDICE DE CUADROS	<i>x</i>
INDICE DE FIGURAS	<i>xi</i>
CAPÍTULO I	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVO	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
Mecanismos de defensa estructurales y bioquímicos en plantas.....	5
Mecanismos de defensa en variedades de chile resistentes a <i>P. capsici</i>	5
Resistencia de CM-334 a <i>P. capsici</i>	6
Rompimiento de resistencia a <i>P. capsici</i> en chile CM-334.....	7
<i>Phytophthora capsici</i> Leo.....	9
<i>Nacobbus aberrans</i> (Thorne y Allen).....	10
Síntesis de isoprenoides en plantas.....	12
Esteroles y sesquiterpenoides (capsidiol) en las plantas.....	12
Proteínas relacionadas con patogénesis (PRs).....	15
Clasificación de PRs.....	16
Proteínas PR-1.....	18
Proteínas PR-2 (β -1,3-glucanasas).....	18
Proteínas PR-9 (peroxidasas).....	20
IV. LITERATURA CITADA	21

CAPITULO II. GENES DE DEFENSA, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CONTENIDO DE CAPSIDIOL EN CHILE CM-334 INOCULADO CON <i>Phytophthora capsici</i>	33
RESUMEN	33
INTRODUCCIÓN	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Establecimiento de los experimentos.....	35
Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real.....	36
Extracción de proteína y actividad enzimática de peroxidasas.....	38
Extracción de proteína y actividad enzimática de glucanasas.....	38
Extracción y cuantificación de capsidiol.....	38
Análisis estadístico.....	39
RESULTADOS	39
Niveles relativos de genes relacionados con la defensa.....	39
Actividad enzimática.....	40
Contenido de capsidiol.....	42
DISCUSIÓN	42
LITERATURA CITADA	45
CAPÍTULO III. GENES DE DEFENSA, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CONTENIDO DE CAPSIDIOL EN CHILE CM-334 RESISTENTE A <i>Phytophthora capsici</i> E INFECTADO POR <i>Nacobbus aberrans</i>	50
RESUMEN	50
INTRODUCCIÓN	51
MATERIALES Y MÉTODOS	53
Establecimiento de los experimentos.....	53
Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real.....	54
Extracción de proteína y actividad enzimática de peroxidasas.....	56

Extracción de proteína y actividad enzimática de β -1,3-glucanasa.....	56
Extracción y cuantificación de capsidiol.....	56
Análisis estadístico.....	57
RESULTADOS	57
Niveles relativos de genes relacionados con la defensa.....	57
Actividad enzimática.....	59
Contenido de capsidiol.....	61
DISCUSIÓN	61
LITERATURA CITADA	66

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO I

Pág.

Cuadro 1. Familias de proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) detectadas en plantas de interés agrícola.	17
---	----

CAPÍTULO II

Cuadro 1. Oligonucleótidos usados para analizar la acumulación de algunos genes relacionados con la defensa en plantas de CM-334 inoculadas con <i>P. capsici</i> .	37
---	----

CAPÍTULO III

Cuadro 1. Oligonucleótidos usados para analizar la acumulación de algunos genes relacionados con la defensa en plantas de CM-334 inoculadas con <i>N. aberrans</i> y <i>P. capsici</i> .	55
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO I		Pág.
Figura 1.	Ruta de la biosíntesis de isoprenoides en plantas.....	14
Figura 2.	Ruta biosintética de capsidiol en tabaco.....	15
CAPÍTULO II		
Figura 1.	Niveles relativos de expresión de genes relacionados con la defensa en raíces de plantas de chile CM-334 inoculadas con <i>P. capsici</i> respecto a las plantas no inoculadas.	40
Figura 2.	Actividad enzimática total de β -1,3-glucanasas (A), peroxidasas (B) y contenido de la fitoalexina capsidiol (C) en raíces de chile CM-334 inoculadas (P.c) y no inoculadas con <i>P. capsici</i> (testigo).	41
CAPÍTULO III		
Figura 1.	Niveles relativos de expresión de genes relacionados con la defensa en raíces de plantas de chile CM-334 inoculadas con <i>P. capsici</i> y <i>N. aberrans</i> , respecto a las plantas no inoculadas.	58
Figura 2.	Actividad enzimática total de β -1,3-glucanasas (A) y peroxidasas (B) y contenido de la fitoalexina capsidiol (C) en raíces de chile CM-334 no inoculadas (tetigo) e inoculadas con <i>P. capsici</i> (<i>Pc</i>), <i>N. aberrans</i> (<i>Na</i>) o ambos patógenos (<i>Na-Pc</i>).	60

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

El Chile (*Capsicum annuum* L.) es originario de México y con la llegada de los españoles esta hortaliza se extendió al viejo continente, y de ahí a todo el mundo (Claridades Agropecuarias, 1998). En México, el chile, es de gran importancia económica y social, y la rentabilidad del cultivo depende de factores abióticos y bióticos, siendo estos últimos los que más impactan el rendimiento del cultivo, destacando la marchitez del chile inducida por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leo., responsable del 70-80% de pérdidas en la producción en El Bajío, Aguascalientes, San Luis Potosí, y Puebla (Mendoza y Pinto, 1983; González-Pérez *et al.*, 2004). El manejo de esta enfermedad se ha realizado mediante prácticas culturales y el empleo de fungicidas; no obstante, se considera que la resistencia genética podría ser una estrategia de manejo práctica, económica y ambientalmente sana. Sin embargo, se ha observado que en cultivares de hortalizas resistentes a algunos fitopatógenos con origen en el suelo, se vuelven susceptibles cuando son infectados por nematodos fitopatógenos (Martin *et al.*, 1956; Thomason *et al.*, 1959; Bowman y Bloom, 1966; Vargas-Escobedo *et al.*, 1996).

Durante la interacción de la planta con nematodos endoparásitos sedentarios ocurre una reprogramación de la expresión génica en el hospedante, que permite la diferenciación de estructuras especializadas de alimentación (sincitios o células gigantes) necesarias para que el nematodo complete su ciclo de vida (Gheysen y Fenoll, 2002). La modificación en la expresión de algunos de esos genes podrían estar asociados con el rompimiento de resistencia (Zavaleta-Mejía *et al.*, 2009). La línea Criollo de Morelos 334 (CM-334) del chile tipo serrano, es altamente resistente a *Phytophthora capsici* y su resistencia se ha mantenido aún cuando se ha inoculado con las cepas más patogénicas (Bonnet *et al.*, 2007; Kim y Kim, 2009) y actualmente se le considera como el resistente universal a *P. capsici* (Oelke *et al.*, 2003; Glosier *et al.*, 2008). Sy y colaboradores (2005) sugieren que en CM-334 existen tres genes de resistencia a *P. capsici* que de manera independiente comandan la resistencia a este patógeno, encontrándose éstos en raíz, tallo y follaje. CM-334 también es altamente resistente a potyvirus y a las tres principales especies del nematodo agallador de la raíz: *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, y *M. javanica* (Pegard *et al.*,

2005), sin embargo, CM-334 es susceptible al nematodo *Nacobbus aberrans* (Godínez-Vidal *et al.*, 2008; López-Martínez *et al.*, 2010).

En el caso particular de materiales de Chile resistentes a *P. capsici*, la evidencia experimental hasta ahora generada, indica que la resistencia al oomiceto puede explicarse por diferentes mecanismos. Esta resistencia a *P. capsici* está dada por el incremento en la actividad de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) como las β -1,3-glucanasas, quitinasas y proteína PR-1 (Hong y Hwang, 2005), así como, de la enzima fenil alanina amonio liasa (PAL), acumulación de compuestos fenólicos con propiedades tóxicas (Candela *et al.*, 1995; Fernández-Pavía, 1997); e incremento en el contenido de capsidiol (Egea *et al.* 1996a). Además de los transcritos de la PR β -1,3-glucanasa (de la familia PR-2), también se incrementan de manera rápida y abundante transcritos de las familias PR-1, PR-3 (quitinasas) y PR-9 (peroxidasas) y por consiguiente se ubican como una parte importante de los mecanismos de defensa contra el oomiceto (Egea *et al.*, 1999; Kim y Hwang, 2000; Hong y Hwang, 2005). En general las PRs se consideran uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas (Van Loon *et al.*, 2006). También, en plantas de Chile infectadas con *P. capsici* se han observado incrementos en los niveles de mensajeros de la sesquiterpeno ciclasa, enzima asociada en la síntesis del capsidiol (Sun-Hwa *et al.*, 2003). El capsidiol es la principal fitoalexina sesquiterpénica que se acumula en las zonas de infección inhibiendo o restringiendo el crecimiento de *P. capsici* durante la interacción incompatible *P. capsici*-Chile (Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000). La enzima clave en la biosíntesis de este metabolito es la 5-epi-aristolóqueno sintasa, codificada por el gen *EAS* (Bohlmann *et al.* 2002). La expresión del gen *EAS* en plantas de Chile inoculadas con *P. capsici* o tratadas con elicitores (celulasa o Pep-13) fue reportada por Zavala-Páramo *et al.* (2000) y Maldonado-Bonilla *et al.* (2008).

En Chile CM-334 infectado con *P. capsici* también se ha observado una mayor y más rápida acumulación de los mensajeros que codifican para la enzima PAL, tales modificaciones se asociaron con cambios cuantitativos y cualitativos de compuestos fenólicos que inhibieron a *P. capsici* en condiciones *in vitro*. Asimismo, la actividad de peroxidasas ácidas fue mayor en plantas resistentes inoculadas con el oomiceto en comparación a las plantas susceptibles (Fernández-Pavía, 1997). A pesar de que el Chile CM-334 presenta un alto grado de resistencia a *P. capsici*, las plantas de este genotipo se

comportaron como susceptibles cuando fueron previamente infectadas por *N. aberrans*, es decir, se rompió su resistencia (Hernández *et al.*, 1992; Vargas-Escobedo *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). El máximo grado de rompimiento de resistencia a *P. capsici* en plantas de chile CM-334 se obtuvo cuando se inocularon 2000 juveniles de segundo estadio (J₂) de *N. aberrans* y 300, 000 zoosporas de *P. capsici* a los 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005).

Recientemente, nuestro grupo de trabajo reportó que en plantas de chile CM-344 inoculadas con *N. aberrans* se redujo la actividad enzimática de la fenilalanina amonioliasa (PAL), de peroxidasas y la concentración de fenoles solubles totales y ácido clorogénico, en comparación con aquellas inoculadas sólo con *P. capsici* (Godínez-Vidal *et al.*, 2008; López-Martínez *et al.*, 2010); tales resultados sugieren que la pérdida de resistencia podría asociarse con la reducción de la actividad o el contenido de éstos compuestos. Así Zavaleta-Mejía *et al.* (2009) proponen que el fenómeno de rompimiento de resistencia a *P. capsici* en CM-334 podría asociarse con cambios en la expresión de genes de defensa que codifican para peroxidasas, para enzimas de la ruta de fenilpropanoides (*PAL*, *C₄H*, *4CL*, *CCR*) e isoprenioides [*hmg* (3-hidroxi-3-metilglutaril CoA-reductasa), *EAS* (5-*epi*-aristoloueno sintasa) y *SS* (escualeno sintasa), cuya expresión o represión podría favorecer la acumulación de metabolitos que inhiben o favorecen la infección por *P. capsici*.

Con base en estos antecedentes y con la idea de aportar información que contribuya al esclarecimiento del fenómeno de rompimiento de resistencia a *P. capsici* en plantas CM-334 previamente infectadas con *N. aberrans*, el objetivo de la presente investigación fue.

- Comparar la acumulación de transcritos de los genes *POX*, *GLU*, *PR-1* y *EAS*, y la actividad enzimática de peroxidasas, glucanasas y el contenido de capsidiol en raíces de plantas de chile CM-334 inoculadas sólo con *P. capsici* y en plantas inoculadas con *P. capsici* y *N. aberrans*.

REVISIÓN DE LITERATURA

En México, el chile (*C. annuum*) es una de las hortalizas más importantes, tanto por su importancia social y cultural, como por la gran cantidad de divisas que genera, ya que el 10% de su producción se destina para exportar principalmente a Estados Unidos, Canadá, Alemania, España, Suecia, Japón, Hong Kong y algunos países de Centro y Sudamérica (Claridades Agropecuarias, 1998).

La rentabilidad del cultivo depende de factores diversos como son; el ambiente (luz, temperatura, humedad relativa, y ventilación, entre otros), nutrición, sistema de riego, potencial genético de la planta y control de plagas y enfermedades. El cultivo del chile presenta problemas fitosanitarios diversos, ya que puede ser atacado por bacterias, fitoplasmas, virus, viroides, hongos y oomicetos, siendo este último grupo de patógenos uno de los que más afectan al rendimiento del cultivo (Mendoza, 1996). En México, *Phytophthora capsici* es uno de los patógenos más devastadores para el cultivo de chile y puede causar pérdidas de hasta el 100% cuando las condiciones ambientales son favorables y no se realiza ningún método de control oportuno (González-Pérez *et al.*, 2004). Se considera que la resistencia genética podría ser una estrategia de manejo práctica, económica y ambientalmente sana.

En México, desde 1966 se empezaron a realizar esfuerzos para tratar de originar variedades resistentes a *P. capsici* (Heredia, 1966). Redondo (1979) en el periodo comprendido de 1974 a 1979 evaluó materiales de chile resistentes a *P. capsici*, procedentes tanto del extranjero como del país, y encontró que los materiales reportados como resistentes en otros países, se comportaron como susceptibles con la colección de cepas del oomiceto que se tienen en México. Estos resultados indicaron que para la obtención de fuentes de resistencias a la mayor parte de aislamientos de *P. capsici*, era necesario buscar la resistencia en los materiales criollos de México, ya que México por ser centro de origen y domesticación del género *Capsicum* presenta una gran diversidad genética. Así, en la década de los 80's se colectó a lo largo de todo el territorio mexicano una diversidad amplia de materiales de chile; de entre ellos 19 criollos provenientes del Estado de Morelos fueron resistentes a *P. capsici*; sobresaliendo el "Criollo de Morelos 334" debido a que de manera consistente exhibía un alto grado de resistencia al patógeno

(Guerrero-Moreno y Laborde, 1980; Gil-Ortega *et al.*, 1991). Hoy en día tal material es considerado como el resistente universal a *P. capsici* (Oelke *et al.*, 2003; Glosier *et al.*, 2008). CM-334 ha sido utilizado en diferentes programas de mejoramiento genético de varios países para obtener variedades de chile resistentes a *P. capsici* (Candela *et al.*, 2000).

Mecanismos de defensa estructurales y bioquímicos en plantas

Las plantas han desarrollado diferentes estrategias de defensa contra estreses bióticos y abióticos. Los mecanismos de defensa pueden ser divididos en dos categorías: 1) mecanismos constitutivos y, 2) mecanismo inducidos en respuesta a la infección. Los primeros incluyen barreras físicas como cutícula y pared celular, y compuestos constitutivos químicos que inhiben el crecimiento del patógeno invasor, como fenoles, alcaloides, diterpenoides, esteroides glicoalcaloides, entre otros. Los segundos incluyen la respuesta de hipersensibilidad, la activación de genes específicos de la ruta de los isoprenoides (peroxidasas, fitoalexinas, etc), el incremento de β 1-3 glucanasas, quitinasas y proteínas relacionadas con la patogénesis, entre otros (Fernández *et al.*, 1998; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003).

Mecanismos de defensa en variedades de chile resistentes a *P. capsici*

Los genotipos de chile resistentes a *P. capsici* reaccionan de forma hipersensitiva al ataque por el oomiceto (Egea *et al.*, 1996b; Candela *et al.*, 2000); sin embargo, la compatibilidad e incompatibilidad hospedante-patógeno está determinada por el grado de coordinación entre las diferentes estrategias de defensa, la rapidez, y la magnitud con la que ocurre la expresión de genes que codifican para la síntesis de metabolitos que inhiben el crecimiento del patógeno (Silvar *et al.*, 2008). En general, las respuestas de defensa son más rápidas y de mayor magnitud en las interacciones incompatibles chile-*P. capsici*, en comparación con las compatibles (Hwang, 2001).

La resistencia a *P. capsici* en materiales de chile se ha asociado a la inducción de diferentes mecanismos de defensa. La resistencia a *P. capsici* está dada por un incremento en el contenido de capsidiol; principal fitoalexina sintetizada en plantas de chile cuando éstas se exponen a la infección o ataque de algún agente biótico o abiótico (Stoessl *et al.*,

1973) y, su acumulación en los tejidos de la planta inhibe el crecimiento o desarrollo de *P. capsici* (Egea *et al.*, 1996a). También se ha consignado que la resistencia a *P. capsici* está asociada con incrementos en la actividad de la fenil alanina amonio liasa (PAL) y compuestos fenólicos con propiedades tóxicas (Fernández-Pavia, 1997). Al respecto, Candela *et al.* (1995) mencionan que en el cv Smith-5 la resistencia a *P. capsici* podría estar asociada con cambios cualitativos y cuantitativos de los ácidos fenólicos totales en tallos infectados por el oomiceto, ya que los niveles de fenoles totales fueron bajos en el cultivar susceptible Yolo Wonder después de la inoculación con *P. capsici*.

En las interacciones incompatibles chile-*P. capsici*, además de existir un incremento en la actividad de enzimas o compuestos relacionados con la defensa, ocurre también un aumento rápido y abundante de la expresión génica de proteínas relacionadas con patogénesis, tales como la proteína PR-1, PR-2 (β -1,3-glucanasa), PR-3 (quitinasas) y PR-9 (peroxidasas) (Kim y Hwang, 2000; Hwang, 2001; Hong y Hwang, 2005) y por consiguiente se ubican como una parte importante de los mecanismos de defensa contra el oomiceto. Al respecto, Silvar y colaboradores (2008) encontraron que a las 24 h posteriores a la inoculación con *P. capsici*, en las plantas resistentes de chile CM-331 la expresión del RNAm del gen *CAPO1* que codifica para peroxidasa, se incrementó 11.6 veces respecto a las plantas sin inocular, mientras que en las plantas del cv susceptible Yolo Wonder, la expresión del gen *CAPO1* fue tres veces menor que en el cultivar resistente. Por su parte, Egea *et al.* (1999) reportan que la actividad total de β -1,3-glucanasas fue mayor y más rápida en la interacción incompatible Smith-5-*P. capsici* en comparación con la interacción compatible Yolo Wonder-*P. capsici*, en esta última la acumulación tardía de β -1,3-glucanasas no previno el crecimiento del patógeno.

Resistencia de CM-334 a *P. capsici*

El chile CM-334 es uno de los materiales que ha mostrado mayor resistencia a *P. capsici* aún cuando se inocula con las cepas más patogénicas. Sin embargo, aún no hay un consenso claro sobre el número de genes que están involucrados en la resistencia de CM-334 a *P. capsici*. Guerrero-Moreno y Laborde (1980) sugieren que la resistencia está dada por sólo dos genes, mientras que otros autores mencionan que la resistencia en CM-334

está dada por tres genes los cuales de manera independiente confieren la resistencia a *P. capsici* en raíz, tallo y follaje (Sy *et al.*, 2005).

Fernández-Pavía (1997) al tratar de explicar la resistencia de CM-334 a *P. capsici*, encontró que al inocular a este genotipo con el oomiceto hubo mayores niveles de los mensajeros que codifican para la enzima PAL, lo cual se asoció con cambios cuantitativos y cualitativos de compuestos fenólicos que inhibieron el crecimiento de *P. capsici* en condiciones *in vitro*; también, la actividad de peroxidases acídicas fue mayor en plantas resistentes inoculadas, en comparación con las plantas susceptibles inoculadas. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por Godínez *et al.* (2008) cuando al inocular plantas de CM-334 observaron un incremento significativo en la actividad de PAL en plantas inoculadas con *P. capsici*. Por otra parte, Ueeda *et al.* (2006) reportan que el ácido jásmonico (AJ) puede jugar un papel importante en la resistencia de CM-334, ya que cuando este genotipo se inoculó con *P. capsici* los niveles de AJ se incrementaron drásticamente en las hojas inoculadas.

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

Las interacciones nematodo-hongo pueden resultar en efectos aditivos, neutrales o negativos para la planta hospedante (Walker *et al.*, 1999; Manzanilla-López *et al.*, 2002) o bien, estas interacciones nematodo-hongo pueden resultar en el fenómeno conocido como “rompimiento de resistencia” (Zavaleta-Mejía, 2002). Este fenómeno de rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparásitos se conoce desde mediados del siglo pasado (Martin *et al.*, 1956; Powell 1971; Bergeson, 1975; Upadhyay y Dwivedi, 1987; Maheshwari *et al.*, 1995). Por ejemplo; Upadhyay y Dwivedi (1987) reportaron la pérdida de resistencia al hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* en plantas de garbanzo de la variedad “Avrodhi”, cuando previamente éstas fueron inoculadas con el nematodo agallador *Meloidogyne javanica*.

El rompimiento de resistencia también se ha observado en genotipos de Chile resistentes a *P. capsici* (Hernández *et al.* 1992; Pérez y Pérez, 1988). A pesar del alto grado de resistencia del genotipo CM-334 al oomiceto, las plantas se mostraron susceptibles cuando fueron previamente infectadas por el nematodo agallador *N. aberrans*

(Pérez y Pérez, 1988; Vargas-Escobedo *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Godínez-Vidal *et al.*, 2008). Por ejemplo, Pérez y Pérez (1988) reportaron que cuando cuatro genotipos resistentes (CM-355, CM-329, BG-1504 y L-29) a *P. capsici* se inocularon simultáneamente con *N. aberrans* (1500 huevos/planta) y *P. capsici* (180, 000 zoosporas/planta) las plantas presentaron infección y muerte, ocurriendo así el rompimiento de resistencia de los cultivares resistentes al oomiceto. Por su parte, Trujillo-Viramontes y colaboradores (2005) determinaron que el máximo grado de rompimiento de resistencia en plantas de CM-334 ocurrió cuando las plantas CM-334 fueron inoculadas primeramente con 2000 J₂ de *N. aberrans* y 21 días después con 300, 000 zoosporas de *P. capsici*. En experimentos con plantas CM-334 con doble sistema radical, en donde existió una separación física entre el sistema radical inoculado con el nematodo y el inoculado con el oomiceto, las plantas mostraron susceptibilidad a este último; tales resultados sugieren que los cambios metabólicos y/o fisiológicos inducidos por el nematodo pueden ser los responsables del rompimiento de resistencia y no el daño mecánico inducido por este en las raíces de la planta hospedante (Vargas-Escobedo *et al.*, 1996).

Se ha consignado que la inoculación de plantas CM-334 con *N. aberrans* reduce considerablemente la actividad de la enzima PAL, en comparación con las plantas no inoculadas; en contraste, en las plantas inoculadas solamente con *P. capsici* la actividad se incrementó, indicando que tal reducción podría estar involucrada en el rompimiento de resistencia de CM-334 a *P. capsici* (Godínez-Vidal *et al.*, 2008). PAL es una enzima importante en la ruta de los fenilpropanoides, a través de la cual se sintetizan compuestos con una diversidad amplia de funciones en las plantas, entre ellos los relacionados con la defensa, como los compuestos fenólicos con propiedades antimicrobianas y las fitoalexinas (Klessing y Malamy, 1994; Shadle *et al.*, 2003). Además se ha determinado que en presencia de *N. aberrans* se reduce la actividad total de peroxidasas, el contenido de ácido clorogénico y los fenoles solubles totales; lo cual podría estar asociado con el fenómeno de rompimiento de resistencia a *P. capsici* en CM-334 cuando ha sido previamente infectado con el nematodo (López-Martínez *et al.*, 2010).

***Phytophthora capsici* Leo**

Este oomiceto se encontró por primera vez en Nuevo México (Estados Unidos de América) atacando cultivos de chile pimiento (Leonian, 1922). En México, Galindo (1960) demostró que la marchitez del chile anteriormente atribuida a *Fusarium*, en realidad era causada por *P. capsici*. Esta enfermedad ocasiona daños de hasta 80% en las zonas productoras de chile en El Bajío, Aguascalientes y San Luis Potosí. También afecta a las cucurbitáceas (calabaza, pepino, sandía, melón) y, en tomate ocasiona daños de hasta 50% en Nayarit y Jalisco (Mendoza y Pinto, 1983).

La clasificación taxonómica de *P. capsici* es la siguiente; Reino: Stramenopila o Chromista, Phylum: Oomycota, Clase: Oomycetes, Orden: Peronosporales, Familia: *Pythiaceae*, Genero: *Phytophthora*, Especie: *capsici* (Kirk *et al.*, 2001; Agrios, 2005).

P. capsici tiene apariencia finamente radiada, esporangios de forma muy variable, predominan los ovoides, elípticos, oval-alargados y globosos, de 28 a 123 μm de largo por 21 a 50 μm de ancho, promedio 53.0 x 30.5 μm con papila conspicua, a veces desviada, frecuentemente con dos papilas; clamidosporas ausentes o raras; oogonios de esféricos a subesféricos, con paredes lisas; anteridios basales anfígenos; oosporas apleróticas, esféricas a subesférica, con pared gruesa y lisa y de color amarillo a castaño (Holliday, 1980; Romero-Cova, 1988).

La marchitez del chile generalmente se produce durante los periodos en los que el ambiente cálido y húmedo es prolongado. *P. capsici* es diseminado hacia los órganos aéreos de la planta por agua superficial y salpique por lluvia (Blancard *et al.*, 2000). El exceso de humedad en el suelo y temperaturas de 10 a 30 °C, con óptimas de 24 a 26 °C son determinantes para el desarrollo de ataques severos y pérdidas extensas; la saturación del suelo con agua por un mínimo de 5 horas es suficiente para favorecer la infección de las plantas por el patógeno (Stevenson, 2001).

P. capsici penetra por estomas, lenticelas e hidátodos, o directamente rompiendo las barreras de protección de la cutícula de la planta, mediante la secreción de enzimas pectolíticas que reblandecen o maceran los componentes de dichas barreras (Redondo-

Juárez, 1986). En la mayoría de los casos el patógeno inicia su ataque a nivel del cuello de la planta produciendo canchales de color café oscuro, al principio húmedos y después se vuelven blandos y secos, acompañado de una ligera constricción que avanza rápidamente; esto ocasiona una marchitez progresiva del hospedante conforme avanza la enfermedad hasta que la planta cae al suelo y muere (Cruz-Alcalá, 1996).

La prevención de esta enfermedad es posible mediante la rotación de cultivos evitando la siembra sucesiva de hospedantes susceptibles a *P. capsici* como chile, calabaza y pepino, eliminando inmediatamente cualquier planta que empiece a mostrar marchitez, uso de semillas sanas, sembrando en surcos altos, de tal manera que el agua de riego o lluvia nunca llegue al cuello de la planta, nivelando el terreno para tener un buen drenaje (García-Morató, 1996; Hausbeck y Lamour, 2004).

Los fungicidas que comúnmente se han empleado con éxito para el control de *P. capsici* son Ridomil Gold 4E (Metalaxil 48%), Tokat 240 (Metalaxil 25.3 %), Aliette WDG (Fosetil-Al) y Previcur N (Propamocarb clorhidrato) (Fernández-Herrera *et al.*, 2007).

***Nacobbus aberrans* (Thorne y Allen)**

N. aberrans “el nematodo falso nodulador” es una especie fitoparásita que afecta seriamente a una diversidad amplia de plantas hortícolas, incluyendo plantas cultivadas y no cultivadas, como la papa, remolacha, jitomate, tabaco, chile, zanahoria, calabaza, cardo (Zamudio *et al.*, 1990; Canto-Sáenz *et al.*, 1996). En México se le ha reportado en 10 estados, donde afecta a un número importante de plantas cultivadas y arvenses, en las cuales induce la formación de agallas en las raíces parecidas a las inducidas por las especies del género *Meloidogyne*. Las agallas, en general, son pequeñas y separadas unas de otras a manera de cuenta de rosario (Franco-Navarro, 2005).

El género *Nacobbus* está representado por sólo dos especies, *Nacobbus dorsalis* y *N. aberrans*. La primera, no parásita a plantas de interés agrícola y sólo se encuentra en California (U.S.A) donde su importancia económica no es significativa. Mientras que *N. aberrans* es una especie parásita de cultivos importantes como chile, jitomate, papa, frijol

y remolacha. Los resultados de diversos estudios sobre hospedantes de *N. aberrans* indican que las poblaciones de esta especie pueden separarse en los grupos de frijol, papa y remolacha, donde las poblaciones de cada grupo tienen preferencia por hospedantes diferentes; por ejemplo: el grupo de la remolacha, incluye poblaciones que atacan a la remolacha y al tomate pero no a la papa; el grupo de la papa, incluye poblaciones que atacan a la papa y también afectan a la remolacha y tomate, pero no al chile; y el grupo del frijol, incluyen poblaciones que atacan al frijol y al chile pero no a la papa y a la remolacha (Manzanilla-López *et al.*, 2002). *N. aberrans* se adapta a un amplio rango de condiciones climáticas y su ciclo de vida está ampliamente influenciado por la temperatura (Cid del Prado-Vera, 1985).

Este patógeno se caracteriza por su dimorfismo sexual; la hembra tiene forma globosa, con un solo ovario y vulva terminal, mientras que el macho es vermiforme, con bursa terminal, campo lateral con cuatro incisuras irregularmente areoladas, dehiridios ausentes, área labial redondeada, glándulas esofágicas sobrepuestas al intestino, la hembra inmadura es vermiforme y de forma obesa-hinchada cuando madura (Manzanillo-López *et al.*, 2002).

Nacobbus aberrans, al igual que muchas especies de nematodos parásitos de plantas tienen complejas relaciones con sus hospedantes, induciéndoles profundas alteraciones en la morfología de las células de las cuales se alimentan. Durante esta interacción ocurren modificaciones celulares e histológicas que sugieren que el nematodo incita una serie de cambios físicos, químicos y fisiológicos en su hospedante, dando como resultado los sincitios (Parviz, 1985). El J2 invade intracelularmente las raíces formando cavidades o lesiones en los tejidos radicales durante su recorrido. Las células afectadas generalmente muestran citoplasma denso, núcleo y pared celular hipertrofiada, vacuolación, formación de gránulos y lisis celular (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Los protoplastos se fusionan dando lugar a un continuo de células denominado sincitio (Sijmons, 1993). Los sincitios son inducidos por la hembra inmadura vermiforme y por la hembra J4.

Síntesis de isoprenoides en las plantas

Los isoprenoides constituyen una familia grande de compuestos con aproximadamente 20,000 miembros. La estructura de los isoprenoides es diversa, desde cadenas hidrocarbonadas simples hasta estructuras cíclicas complejas. Terpenos y terpenoides son los términos más adecuados y descriptivos para estos compuestos, ya que su síntesis comienza con un compuesto de cinco carbonos, el isopreno (Chappell, 1995b).

Los compuesto terpénicos pueden ser clasificados en metabolitos primarios y secundarios. Entre los primarios se encuentran los esteroides, carotenoides, clorofila, reguladores del crecimiento (ácido abscísico, citocininas y giberelinas, así como, los brassinoesteroides) y quinonas los cuales son compuestos esenciales en la integridad de la membrana celular, fotosíntesis, regulación del desarrollo celular, y transporte de electrones. Los metabolitos secundarios incluyen a los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, que son importantes sobre todo durante las interacciones planta-planta, planta-insecto o planta-patógeno (Chappell, 1995a; Lange *et al.*, 2000).

En las plantas, los isoprenoides se sintetizan por dos vías que operan en dos diferentes compartimientos celulares, el citoplasma (ruta mevalónica [MVA]) y los plástidos (ruta del 2C-metil-D-eritrol 4-fosfato [MEP]). La vía MVA está presente en prácticamente todos los eucariotas y la vía MEP está presente en eubacterias y organismos fotosintéticos como algas y plantas superiores, aunque ausente en hongos, arqueobacterias y animales (León y Guevara-García, 2007). No obstante, aunque ésta última vía está presente también en las plantas superiores, no se ha identificado en *C. annuum* los genes que codifican para enzimas importantes que participan en esta ruta (ejemplo: DXR: 1-dioxi-D-xilulosa 5-fosfato reducto isomerasa; CDP-ME sintetasa: 4-difosfocitidil -2-C-metil-D-eritritol 4 fosfato sintasa; CDP-ME cinasa: 4-difosfocitidil -2-C-metil-D-eritritol 4 fosfato cinasa y; HDS: 2C-metil-D-eritritol ciclo difosfato sintasa (Lichtenthaler, 2000). Por lo tanto, la síntesis de isoprenoides en plantas de Chile se lleva a cabo a través de la ruta mevalónica.

Esteroides y sesquiterpenoides (capsidiol) en las plantas. La biosíntesis de esteroides y de fitoalexinas sesquiterpénicas (capsidiol) tienen lugar en la ruta de los

isoprenoides (Zavala-Páramo *et al.*, 2000). La biosíntesis de éstos compuestos por esta vía es referida, también, como la ruta del mevalonato. El mevalonato es un intermediario de seis carbonos, que aparece después de la fusión de tres unidades de acetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A (HMG-CoA). La HMG-CoA es convertida a mevalonato en una reacción irreversible catalizada por HMG-CoA reductasa (HMGR). El mevalonato a su vez es fosforilado y descarboxilado para generar isopentenil difosfato (IPP) por acción de las enzimas mevalonato kinasa y mevalonato 5-difosfato decarboxilasa. A su vez, el IPP puede ser convertido a su isómero dimetil-alil difosfato (DMAPP) por acción de la enzima IPP isomerasa, en una reacción reversible. La adición de una unidad de IPP a DMAPP forma geranil difosfato y la fusión de una segunda unidad de IPP forma farnesil difosfato (FPP) y un tercer IPP, genera geranilgeranil difosfato (GGPP) (Fig. 1).

Los esteroides son isoprenoides que tienen una función esencial en todos los eucariontes, y particularmente en las plantas superiores. Estos compuestos forman parte de la bicapa de fosfolípidos de las membranas y, además, son precursores de compuestos con una alta actividad fisiológica como los brassinoesteroides, que son una clase de hormonas importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Benveniste, 2004).

Los sesquiterpenos son compuestos formados por tres moléculas isoprenicas (C_5) que comprende compuestos producidos por las plantas con funciones de defensa como lo es el capsidiol, el cual es la fitoalexina más importante en solanáceas ya que puede prevenir la germinación y crecimiento de varias especies de hongos fitopatógenos (Stoessl *et al.*, 1973).

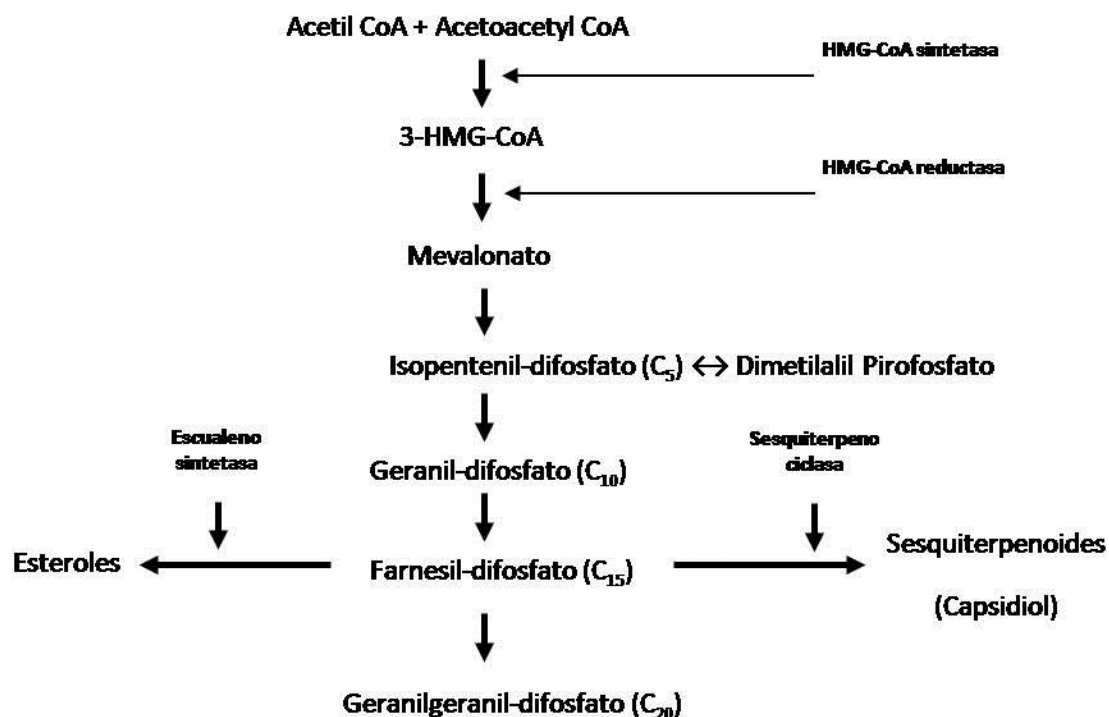


Fig. 1. Ruta de la biosíntesis de isoprenoides en plantas (Chappell *et al.*, 1989; Newman y Chappell, 1999; Lichtenthaler, 2000).

En la biosíntesis de los esteroides, la enzima escualeno sintasa (SS) cataliza la formación de esterol a partir de FPP y es considerada un punto potencial de regulación (Devarenne *et al.*, 1998). Mientras que la enzima 5-*epi*-aristolóqueno sintasa (EAS) y 5-*epi*-aristolóqueno dihidroxilasa (EAH) son las enzimas que regulan la biosíntesis de capsidiol, principal fitoalexina en Chile (Facchini y Chappell, 1992; Yin *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 2005). La EAS cataliza la ciclización de farnesil difosfato en el intermediario bicíclico 5-*epi*-aristolóqueno y es responsable del desvío de farnesil difosfato, en la ruta del mevalonato, hacia la biosíntesis de compuestos antimicrobiales y la EAH, caracterizada como citocromo P450, es una enzima que cataliza la hidroxilación de EA en los carbonos C-1 y C-3 (Fig. 2). La 5-*epi*-aristolóqueno sintasa es una enzima que se induce por el ataque de patógenos o estimuladores externos, cuya actividad está regulada por el control transcripcional del gen. La EAS en Chile está codificada por una familia de genes de ocho miembros, mientras que en tabaco, la familia es de alrededor 15 miembros (Zavala-Páramo *et al.*, 2005).

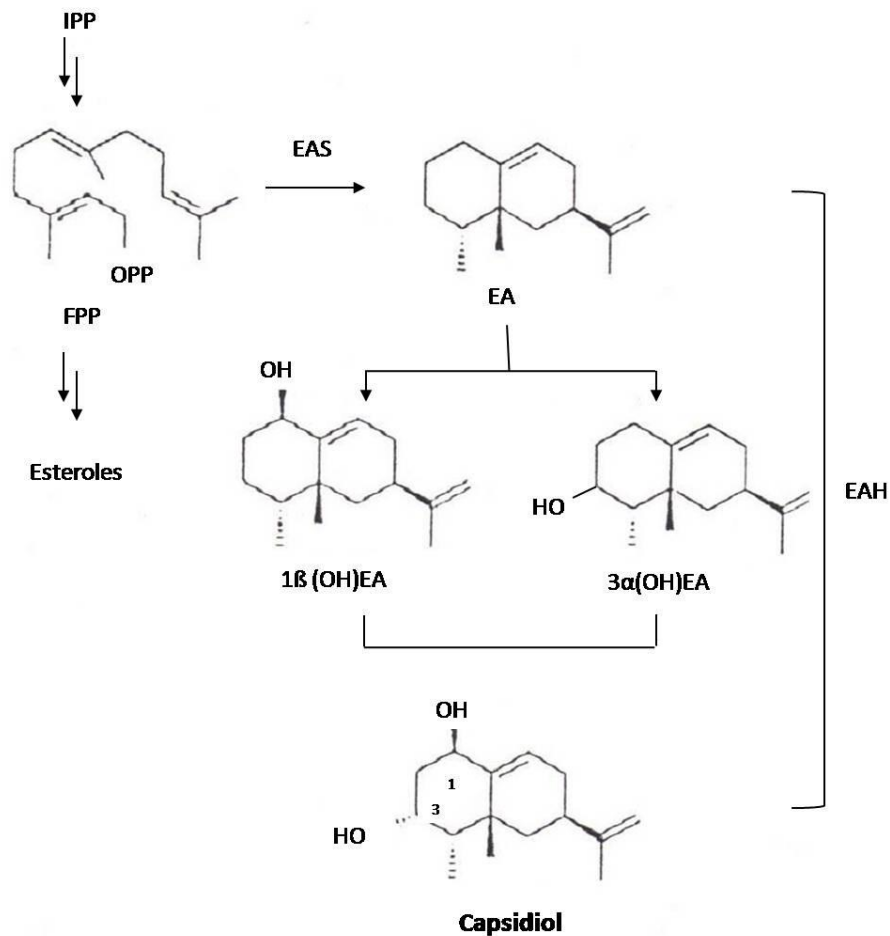


Fig. 2. Ruta biosintética de capsidiol en tabaco. IPP = isopentenil pirofosfato; FPP= farnesil difosfato; EAS = 5-epiaristoloueno sintasa; EA= epiaristoloueno; EAH= 5-epiaristoloueno dihidroxilasa; OPP; pirofosfato (Takahashi *et al.*, 2005).

Proteínas relacionadas con patogénesis (PRs)

Muchas plantas responden a estímulos externos como el estrés ambiental y el ataque por patógenos. El ataque por organismos patogénicos induce una gran variedad de mecanismos bioquímicos de defensa en las plantas, como lo son la acumulación de fitoalexinas, incremento de ciertas enzimas con actividad hidrolítica, así como, la síntesis de nuevas proteínas relacionados con los mecanismos de defensa. Gran parte de las repuestas relacionadas con defensa de la plantas consisten de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs), las cuales se han encontrado en plantas mono y dicotiledonales. El término de PRs (pathogenesis-related proteins) fue acuñado en 1980 (Antoniw *et al.*,

1980), para definir a aquellas proteínas codificadas por las plantas hospedantes pero inducidas sólo en situaciones patológicas o relacionadas.

Aunque las PRs son consideradas como proteínas que se expresan en respuesta al ataque por un patógeno, muchos reportes indican que proteínas PRs pueden ser detectadas en tejido no infectado, sugiriendo que estas proteínas puedan estar presentes en tejido sano en cantidades pequeñas. Por lo tanto, Van Loon (1999) sugiere que las PRs sean mejor definidas como proteínas que son fácilmente detectadas en tejido infectado y no detectadas en tejido sano. Estas proteínas se caracterizan por ser extraíbles selectivamente a pH bajo, tener peso molecular relativamente bajo, ser termoestables, se acumulan en el espacio intercelular y tienen alta resistencia a actividad proteolítica (Van Loon *et al.*, 1994).

Aún no está del todo claro cómo estas proteínas pueden de forma individual o combinada, participar en la defensa de las plantas frente a la infección por patógenos, así se ha propuesto que las PRs pueden actuar de dos maneras diferentes: degradando directamente la pared celular del patógeno, o indirectamente promoviendo la liberación de compuestos de la pared celular (oligosacáridos) que pudieran actuar como elicitores de las reacciones de defensa de las plantas (Van Loon *et al.*, 1994; Van Loon *et al.*, 2006).

Las PRs son inducidas no sólo por patógenos fúngicos, sino también por virus, bacterias, viroides, insectos y nematodos (Bol y Linthorst, 1990). También, se ha observado que estas proteínas se expresan bajo condiciones de estrés ambiental como la temperatura, salinidad, sequía y luz, entre otros, y por la presencia de químicos como etileno, ácido salicílico y óxido nítrico (Hong *et al.*, 2005; Hong y Hwang 2005). También los daños o heridas mecánicas inducen este tipo de respuestas. Al respecto, se ha consignado que existe una activación diferencial de los miembros de las familias de genes PRs, así en el ataque por patógeno predominantemente se expresan los genes de PRs de formas ácida, mientras que el daño mecánico estimula la expresión de las formas básicas (Bol *et al.*, 1996).

Clasificación de PRs. Originalmente se caracterizaron cinco grandes grupos de PRs en tabaco, cada uno con varios miembros con propiedades similares. Actualmente se

ha unificado la nomenclatura para las PRs, formando grupos de familias que comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos, relaciones serológicas y actividad enzimática y biológica. Para 1994 Van Loon y colaboradores reportaron 11 familias (PR-1 a PR-11) reconocidas en tabaco y tomate. Posteriormente, tres nuevas familias (PR-12, PR-13 y PR-14) fueron identificadas en rábano, *Arabidopsis* y cebada, respectivamente; más recientemente se tienen clasificadas 17 clases de PR's con base en sus propiedades bioquímicas y biológicas (Cuadro 1). Las familias están numeradas de acuerdo al orden en las cuales ellas fueron descubiertas (Van Loon *et al.*, 2006; Vidhyasekaran, 2008).

Cuadro 1. Familias de proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) detectadas en plantas de interés agrícola.

PR's	Planta en la que se detectó	Función
PR-1	Arroz, cebada, maíz, tomate, tabaco.	Engrosamiento de la pared celular
PR-2	Arroz, trigo, cebada, maíz, papa, tomate, tabaco, chile, frijol, soya, remolacha.	β -1,3-glucanasa
PR-3	Arroz, maíz, tomate, chile, remolacha.	Quitinasa
PR-4	Tabaco, tomate, árbol de goma.	Quitinasa
PR-5	Arroz, trigo, cebada, avena, sorgo, papa, tomate, tabaco.	Alteración de la permeabilidad de la membrana del hongo.
PR-6	Cebada, tomate, papa, tabaco.	Inhibidor de proteinasa
PR-7	Tomate	Endoproteinasa
PR-8	Pepino	Quitinasa
PR-9	Tomate, arroz, tabaco, trigo.	Peroxidasa
PR-10	Papa, espárrago, guisante, frijol, arroz.	Ribonucleasa
PR-11	Tabaco	Quitinasa
PR-12	Arabidopsis, guisante, rabano.	Defensina
PR-13	Cebada	Tionina
PR-14	Cebada LTP4	Transferencia intracelular de lípidos
PR-15	Cebada	Oxalacetato oxidasa
PR-16	Cebada y trigo.	Parecida a oxalacetato oxidasa sin presentar esta actividad
PR-17	Trigo.	Peptidasa

El punto isoeléctrico de las PRs es usado para clasificar algunas PRs en subclases (Koiwa *et al.*, 1994). Sin embargo, los criterios usados para la inclusión de nuevas familias de PRs son: 1) la proteína debe de ser inducida por un patógeno en tejidos que normalmente no la expresan y, 2) la inducción debe ocurrir en al menos dos diferentes interacciones planta-patógeno o la expresión en una sola interacción planta-patógeno debe ser confirmada en dos laboratorios independientes diferentes (Van Loon y Van Strien, 1999).

Proteínas PR-1. Es el grupo dominante de PR's detectadas en un gran número de especies de plantas. Se han detectado en arroz, trigo, cebada, tomate, tabaco y en varias otras especies de plantas dentro de las familias Gramineae, Solanaceae, Amaranthaceae y Chenopodiaceae (Van Loon, 1985; Sarowar *et al.*, 2006). Las PR-1 se mantienen solubles en buffer ácido (pH 3.0) al contrario de muchas otras proteínas de plantas que se degradan bajo estas condiciones (Van Loon, 1976). El peso molecular de las proteínas PR-1 oscila en un rango de 14 a 16 kDa y ambas isoformas (ácidas y básicas) han sido detectadas en plantas infectadas por patógeno (Van Loon, 1999).

La función exacta de las proteínas PR-1 durante la patogénesis es desconocida. Sin embargo, Benhamou *et al.* (1991) sugieren que estas proteínas pueden estar involucradas en el engrosamiento de la pared celular y, por tanto, pueden ofrecer resistencia a la dispersión del patógeno en el apoplasto. También, las PR-1 se han detectado en la parte externa de la pared celular y en citoplasma, lo cual puede constituir una línea de defensa primaria en contra de la hifa infectiva del patógeno, lo que sugiere que estas proteínas también puedan tener un efecto directo en el crecimiento del patógeno. Por ejemplo, Lee *et al.* (2000) al inocular plantas de Chile con *P. capsici*, las proteínas PR-1, se detectaron a las 24 h después de la inoculación en la fracción intercelular de las células del tallo de las plantas inoculadas, lo cual sugiere que éstas podrían tener un papel importante como mecanismo de defensa directo en contra de los patógenos que crecen en esta área.

Proteínas PR-2 (β -1,3-glucanasas). Estas proteínas son comúnmente expresadas en varias plantas como resultado de la infección por varios patógenos y presentan actividad β , 1-3 glucanasa. Estas proteínas son capaces de realizar cortes hidrolíticos endógenos en

los enlaces β , 1-3 glucosídicos de los β , 1-3 glucanas (Leubner-Metzger y Meins, 1999). Las β , 1-3 glucanasas son consideradas como proteínas relacionadas con la patogénesis y están ampliamente distribuidas en distintas especies de plantas (Van Loon, 1999).

Las β , 1-3 glucanasas hidrolizan el β , 1-3 glucana que es el mayor componente de la pared celular de los oomicetos. La enzima también puede mediar la respuesta de las plantas a través de la liberación de fragmentos de glucanas de la pared celular del patógeno o de planta, lo cual funciona como elicitores que pueden activar otras respuestas de defensa de las plantas (Takeuchi *et al.* 1990). Aunque el mayor interés en las β , 1-3 glucanasas se ha centrado en su papel como mecanismo de defensa en contra de patógenos, existen evidencias claras de que estas enzimas también intervienen en diversos procesos fisiológicos y del desarrollo de las plantas como, maduración de frutos, división celular, embriogénesis, germinación de semillas, rompimiento de dormancia, respuestas a bajas temperaturas, ozono, daño mecánico y luz UV, entre otros (Félix y Meins 1986; Castresana *et al.*, 1990; Hoj y Fincher, 1995; Leubner-Metzger y Meins, 1999). Existen múltiples isoformas estructurales de estas enzimas las cuales difieren en tamaño, punto isoeléctrico, estructura primaria, localización celular y modelo de regulación. Las glucanasas son codificadas por una familia multigenica y son producidas como pre-proteínas con un péptido señal N terminal hidrofóbico, que es removido co-traduccionalmente y un extremo C-terminal N-glicosilado en un solo sitio (Leubner-Metzger y Meins, 1999). La pro-proteína es transportada del retículo endoplasmático vía aparato de Golgi a la vacuola donde el extremo C-terminal es removido para que madure (Shinshi *et al.*, 1988). Indirectamente se ha identificado que el extremo C-terminal contiene señales de envío a la vacuola (Bednarek y Raikhel, 1991; Neuhaus *et al.*, 1991;). Las proteínas de la clase I (aproximadamente de 33 kDa) son proteínas básicas localizadas en la vacuola, mientras que las de la clase II y III (aproximadamente de 34 a 36 kDa) son proteínas ácidas secretadas en los espacios extracelulares y que no contienen el extremo C-terminal presente en las de la clase I (Stintzi *et al.*, 1993; Leubner-Metzger y Meins, 1999).

Casi todos los genes de β , 1-3 glucanasas aislados de especies de plantas contienen un único intrón, con la excepción de un gen aislado de *Nicotiana plumbaginifolia* que

contiene dos (Castresana *et al.*, 1990). Las posiciones del intrón tanto en glucanasas ácidas y básicas sugieren que la estructura de los genes de estas glucanasas está altamente conservada, y que deben haber surgido de un único ancestro común (Linthorst, 1991; Hoj y Fincher, 1995).

Proteínas PR-9 (peroxidases). Las peroxidases de las plantas son un grupo de proteínas ampliamente estudiado y sus funciones bioquímicas básicas están bien caracterizadas. Estas enzimas son glicoproteínas que contienen un grupo hemo y que catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos orgánicos e inorgánicos por acción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Gómez-Vásquez *et al.*, 2004). Este grupo de enzimas contribuyen al control de la fotorrespiración, a la respuesta de diferentes tipos de estrés, en la biosíntesis y deposición de materiales que engrosan la pared celular como lignina, suberina y extensina, entre otros (Passardi *et al.*, 2005). También, algunas isoformas pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) como parte de la explosión oxidativa durante una interacción incompatible (Adam *et al.*, 1995).

Las peroxidases están presentes en numerosas isomorfias tanto en plantas como en animales y han sido clasificadas en dos grandes super-grupos; la super-familia de peroxidases de plantas y las super-familias de peroxidases de animales. Las peroxidases encontradas en bacterias y hongos están incluidas en la super-familia de las plantas ya que tienen una alta similitud en sus estructuras primarias y terciarias (Chittoor *et al.*, 1999). Así mismo, las peroxidases de plantas pueden ser clasificadas como aniónicas, neutrales y catiónicas de acuerdo a su punto isoeléctrico. Las peroxidases aniónicas y neutrales se encuentran principalmente en la pared celular y las catiónicas en la vacuola central.

Las peroxidases de plantas están divididas en tres grandes clases. Las peroxidases de la clase I son intracelulares y están presentes en procariontes (peroxidases del citocromo c, peroxidases-catalasas bacterianas, ascorbato peroxidasa de cloroplastos y citosol). Las clase II incluyen peroxidases extracelulares de hongos como las de *Coprinus cinereus*, mientras que, en la clase III se incluyen principalmente peroxidases extracelulares de plantas típicamente representadas por la peroxidasa isoenzima C del rábano (Howes *et al.*,

1999; Passardi *et al.*, 2005). Algunas peroxidasas de esta clase son enviadas a la vacuola al contener un péptido C-terminal.

Las plantas contienen un número alto de genes similares a los de peroxidasas, sin embargo, no todos se expresan como resultado a estrés por patógenos (expresión diferencial), lo cual indica una adaptación evolutiva de las plantas para responder a una variedad de estímulos y así evitar una expresión inapropiada de los genes (Chittoor *et al.*, 1999). Algunos estudios sobre la expresión de genes de peroxidasas que resultan del estrés por patógenos señalan que éstos se expresan rápidamente y en mayores niveles con respecto a las plantas testigos. Do *et al.* (2003) reportaron en la interacción incompatible chile cv. Hanbyul-*P. capsici* (aislamiento CBS178.26) un incremento fuerte del gen *CAPO1* que codifica para una peroxidasa, en comparación con la interacción compatible chile cv. Hanbyul-*P. capsici* (aislamiento S197) la cual solo mostró una ligera expresión de dicho gen.

LITERATURA CITADA

- Adam, A. L., Bestwick, C. S., Barna, B., Mansfield, J. W. 1995.** Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Planta* 197:240-249.
- Agrios, G. N. 2005.** Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922 p.
- Antoniw, J. F., Ritter, C. E., Pierpoint, W. S., and Van Loon, L. C. 1980.** Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal Genetic Virology* 47:79-87.
- Bednarek, S. K., and Raikhel N. V. 1991.** The barley lectin carboxyl-terminal propeptide is a vacuolar protein sorting determinant in plants. *The Plant Cell* 3:1195-1206.
- Benhamou, N., Grenier, J., and Asselin, A. 1991.** Immunogold localization of pathogenesis-related protein P14 in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38:237-253.
- Benveniste, P. 2004.** Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annual Review of Plant Biology* 55: 429-457.

- Bergeson, B. G. 1975.** The effect of *Meloidogyne incognita* on the resistance of four muskmelon varieties to fusarium wilt. Plant Disease Report 59:410-413.
- Blancard, D., Lecoq, H., y Pitrat, M. 2000.** Enfermedades de las cucurbitáceas. Observar, identificar, luchar. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid España. Reimpresión.
- Bohlmann, J., Stauber, E. J., Krock, B., Oldham, N. J., Gershenzon, J., and Baldwin, I. T. 2002.** Gene expression of 5-*epi*-aristolochene synthase and formation of capsidiol in roots of *Nicotiana attenuate* and *N. sylvestris*. Phytochemistry 60:109-116.
- Bol, J. F., and Linthorst, J. M. 1990.** Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. Annual Review of Phytopathology 28:113-138.
- Bol, J. F., Buchel A. S., Knoester, M., Baladin, T., Van Loon, L.C., and Linthorst, H.J.M. 1996.** Regulation of the expression of plant defense genes. Plant Growth Regulation 18:87-91.
- Bonnet, J., Danan, S., Boudet, C., Barchi, L., Sage-Palloix, A.M., Caromel, B., Palloix, A., and Lefebvre. 2007.** Are the polygenic architecture of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper?. Theoretical and Applied Genetics 115:253-264.
- Bowman, P. and Bloom, J. R. 1966.** Breaking the resistance of tomato varieties to Fusarium wilt by *Meloidogyne incognita*. Phytopathology 56:871.
- Candela, M.E, Alcázar M.D., Espín, A, Egea, C., and Almela, L. 1995.** Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. Plant Pathology 44:116-123.
- Candela, M.E., Egea, C., Garcia, P.M.D, Costa, J., and Candela, M. 2000.** Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. Acta Horticulturae 522:79-86.
- Canto-Sáenz, M., Arcos, M. J., Jatala, P., and Haddad, R. 1996.** Morphology, biology and management of *Nacobbus aberrans* in Perú. Nematropica 26:197.
- Castresana, C., de Carvalho, F., Gheysen, G., Habets, M., Inze, D., Van Montagu, M. 1990.** Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* beta- 1,3 glucanase gene. Plant Cell 2:1131-1143.

- Chappell, J. 1995a.** Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annual Review of Plant Molecular Biology* 46:521-547.
- Chappell, J. 1995b.** The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiology* 107:1-6.
- Chappell, J., Von Lanken, C., Vögeli, U., and Bhatt, P. 1989.** Sterol and sesquiterpenoid biosynthesis during a growth cycle of tobacco cell suspension cultures. *Plant Cell Reports* 8:48-52.
- Chittoor J. M., Leach J. E. and White F. F. 1999.** Induction of peroxidase during defense against pathogens. pp. 171-187. In: Datta S.K. and Muthukrishnan S. (Eds.). *Pathogenesis-related proteins in plants*. Boca Raton, FL: CRC Press. USA.
- Claridades Agropecuarias. 1998.** Chile y Trigo. 56:25-31. (México).
- Cruz-Alcalá, A. 1996.** Identificación de hongos causantes de pudriciones de raíz y cuello del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en el sureste del estado de México. Tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México, México.
- Cid del Prado-Vera, I. 1985.** Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. En: Marbán-Mendoza, N., y Thomason, I. J. (Eds). *Fitonematología Avanzada*. Colegio de Postgraduados, Texcoco, México, México. pp. 57-65.
- Devarenne, T.P., Shin, D.H., Back, K., Yin, S., and Chappell, J. 1998.** Molecular characterization of tobacco squalene synthase and regulation in response to fungal elicitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 349:205-215.
- Do, H.M., Hong, J.K., Jung, H.W., Kim, S.H., Ham, J.H., and Hwang, B.K. 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 Interactions* 16:196-205.
- Egea, C., Alcázar, M.D., and Candela, M.E. 1996a.** Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 98:737-742.
- Egea, C., Dickinson, M.J., Candela, M., and Candela, E. 1999.** β -1,3-glucanasa isoenzymes and genes in resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 107:312-318.

- Egea, C., Garcia, P.M.D., and Candela, M.E. 1996b.** Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 149:762-764.
- Facchini, P. J., and Chappell, J. 1992.** Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:11088-11092.
- Félix, G., and Meins, F.J. 1986.** Developmental and hormonal regulation of β , 1-3 glucanase in tobacco. *Planta* 167:206-211.
- Fernandez-Pavia, S. 1997.** Host-Pathogen interactions in the root rot *Phytophthora capsici*/*Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph D. Dissertation. New México State University. 109 p.
- Fernández, A., Peteira, B., Solórzano, E., Díaz, M. y León, O. 1998.** Mecanismos bioquímicos de defensa en la interacción hospedante-patógeno. *Revista Protección Vegetal* 13:1-12.
- Fernández-Herrera, E., Acosta-Ramos, M. y Pinto, V.M. 2007.** Efecto de aplicaciones de fungicidas sobre la incidencia de la marchitez (*Phytophthora capsici* Leo.) del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:186-189.
- Franco-Navarro, F. 2005.** Nematodos fitopatógenos de mayor importancia. pp. 207-231 En: Producción de jitomate en invernadero. Bautista-Martínez Néstor y Alvarado-López, Jorge (Eds). Colegio de Postgraduados, Texcoco, México. 265 p.
- Galindo, A. J. 1960.** Estudio preliminar sobre la marchitez de las plantas de chile en México y su agente causal *Phytophthora capsici* Leonian. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Agricultura, México. 42 p.
- García-Morató, M. 1996.** Enfermedades fúngicas, bacterianas y fisiopatías. *In: Pimientos. Compendio de horticultura. No. 9.* Alicia Namesny Vallespir (Ed). Ediciones de Horticultura, Barcelona, España. pp. 59-61.
- Gheysen, G., and Fenoll, C. 2002.** Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology* 40:191-219.
- Gil-Ortega, R., Espanol, C.P. and Zueco, J.C. 1991.** Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SC 334'. *Plant Breeding* 107:50-55.

- Glosier, B.R., Ogundiwin, E.A., Sidhu, G.S., Sischo, D.R., and Prince, J.P. 2008.** A differential series of pepper (*Capsicum annum* L.) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica* 162:23-30.
- Godinez-Vidal, D., Rocha-Sosa, M, Sepúlveda-García, E. B., Lara-Reyna, J., Rojas-Martínez, R., and Zavaleta-Mejía, E. 2008.** Phenylalanine ammonia lyase activity in chili CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology* 120:299-303.
- Gómez-Vásquez, R., Day, R., Buschmann, H., Randles, S., Beeching, J. R., and Cooper, R.M. 2004.** Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged Cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Annals of Botany* 94:87-97.
- González-Pérez, E., Yáñez-Morales, M., Santiago-Santiago, V. y Montero-Pineda, Á. 2004.** Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. *Agrociencia* 38:653-661.
- Guerrero-Moreno A., and Laborde, J. 1980.** Current status of pepper breeding for resistance to *Phytophthora capsici* in Mexico. pp 52-56. In: Synopses of the 4th Meeting of the Capsicum Working Group of Eucarpia I. V. T., Wageningen. The Netherlands.
- Hausbeck, M. K., and Lamour, K. H. 2004.** *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease* 88:1292-1303.
- Heredia, Z. A., 1966.** Herencia de la Resistencia del chile *Capsicum annum* L. al ataque del hongo *Phytophthora capsici* Leo. Tesis Profesional. E. N. A., Chapingo, México. 40 p.
- Hernández, A.A.M., Zavaleta-Mejía, E., y Carrillo, G. 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.
- Hoj, P.B. and Fincher, G.B. 1995.** Molecular evolution of plant β -glucan endohydrolases. *The Plant Journal* 7:367-379.
- Holliday, P. 1980.** Fungus diseases of tropical crops. Cambridge University Press. United States of America. pp. 175-177.

- Hong, J. K., and Hwang B. K. 2005.** Functional characterization of PR-1 protein, β -1,3-glucanase and chitinase genes during defense response to biotic and abiotic stresses in *Capsicum annuum*. The Plant Pathology Journal 21: 195-206.
- Hong, J. K., Lee, S. C., and Hwang, B. K. 2005.** Activation of pepper basic PR-1 gene promoter during signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. Gene 356:169-180.
- Howes, B.D., Schiodt, C.B., Welinder, K.G., Marzocchi, M. P., Jian-Guo, M, Zhang, J., Shelnut, and Smulevich, G. 1999.** The quantum mixed-spin heme state of barley peroxidase: a paradigm for class III peroxidases. Biophysical Journal 77:478-492.
- Hwang, B.K., 2001.** Cytology, physiology and molecular genetics of resistance to Phytophthora blight in pepper plants. The Plant Pathology Journal 17:9-21.
- Kim, S.G., and Kim, Y.H. 2009.** Histological and cytological changes associated with susceptible and resistant responses of chili pepper root and stem to *Phytophthora capsici* infection. The Plant Pathology Journal 25:113-120.
- Kim, Y. J., and Hwang, B. K. 2000.** Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. Physiologia plantarum 108:51-60.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., y Stalpers, J. A. 2001.** Dictionary of the fungi. 9th Edition. CABI-Publishing. New York, USA.
- Klessing, F.D., and Malamy, J. 1994.** The salicylic acid signal in plants. Plant Molecular Biology 26:1439-1458.
- Koiwa, H., Sato, F., and Yamada, Y. 1994.** Characterization of accumulation of tobacco PR-5 proteins by IEF-immunoblot analysis. Plant and Cell Physiology 35:821-827.
- Lange, M. B., Rujan, T., Martin, W., and Croteau, R. 2000.** Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:13172-13177.
- Lee, Y. K., Hippe-Sanwald, S., Lee, S. Ch., Hohenberg, H., and Hwang, B. K. 2000.** *In situ* localization of PR-1 mRNA and PR-1 protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. Protoplasma 211:64-75.

- León, P. y Guevara-García, A. 2007.** La síntesis de isoprenoides a través de la vía MEP; un nuevo blanco de manipulación para la salud y el beneficio humano. Mensaje Bioquímico 31:77-91.
- Leonian, L.H. 1922.** Stem and fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici* sp. nov. Phytopathology 12:401-408.
- Leubner-Metzger G. and Meins, F. 1999.** Functions and regulation of plant β -1,3 glucanases (PR-2). pp. 49-66. In: Datta S.K. and Muthukrishnan S. (Eds.). Pathogenesis-related proteins in plants. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Lichtenthaler, H.K. 2000.** Sterols and isoprenoids. Biochemical Society Transactions 28:785-789.
- Linthorst, H.J. M. 1991.** Pathogenesis-related proteins of plants. Critical Reviews in Plant Sciences 10:123-150
- López-Martínez, N., Colinas-León, M.T., Peña-Valdivia, C.B., Salinas-Moreno, Y., Fuentes-Montiel, P., Biesaga, M., and Zavaleta-Mejía, E. 2010.** Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. Plant Soil (DOI 10.1007/s11104-010-0553-5).
- Maheshwari, T, U., Sharma, S.B., Reddy, D. D. R., and Haware, M.P. 1995.** Co-infection of wilt-resistance chickpeas by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and *Meloidogyne javanica*. Journal of Nematology 27: 649-653.
- Maldonado-Bonilla, L.D., Betancourt-Jiménez, M., and Lozoya-Gloria, E. 2008.** Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. European Journal of Plant Pathology 121:439-449.
- Manzanilla-López, R.H., Costilla, M.A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R.N., Lehman, P.S., Cid del Prado-Vera, I., Souza, R.M., and Evans, K. 2002.** The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. Nematropica 32:149-227.
- Martin, W. J., Newson L. D. and Jones, J. E. 1956.** Relationship of nematodes to the development of Fusarium wilt in cotton. Phytopathology 46:285-289.
- Mendoza, Z. C. 1996.** Enfermedades fungosas de hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. 85 p.

- Mendoza, Z. C. y Pinto, C.B. 1983.** Principios de fitopatología y enfermedades causadas por hongos. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Edo. de México, México.
- Neuhaus, J. M., Sticher, L., Meins, F. Jr. and Boller, T. 1991.** A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88:10362-10366.
- Newman, J.D., and Chappell, J. 1999.** Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 34:95-106.
- Oelke, M.L., Bosland, P.W., and Steiner, P. 2003.** Differentiation of races specific resistance to Phytophthora root rot and roliar blight in *Capsicum annuum*. Journal American Society Horticultural Science 128:213-218.
- Parviz, J. 1985.** El nematodo falso nodulador de la raíz. pp. 47-55. *In:* Fitonematología Avanzada I. Nahúm Marbán M., e Ivan J. Thomason (Eds). Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 345 páginas.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. and Dunand, C. 2005.** Peroxidases have more functions than army knife. Plant Cell Reports 24:255-265.
- Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P., and Djian-Caporalino, C. 2005.** Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolic accumulation in *Capsicum annuum*. Phytopathology 95:158-165.
- Pérez, M. L., y Pérez, V. J. J. 1988.** Interacción *Phytophthora capsici* Leo., *Nacobbus aberrans* en cuatro materiales de Chile (*Capsicum annuum* L.) resistentes al hongo, bajo condiciones de invernadero. Memorias del XV Congreso Nacional de Fitopatología. Xalapa, Veracruz. México. pp. 65.
- Powell, N. T. 1971.** Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. Annual Review of Phytopathology 9:253-274.
- Redondo, J. E. 1979.** Búsqueda de genotipos de Chile resistente al hongo *Phytophthora capsici*. Leonian. Proceedings American Society for Horticultural Science, Región Tropical y del Caribe. México. 23:220-224.

- Redondo-Juárez, E. 1986.** Mecanismos de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici* Leo. Tesis de Doctor en Ciencias en Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Romero-Cova, S. 1988.** Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Texcoco, México. 347 p.
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, E.N., Kim, K.D., Choi, J.Y., Hyung, N.I., and Shin, J.S. 2006.** Constitutive expression of two pathogenesis-related genes in tomato plants enhanced resistance to oomycete pathogen *Phytophthora capsici*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86:7-14.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H. y Rocha-Sosa M. 2003.** La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:355-363.
- Shadle, G.L., Wesley, S.V., Korth, K.L., Chen, F., Lamb, C., and Dixon, R.A. 2003.** Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 64:153-161.
- Shinshi, H., Wenzler, H., Neuhaus, J. M., Felix, G., Hofsteenge, J. and Meins, F. Jr. 1988.** Evidence for N- and C-terminal processing of a plant defense-related enzyme: Primary structure of tobacco prepro- β -1,3-glucanase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:5541-5545.
- Sijmons, P.C. 1993.** Plant-nematode interactions. *Plant Molecular Biology* 23:917-931.
- Silvar, C., Merino, F., and Díaz, J. 2008.** Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 165:1120-1124.
- Stevenson, W. R. 2001.** Podredumbre del fruto y podredumbre de las raíces. pp. 11. *En:* Compendio de plagas y enfermedades del tomate. Jones J. B., J. P. Jones, R. E. Stall y T. A. Zitter (Eds). Ediciones Mundi-Prensa. APS Press. St. Paul Minnesota, United States of America. Edición en Español.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kaufmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., and Fritig, B. 1993.** Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75:687.
- Stoessl, A., Unwin C.H., and Ward, E.W.B. 1973.** Post-infectious inhibitors from plants: fungal oxidation of capsidiol in pepper fruit. *Phytopathology* 63:1225-1231.

- Sun-Hwa, H., Jong-Bum, K., Young-Soo, H., and Shin-Woo, L. 2003.** Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced Hmg2 from pepper (*Capsicum annuum*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1625:253-260.
- Sy, O., Bosland, P.W., and Steiner, R. 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.
- Takahashi, S., Zhao, Y., O'Maille, P. E., Greenhagen, B. T., Noel, J. P., Coates, R. M., Chappel, J. 2005.** Kinetic and Molecular analysis of 5-Epiaristolochene 1,3 dihydroxylase, a cytochrome P450 enzyme catalyzing successive hydroxylations for sesquiterpenes. *Journal of Biological Chemistry* 280:3686-3696.
- Takeuchi, Y., Yoshikawa, M., Takeba, G., Kunisuke, T., Shibata, D., and Horino, O. 1990.** Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, in soybean. *Plant Physiology* 93:673-682.
- Thomason, I.J., Erwin, D.C. and Garber, M. J. 1959.** The relationship of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, to Fusarium wilt in cowpea. *Phytopathology* 49:602-606.
- Trujillo-Viramontes, F., Zavaleta-Mejía, E., Rojas-Martínez, R. I. y Lara, J. 2005.** Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici*, inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile (*Capsicum annuum*). *Nematropica* 35:37-44.
- Ueda, M., Kubota, M., and Nishi, K. 2006.** Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM 334. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67:149-154.
- Upadhyay, K. D., and Dwivedi, K. 1987.** Root-knot nematode *Meloidogyne javanica* breaks wilt resistance in chickpea variety "Avrodhi". *Current Science* 56:915-916.
- Van Loon, L. C. 1976.** Specific soluble leaf proteins in virus-infected tobacco plants are not normal constituents. *Journal of General Virology* 30:375-37.
- Van Loon, L. C. 1985.** Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* 4:111-115.

- Van Loon, L. C. 1999.** Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. pp. 1-12. In: Pathogenesis-related proteins in plants. Datta S. K. and Muthukrishnan, S. (Eds.). CRC Press LLC. USA.
- Van Loon, L. C., and Van Strien, E.A. 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:85-97.
- Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, Th., and Conejero, V. 1994.** Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:245-264.
- Van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. 2006.** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44:135-162.
- Vargas-Escobedo, M. T., Zavaleta-Mejía, E. y Hernández-Anguiano, A.M. 1996.** Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* en chile serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26:159-166.
- Vidhyasekaran, P. 2008.** Induction and evasion of pathogenesis-related proteins. pp: 345-409. In: Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms. Second Edition. CRC Press, USA. 509 p.
- Walker, N. R., Kirkpatrick, T. L., and Rothrock, C. S. 1999.** Effect of temperature on and histopathology of the interaction between *Meloidogyne incognita* and *Thielaviopsis basicola* on cotton. *Phytopathology* 89:613-617.
- Yin, S., Mei, L., Newman, J., Back, K., and Chappell, J. 1997.** Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression. *Plant Physiology* 115:437-451.
- Zamudio, G. V., Carballo, A., and Marbán-Méndoza, N. 1990.** Gama de hospedantes y evaluación del daño de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944, en hortalizas comerciales. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8:9-12.
- Zavala-Páramo, G., Chávez-Moctezuma, M. P., García-Pineda, E., Yin, S., Chappell, J., and Lozoya-Gloria, E. 2000.** Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene synthase gene (*Gpeas1*) from chilli pepper (*Capsicum annuum*). *Physiologia Plantarum* 110:410-418.
- Zavaleta-Mejía, E. 2002.** Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparásitos, una hipótesis. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:118-122.

Zavaleta-Mejía, E., Godínez-Vidal, D., López-Martínez, N., and Villar-Luna, E. 2009.

Changes induced by *Nacobbus aberrans* which could be related to *Phytophthora capsici* breaking of resistance in chilli. II International Congress of Tropical Nematology/XV Annual Meeting Organization of Nematologists of Tropical America. October 4-8. Maceió Alagoas State, Brazil. Resumen S31-1.

CAPITULO II

GENES DE DEFENSA, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CONTENIDO DE CAPSIDIOL EN CHILE CM-334 INOCULADO CON *Phytophthora capsici*

RESUMEN

Con la finalidad de aportar información que ayude al entendimiento de los mecanismos que restringen la colonización y reproducción del oomiceto *Phytophthora capsici* en las raíces de plantas de chile CM-334 resistente al oomiceto, la presente investigación tuvo por objetivos: 1) comparar mediante PCR en tiempo real la acumulación de transcritos de los genes *POX* (peroxidasa), *GLU* (β -1,3-glucanasa), *PR-1* (proteína PR1) y *EAS* (5-*epi*-aristoloxeno sintasa), relacionados con la defensa, en raíces de plantas de chile CM-334 inoculadas y no inoculadas con el oomiceto; y 2) comparar la actividad enzimática total de peroxidasas y glucanasas, y el contenido de capsidiol. En las raíces de chile CM-334 inoculadas con *P. capsici* se incrementaron de manera significativa los niveles relativos de los genes *POX*, *GLU* y *PR-1* desde las 6 h posteriores a la inoculación (hpi) y los mayores incrementos (15.4, 10.1 y 8.5 veces más, respectivamente) se registraron a las 48 hpi en comparación con las de las plantas no inoculadas. También el gen *EAS*, se incrementó considerablemente desde las 6 hpi, (16.3 veces más), pero a diferencia de los otros genes la máxima acumulación (23 veces) se registró a las 12 hpi. La actividad de glucanasas y peroxidasas en las raíces de las plantas inoculadas fue mayor desde las 6 hpi y se incrementó a medida que transcurrió el tiempo posterior a la inoculación con el oomiceto. Para ambas enzimas el incremento de su actividad fue significativo ($P \leq 0.05$) a las 12, 24 y 48 hpi en raíces inoculadas con *P. capsici*. El contenido de capsidiol en plantas CM-334 inoculadas fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) con respecto a las plantas no inoculadas; los incrementos fueron de 69.7 %, 165.1 %, 259.1 %, y 386.7 % a las 6, 12, 24 y 48 hpi, respectivamente.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, *Phytophthora capsici*, capsidiol, genes *EAS*, *GLU*, *POX* y *PR-1*, proteínas relacionadas con patogénesis.

INTRODUCCIÓN

En México, el chile (*Capsicum annuum* L.) es una de las especies hortícolas de gran importancia económica y social. Sin embargo, un factor limitante en la productividad del cultivo es la marchitez causada por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leo. (González-Pérez *et al.*, 2004). El control se ha realizado mediante prácticas culturales y el empleo de fungicidas sintéticos; sin embargo, se considera que el uso de variedades resistentes representa una estrategia alternativa amigable con el ambiente para el manejo de esta enfermedad y de otras inducidas por fitopatógenos con origen en el suelo (Pérez-Moreno *et al.*, 1990). La línea Criollo de Morelos 334 (CM-334) del chile tipo serrano, es altamente resistente al oomiceto y su resistencia se ha mantenido aún cuando se ha inoculado con las cepas más patogénicas (Bonnet *et al.*, 2007; Kim y Kim, 2009) y actualmente se le considera como el resistente universal a *P. capsici* (Glosier *et al.*, 2008; Oelke *et al.*, 2003).

Las plantas como resultado del proceso de coevolución con sus patógenos han desarrollado diferentes mecanismos de defensa contra ellos, tanto de tipo constitutivo como inducido; los mecanismos constitutivos incluyen barreras físicas (como la cutícula y la pared celular) y compuestos tóxicos preexistentes que inhiben el crecimiento del patógeno. Los inducidos, se disparan en el momento en que el patógeno intenta invadir al hospedante y consisten en la formación de barreras físicas (como capas de corcho y deposición de calosa, entre otras), la acumulación de compuestos tóxicos como las fitoalexinas, y producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs), todo lo anterior como resultado de la activación de la expresión de genes. En algunos casos la planta presenta una respuesta de hipersensibilidad (RH), la cual es considerada la máxima expresión de resistencia (Fernández *et al.*, 1998; Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003). Todas las plantas, tanto susceptibles como resistentes poseen dichos mecanismos, y la compatibilidad e incompatibilidad hospedante-patógeno esta determinada por el grado de coordinación entre las diferentes estrategias de defensa, la rapidez, y la magnitud con la que ocurre la expresión de genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos que forman barreras físicas y químicas que restringen el crecimiento y reproducción del patógeno (Silvar *et al.*, 2008).

En el caso particular de materiales de Chile resistentes a *P. capsici*, la evidencia experimental hasta ahora generada, indica que su resistencia al oomiceto puede explicarse por diferentes mecanismos, que involucran: incrementos en la actividad de las enzimas β -1,3-glucanasa (Egea *et al.* 1999), fenil alanina amonio liasa (PAL) y peroxidasas ácidas; cambios en compuestos fenólicos con propiedades tóxicas (Candela *et al.* 1995; Fernandez-Pavia, 1997) e incremento en la síntesis de la fitoalexina capsidiol (Egea *et al.* 1996a). Además de los transcritos de la PR β -1,3-glucanasa (de la familia PR-2), también se han reportado incrementos rápidos y abundantes de transcritos de otras PRs que son miembros de las familias PR-1, PR-3 (quitinasas) y PR-9 (peroxidasas); y por consiguiente se ubican como parte importante de los mecanismos de defensa contra el oomiceto (Egea *et al.*, 1999; Kim y Hwang, 2000; Hong y Hwang, 2005). Las PRs en general se consideran como uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas (Van Loon *et al.*, 2006).

El capsidiol es la fitoalexina sesquiterpenica más importante en Chile y su acumulación en las zonas de infección inhibe o restringe el crecimiento de *P. capsici* durante la interacción incompatible *P. capsici*-Chile (Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000). La enzima clave en la biosíntesis de la fitoalexina es la 5-*epi*-aristolóqueno sintasa, codificada por el gen *PEAS* (Zavala-Páramo *et al.*, 2000).

Con base en estos antecedentes y con la idea de aportar información que ayude al entendimiento de los mecanismos que restringen la colonización y reproducción de *P. capsici* en las raíces de plantas de Chile CM-334 resistente al oomiceto, la presente investigación tuvo por objetivos: 1) comparar mediante PCR en tiempo real la acumulación de transcritos de los genes *POX*, *GLU*, *PR-1* y *EAS* relacionados con la defensa, en raíces de plantas de Chile CM-334 inoculadas y no inoculadas con el oomiceto; y 2) comparar la actividad enzimática total de peroxidasas y glucanasas, y el contenido de capsidiol.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de los experimentos. Plántulas de Chile CM-334 se crecieron en macetas conteniendo arena esterilizada y se mantuvieron en cámara de crecimiento a 26 °C \pm 1° C con un fotoperiodo de 14 h luz y 10 h oscuridad. El aislamiento 6143 de *P. capsici*

usado en este trabajo fue proporcionado por la Dra. Sylvia Patricia Fernández-Pavía (Profesora de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). El cultivo del oomiceto, la inducción de la esporulación y la cuantificación de zoosporas se realizó de acuerdo a lo reportado por Villar-Luna y colaboradores (2009). En cada ensayo se tuvieron dos tratamientos, plantas inoculadas con *P. capsici* y plantas testigo no inoculadas, para cada tratamiento se establecieron 52 plantas. Las plantas se inocularon con 300,000 zoosporas cuando presentaron de cinco a seis hojas verdaderas. Para corroborar, tanto la patogenicidad del aislamiento como la eficacia de la inoculación, 10 plantas de chile del cv. J. E. Parker susceptible a *P. capsici* fueron también inoculadas. El experimento completo se repitió una vez. A las 6, 12, 24 y 48 horas posteriores a la inoculación (hpi) con el oomiceto, de cada tratamiento se tomaron 13 plantas para cada tiempo, se cortaron las raíces, se lavaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real. El RNA total de raíces de chile se extrajo a partir de 0.5 g de tejido congelado usando el Kit RNeasy® (QIAGEN) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El RNA se almacenó a -80 °C. La calidad e integridad del RNA se verificó en gel de agarosa desnaturalizante al 1.2%.

La síntesis de cDNA se realizó en dos pasos: 1) la primera mezcla de reacción estuvo constituida por 2 µg de RNA total, 0.4 µL de oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen®), se aforó a un volumen de 12 µL con agua libre de RNAsas y DNAsas y se incubó a 70 °C por 10 min, al terminar se colocó la mezcla en hielo, 2) a esta primera mezcla de reacción se le adicionaron 8 µL de una segunda mezcla, la cual consistió de 4 µL de amortiguador 5x para retrotranscripción, 2 µL de ditiotreitól (0.1 M), 1 µL dNTP mix (10 mM) y 1 µL de la retrotranscriptasa (M-MLV Reverse transcriptase -Promega®-). La mezcla se colocó en un termociclador (BIO-RAD®) durante 60 min a 37 °C y 10 min a 70 °C.

Los pares de oligonucleótidos utilizados en el estudio se muestran en el Cuadro 1; con excepción de los oligos para el gen *PR-1*, los demás se diseñaron usando la opción de Primer Select del programa DNASTAR® a partir de las secuencias de genes disponibles en el GenBank del NCBI. La mezcla de reacción de PCR en tiempo real consistió de 2.5 uL de buffer 10X para PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pm de cada primer, 2 mM de dNTP

mix, 1:40,000 SYBR® Green (Molecular Probe, Eugene, OR), 10 nM de fluoresceína, 1 µL de cDNA, 0.125 uL de Amplicasa (Biogenica®) y se aforó a un volumen de 25 µL con agua libre de RNAsas y DNAsas, en un sistema estándar de PCR en tiempo real ABI7500 (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 94 °C/4 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C/0.30 s, 60 °C/30 s y 72 °C/30 s extensión. Las identidades de los productos que se amplificaron con los oligonucleótidos que se diseñaron en el presente estudio, se corroboraron mediante la purificación de los productos de PCR con el Kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) y su posterior secuenciación en el IBT (UNAM). El gen de gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GAPDH) se usó como gen de expresión constitutiva para normalizar la expresión y las plantas no inoculadas representaron la expresión 1x del gen de interés. El cálculo de la expresión relativa de cada gen se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Para cada tratamiento se realizaron seis determinaciones por tiempo evaluado.

Cuadro 1. Oligonucleótidos usados para analizar la acumulación de algunos genes relacionados con la defensa en plantas de CM-334 inoculadas con *P. capsici*.

Gen	Acceso	Referencia	Primer		
			Nombre	Secuencia primer (5' - 3')	Amplicón
Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (<i>GAPDH</i>)	AJ246011	DPE	GLIFW GLIRV	GGCCTTATGACTACAGTTCCTCC GATCAACCACAGAGACATCCACAG	217 pb
PR-1 (<i>CABPRI</i>)	AF053343	Gayoso <i>et al.</i> , 2007	PR1FW PR1RV	GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT CAAGCAATTATTTAAACGATCCA	301 pb
Peroxidasa (<i>CAPO1</i>)	AF442386	DPE	POXFW POXRV	CCAGTACGTGCCCAAGAGCTG GGATGCGTCGATTGAAGGGTC	560 pb
β- 1,3-glucanasa (<i>CABGLU</i>)	AF227953	DPE	GLUFW GLURV	GAGGCTCCAACATTGAAGTTATG CATCTGTACCACCACATTAGGTGC	480 pb
5- <i>epi</i> -aristolóqueno sintasa (<i>PEAS</i>)	AJ005588	DPE	EASFW EASREV	GCTCAAGAAATTGAACCGCCGAAG TCTTCATTATAGACATCGCCCTCG	200 pb

DPE: diseñados en el presente estudio. *CABPRI*=PR-1; *CAPO1*=POX; *CABGLU*=GLU; *PEAS*=EAS.

Extracción de proteína y actividad enzimática de peroxidases. La extracción de proteína se hizo a partir de 0.2 g de tejido macerándolo en un mortero que contenía buffer frío de Tris-HCL 50 mM, pH 7.5. El extracto se centrifugó a 12,000 g a 4 °C por 5 min y el sobrenadante recuperado se almacenó a -20 °C. La concentración de proteínas se determinó con el Kit Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para lo cual se utilizó albúmina sérico-bovina, fracción V (Sigma), como estándar. La actividad de peroxidases se determinó con el incremento de absorbancia a 470 nm debido a la formación de tetraguaiacol (Hammerschmidt *et al.*, 1982). La mezcla de reacción consistió de 220 µL de amortiguador de Tris-HCl (50mM, pH 7.5), 15 µL de peróxido de hidrógeno a 0.25 %, 25 µL de guaiacol 0.1 M y 5 µg de proteína total. La actividad enzimática se reportó como µmoles de tetraguaiacol µg⁻¹ de proteína. Se realizaron dos extracciones por cada tiempo de cada tratamiento y cada extracción se cuantificó por triplicado.

Extracción de proteína y actividad enzimática de glucanasas. Se maceró 0.25 g de tejido de raíces usando como buffer acetato de sodio 0.05 M, pH 5.2. El extracto se centrifugó a 15,000 g a 4 °C por 10 min y el sobrenadante recuperado se almacenó a -20 °C. La actividad de β-1,3-glucanasas se determinó usando el ensayo de laminarina-ácido dinitrosalicílico de Abeles y Forrence (1970) con algunas modificaciones. A 25 µL de extracto crudo de la enzima se le adicionó 25 µL de laminarina al 1% y se incubó a 40 °C durante 10 min. La reacción se detuvo adicionando 375 µL de ácido dinitrosalicílico y calentando por 5 min en agua hirviendo (100 °C). Enfriada la solución ésta se agitó en vortex y se leyó la absorbancia a 500 nm. El blanco consistió del extracto de la enzima y laminarina con cero tiempos de incubación. La reducción de azúcar se calculó usando una curva estándar de glucosa. Una unidad de actividad de β-1,3-glucanasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de glucosa por 10 min, bajo las condiciones arriba citadas (Pan *et al.* 1991). Se realizaron dos extracciones por cada tiempo de cada tratamiento, y cada extracción se cuantificó por triplicado.

Extracción y cuantificación de capsidiol. El capsidiol se extrajo de acuerdo a la metodología descrita por Egea *et al.* (1996b), con algunas modificaciones. De cada tratamiento y tiempo se tomó una muestra de 0.5 g de tejido radical, se maceró por 30 s en N líquido y posteriormente por 1 min en una mezcla de cloroformo y metanol (2:1). Cada

extracto se filtró y evaporó a sequedad a temperatura ambiente y se redisolvió en cloroformo para su análisis por cromatografía en capa fina, la cual se desarrolló con una mezcla de hexano:acetato de etilo (1:6) utilizando placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck®). Las muestras fueron cromatografiadas en banda y eluidas conjuntamente con una muestra de capsidiol puro. Se recortó la porción correspondiente al estándar, la cual se reveló con una disolución de sulfato cérico amoniacal 2N en H₂SO₄ y se confrontó físicamente con la porción eluida y no revelada de cada tratamiento, las regiones correspondientes al R_f = 0.28 característico del capsidiol se rasparon, se lavaron con cloroformo, se filtraron y evaporaron a sequedad.

La estimación del contenido de capsidiol se realizó siguiendo la metodología descrita por Chávez y Lozoya (1996), con algunas modificaciones. Las muestras se redisolvió en 250 µL de metanol y, para la cuantificación se preparó una mezcla de reacción de extracto y vainillina 2% en ácido sulfúrico en relación 1:1, la cual se incubó a temperatura ambiente durante 40 min y se leyó a una longitud de onda de 640 nm en un Nanodrop®. Para la cuantificación de la fitoalexina se utilizó una curva estándar previamente preparada con concentraciones conocidas de capsidiol puro, aislado e identificado por nuestro grupo de investigación (Villar-Luna *et al.* 2009).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza para un modelo completamente al azar con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1999), y para la comparación de medias de tratamiento se aplicó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS

Niveles relativos de genes relacionados con la defensa. En comparación con las plantas testigo no inoculadas, en raíces de chile CM-334 tratadas con *P. capsici*, se registró una acumulación significativamente mayor de transcritos de los genes evaluados (*EAS*, 5-*epi*-aristolóqueno sintasa; *POX*, peroxidasa; *GLU*, β-1,3-glucanasa; y *PR-1*, proteína PR1); de ellos el gen *EAS* presentó el mayor incremento, 23 veces con respecto al testigo (Fig. 1). Los transcritos de los genes *POX*, *GLU* y *PR-1* se detectaron desde las 6 hpi en el tratamiento con el oomiceto, incrementándose gradualmente hasta las 48 hpi cuando se registró el máximo valor. De igual manera, el gen *EAS*, responsable de codificar para la

enzima 5-*epi*-aristoloueno sintasa clave en la síntesis de la fitoalexina capsidiol, se incrementó considerablemente desde las 6 hpi, 16.3 veces respecto al testigo, pero alcanzó la máxima acumulación (23 veces) a las 12 hpi y posteriormente declinó drásticamente a 9.4 y 5.5 veces a las 24 y 48 hpi, respectivamente.

De los genes que codifican para la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis, el gen *POX* destacó con un incremento de 15.4 veces, seguido por *GLU* (10.1 veces) y *PR-1* (8.5 veces) a las 48 hpi con el oomiceto.

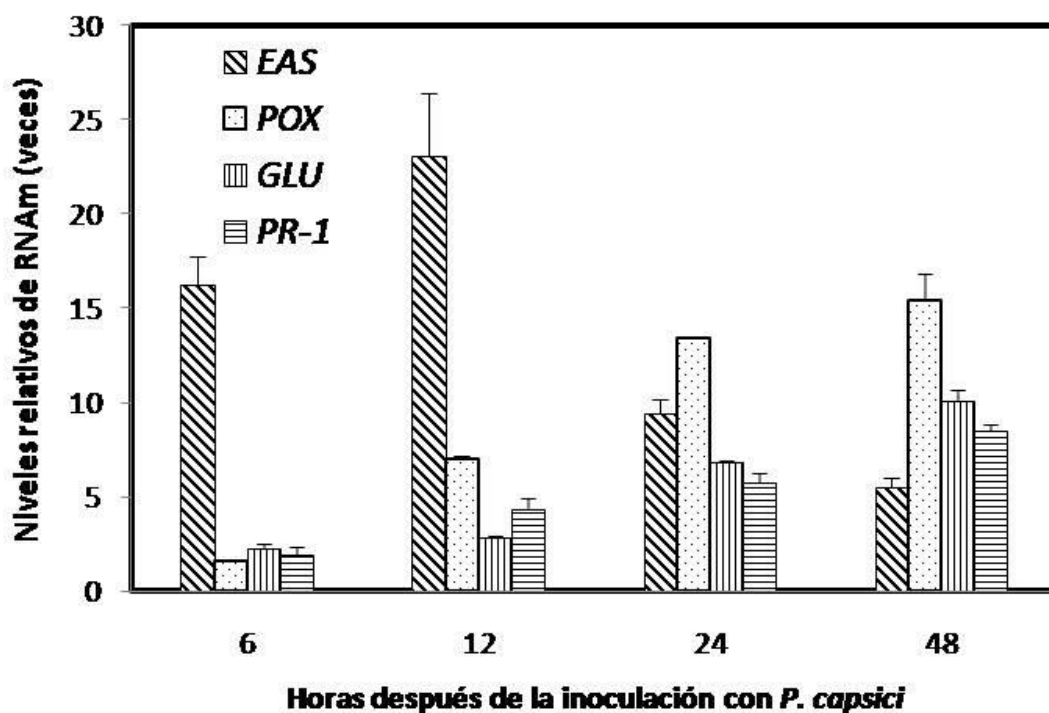


Fig. 1. Niveles relativos de expresión de genes relacionados con la defensa en raíces de plantas de chile CM-334 inoculadas con *P. capsici* respecto a las plantas no inoculadas. *EAS* = 5-*epi*-aristoloueno sintasa, *POX*= peroxidasa, *GLU*= β -1,3-glucanasa y *PR-1*. Cada barra representa el promedio de dos experimentos independientes con seis determinaciones cada uno. La línea de cada barra representa la desviación estándar.

Actividad enzimática. La actividad de glucanasas y peroxidadasas en las raíces de las plantas testigo no inoculadas, se mantuvo relativamente constante a lo largo de los cuatro tiempos evaluados (Fig. 2A y 2B); en contraste, en las plantas de chile CM-334

inoculadas con el oomiceto la actividad de las enzimas se incrementó desde las 6 hpi y fue acrecentándose a medida que transcurrió el tiempo posterior a la inoculación. Para ambas enzimas el incremento de su actividad fue significativo ($P \leq 0.05$) a las 12, 24 y 48 hpi en raíces inoculadas con *P. capsici*.

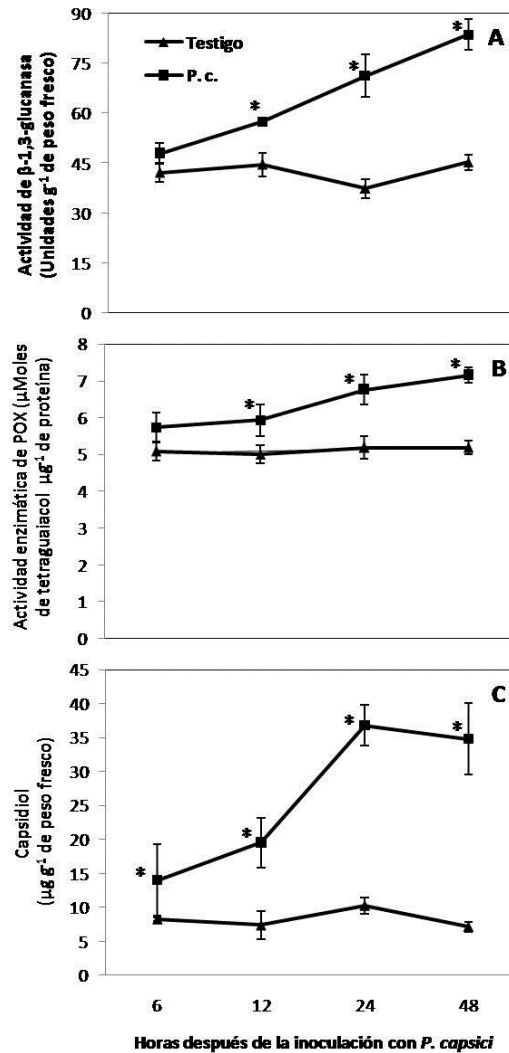


Fig. 2. Actividad enzimática total de β -1,3-glucanasas (A), peroxidadas (B) y contenido de la fitoalexina capsidiol (C) en raíces de chile CM-334 inoculadas (P. c) y no inoculadas con *P. capsici* (Testigo). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes, de cada uno se realizaron dos extracciones y de cada extracción se hicieron tres lecturas; la línea en cada punto representa la desviación estándar. Para cada tiempo el asterisco indica diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre el tratamiento testigo y el infectado por el oomiceto.

Contenido de capsidiol. El contenido de capsidiol en las raíces de plantas CM-334 no inoculadas se mantuvo más o menos constante sin incrementos significativos durante el período de evaluación; en cambio los niveles de esta fitoalexina fueron significativamente mayores ($P \leq 0.05$) en las plantas inoculadas con *P. capsici* (Fig. 2C). Los incrementos fueron de 69.7 %, 165.1 %, 259.1 % y 386.7 % a las 6, 12, 24 y 48 hpi, respectivamente.

DISCUSIÓN

Las plantas exhiben defensas constitutivas e inducidas contra el ataque por patógenos. Sin embargo, la compatibilidad e incompatibilidad hospedante-patógeno está determinada por el grado de coordinación entre las diferentes estrategias de defensa, la rapidez y la magnitud con la que ocurre la expresión de genes que codifican para la síntesis de metabolitos que inhiben el crecimiento del patógeno (Silvar *et al.*, 2008). En general, en las interacciones chile-*P. capsici* tanto de tipo compatibles como incompatibles ocurren cambios en: la acumulación de PRs (Kim y Hwang, 1994; Egea *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000), el contenido de capsidiol (Egea *et al.*, 1996a) y la expresión de genes (Hong y Hwang, 2005; Silvar *et al.*, 2008); así como alteraciones citológicas (Hwang, 2001). Tales cambios son más rápidos y de mayor magnitud en las interacciones incompatibles. En la interacción incompatible CM-334-*P. capsici* del presente estudio, también hubo diferencias importantes en la expresión de transcritos de genes de defensa, el contenido de la fitoalexina capsidiol, y en la actividad de β -1,3-glucanasas y peroxidasas, con respecto a las plantas no inoculadas.

En la interacción incompatible CM-334-*P.capsici*, hubo una sobre expresión de los transcritos de los genes *GLU* y *POX*, la cual se asoció con incrementos significativos en la actividad de las enzimas respectivas. También se obtuvieron incrementos significativos de transcritos de los genes *PR-1* y *EAS*, y de la fitoalexina capsidiol. En congruencia con lo reportado por varios investigadores para otros genotipos de chile resistentes al oomiceto (Egea *et al.*, 1999; Jung y Hwang, 2000; Lee *et al.*, 2000; Do *et al.*, 2003; Silvar *et al.*, 2008), nuestros resultados soportan la idea de que tales genes y compuestos podrían estar directamente involucrados en la resistencia de CM-334 a *P.capsici*.

La acumulación de transcritos del gen *POX* y el correspondiente incremento en la actividad de peroxidasas sugiere que este gen está involucrado en la respuesta de defensa de CM-334 contra *P. capsici*. Se ha consignado que la expresión de *POX* y la actividad de peroxidasas se incrementa en las plantas como resultado del ataque por patógenos (Van Loon *et al.*, 2006). Las peroxidasas contribuyen a la resistencia de las plantas al crear un ambiente tóxico por la acumulación de especies reactivas de oxígeno y al participar en el reforzamiento de la pared celular por la deposición de los polímeros lignina y suberina, que constituyen una barrera física al avance del patógeno (Passardi *et al.* 2005). Silvar y colaboradores (2008) al inocular plantas de Chile (cv. CM-331) resistente a *P. capsici*, encontraron que a las 24 hpi la expresión del RNAm del gen *CAPO1* que codifica para peroxidasa, se incrementó 11.6 veces respecto a las plantas sin inocular, mientras que en las plantas del cv susceptible Yolo Wonder, la expresión del gen *CAPO1* fue tres veces menor que en el cultivar resistente. De igual forma, Do *et al.* (2003) reportaron que en plantas de Chile del cv Hanbyul inoculadas con los aislamientos de *P. capsici* S197 (compatible) y CBS178.26 (incompatible), la expresión del gen *CAPO1* fue más rápida y abundante en la interacción incompatible en comparación con la compatible.

El incremento significativo en la expresión de transcritos del gen *PR-1* en la interacción CM-334-*P. capsici* obtenido en nuestro estudio, concuerda con lo reportado por Kim y Hwang (2000). Estos investigadores observaron que en la interacción incompatible Chile cv. Hanbyul-*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (aislamiento Bv5-4a) la acumulación de los RNAm del gen *CABPR-1*, que codifica para una proteína PR-1, fue más rápida, más prolongada y de mayor magnitud que aquella de la interacción compatible Chile cv. Hanbyul-*X. campestris* pv. *vesicatoria* (aislamiento Ds1). La función y el mecanismo de acción de las proteínas PR-1 en patogénesis es todavía desconocida, sin embargo, el hallazgo consignado por Lee y colaboradores (2000) respecto a que las proteínas PR-1 se acumularon en los espacios intercelulares y en la interface entre el patógeno (*P. capsici*) y las células de la planta de Chile (cv. Hanbyul), sugiere que éstas podrían participar en la defensa contra el oomiceto, ejerciendo un efecto tóxico directo que retrasa el desarrollo del patógeno.

Por un lado, el incremento tanto de la acumulación de transcritos del gen *GLU* como de la actividad de la enzima correspondiente en la interacción chile-*P. capsici*, y por el otro, el marcado incremento que ocurre en las interacciones incompatibles comparado con aquel de las compatibles, sustentan la idea de que las β -1,3-glucanasas están asociadas con las respuestas de defensa (Kim y Hwang, 1997; Jung y Hwang, 2000). Egea *et al.* (1999) al contrastar la expresión del gen que codifica para β -1,3-glucanasa en la interacción incompatible Smith-5-*P. capsici* con la compatible Yolo Wonder-*P. capsici*, encontraron que la expresión fue de mayor magnitud y más duradera en las plantas del cv Smith-5 con respecto a la interacción compatible, la cual disminuyó a los 3 dpi; también, la actividad total de β -1,3-glucanasas fue mayor en la interacción incompatible en comparación con la compatible y en esta última, la acumulación tardía de β -1,3-glucanasas no previno el crecimiento del patógeno. Las β , 1-3 glucanasas degradan la pared celular de los oomicetos al hidrolizar la β , 1-3 glucana que es su mayor componente. Además del efecto directo sobre el patógeno, la enzima también puede mediar las respuestas de defensa de las células vecinas, ya que los fragmentos de glucana liberados de la pared celular del patógeno o de la planta, pueden funcionar como elicitores para activar otras respuestas de defensa (Takeuchi *et al.*, 1990).

De los genes estudiados, *EAS* destacó por su mayor y más rápida acumulación, sugiriendo que este gen es uno de los primeros que se expresa en las plantas CM-334 en respuesta a la inoculación con *P. capsici*. La expresión del gen *EAS* como consecuencia de la inoculación con *P. capsici* en plantas de chile de diferentes cultivares ha sido reportada por varios autores (Zavala-Páramo *et al.*, 2000; Sun-Hwa *et al.*, 2003). Por ejemplo, Zavala-Páramo y colaboradores (2000) mencionan que la inoculación de *P. capsici* en plantas de chile de la var. Sonora Anaheim, indujo una expresión fuerte del gen *EAS* (*PEAS*) a las 24 h después de haber sido inoculadas con el oomiceto, mientras que en las plantas no inoculadas no se detectó la expresión del gen. Por su parte, Mandujano y colaboradores (2000) en investigaciones con cultivos celulares de tabaco tratados con un elicitador fúngico, determinaron que a las 36 h posteriores a la estimulación se incrementó la actividad de una sesquiterpeno ciclasa, la cual se correlacionó con la acumulación de capsidiol.

La continua acumulación del capsidiol en raíces de CM-334 inoculadas con *P. capsici*, registrada a lo largo de las evaluaciones, indica la importancia de la fitoalexina como parte de los mecanismos de resistencia de este genotipo al oomiceto. Se considera que el capsidiol es la principal fitoalexina sintetizada en Chile, y la magnitud de su acumulación se asocia con el grado de resistencia a *P. capsici* en diversos genotipos de Chile (Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000). La toxicidad del capsidiol a *P. capsici* ha sido demostrada por varios investigadores (Ward *et al.*, 1974; Egea *et al.*, 1996a).

En la interacción incompatible Chile CM-334-*P. capsici* estudiada, las plantas inoculadas con el oomiceto mostraron un incremento significativo en la acumulación de transcritos de los genes *GLU* y *POX*, hecho que se asoció con incrementos considerables en la actividad de β -1,3-glucanasas y peroxidasas, respectivamente. De igual manera, los transcritos de los genes *PR-1* y *EAS* (5-*epi*-aristolóqueno sintasa) y el contenido de la fitoalexina capsidiol, se incrementaron significativamente.

LITERATURA CITADA

- Abeles, F.B., and Forrence, L.E. 1970. Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 45:395-400.
- Bonnet, J., Danan, S., Boudet, C., Barchi, L., Sage-Palloix, A.M., Caromel, B., Palloix, A., and Lefebvre. 2007. Are the polygenic architecture of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper?. *Theoretical and Applied Genetics* 115:253-264.
- Candela, M.E, Alcázar M.D., Espín, A, Egea, C., and Almela, L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44: 116-123.
- Candela, M.E., Egea, C., Garcia, P.M.D, Costa, J., and Candela, M. 2000. Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Horticulturae* 522: 79-86.
- Chávez, M.M.P., and Lozoya, G.E. 1996. Biosynthesis of the sesquiterpenic phytoalexin capsidiol in elicited root cultures of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Reports* 15:360-366.

- Do, H.M., Hong, J.K., Jung, H.W., Kim, S.H., Ham, J.H., and Hwang, B.K. 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 Interactions* 16:196-205.
- Egea, C., Alcázar, M.D., and Candela, M.E. 1996a.** Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 98:737-742.
- Egea, C., Garcia, P.M.D., and Candela, M.E. 1996b.** Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 149:762-764.
- Egea, C., Dickinson, M. J., Candela, M., and Candela, E. 1999.** β-1,3-glucanasa isoenzymes and genes in resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 107:312-318.
- Fernández, A., Peteira, B., Solórzano, E., Díaz, M. y León, O. 1998.** Mecanismos bioquímicos de defensa en la interacción hospedante-patógeno. *Revista Protección Vegetal* 13:1-12.
- Fernandez-Pavia, S. 1997.** Host-Pathogen interactions in the root rot *Phytophthora capsici*/*Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph D. Dissertation. New México State University. 109 p.
- Gayoso, C., Martínez de Iarduya O., Pomar, R., and Merino, F. 2007.** Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. *European Journal of Plant Pathology* 118:199-209.
- Glosier, B.R., Ogundiwin, E.A., Sidhu, G.S., Sischo, D.R., and Prince, J.P. 2008.** A differential series of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica* 162:23-30.
- González-Pérez, E., Yáñez-Morales, M., Santiago-Santiago, V. y Montero-Pineda, Ángel. 2004.** Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. *Agrociencia* 38:653-661.
- Sun-Hwa, H., Jong-Bum, K., Young-Soo, H., and Shin-Woo, L. 2003.** Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced Hmg2 form pepper (*Capsicum annuum*). *Biochimica et Biophysica Acta* 1625: 253-260.

- Hammerschidt, R., Nuckles, E.M., and Ku, F. 1982.** Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology* 20:73-82.
- Hong, J. K., and Hwang B. K. 2005.** Functional characterization of PR-1 protein, β -1,3-glucanase and chitinase genes during defense response to biotic and abiotic stresses in *Capsicum annuum*. *The Plant Pathology Journal* 21:195-206.
- Hwang, B.K., 2001.** Cytology, physiology and molecular genetics of resistance to *Phytophthora* blight in pepper plants. *The Plant Pathology Journal* 17:9-21.
- Jung, H. W., and Hwang, B. K. 2000.** Pepper gene encoding a basic β -1,3-glucanase is differentially expressed in pepper tissues upon pathogen infection and ethephon or methyl jasmonate. *Plant Science* 159:97-106.
- Kim, S.G., and Kim, Y.H. 2009.** Histological and cytological changes associated with susceptible and resistant responses of chili pepper root and stem to *Phytophthora capsici* infection. *The Plant Pathology Journal* 25:113-120.
- Kim, Y. J., and Hwang, B. K. 1994.** Differential accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiology Molecular Plant Pathology* 45:195-209.
- Kim, Y. J., and Hwang, B. K. 1997.** Isolation of a basic 34-kDa β -1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems. *Physiology Molecular Plant Pathology* 50:103-115.
- Kim, Y. J., and Hwang, B. K. 2000.** Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia plantarum* 108:51-60.
- Lee, Y. K., Hippe-Sanwald, S., Lee, S. Ch., Hohenberg, H., and Hwang, B. K. 2000.** *In situ* localization of PR-1 mRNA and PR-1 protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. *Protoplasma* 211:64-75.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T. D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Mandujano, C. A., Schoenbeck, M. A., Ralston, L. F., Lozoya, G. E., and Chappell, J. 2000.** Differential induction of sesquiterpene metabolism in tobacco cell suspension cultures by methyl jasmonate and fungal elicitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 381:285-294.

- Oelke, M.L., Bosland, P.W., and Steiner, P. 2003.** Differentiation of races specific resistance to *Phytophthora* root rot and roliar blight in *Capsicum annuum*. Journal American Society Horticultural Science 128:213-218.
- Pan, S.Q., Ye, S.X., and Kuc, J. 1991.** Asociation of β - 1,3- glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. Physiological and Molecular Plant Pathology 39:25-39.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. and Dunand, C. 2005.** Peroxidases have more functions than army knife. Plant Cell Reports 24: 255-265.
- Pérez-Moreno, L., Medina, L. O., y Salinas, G. J. G. 1990.** Control genético y químico de la marchitez del chile *Capsicum annuum* L. causada por el hongo *Phytophthora capsici* Leo., en la región de Irapuato, Guanajuato, México. Revista Mexicana de Fitopatología 8:71-76.
- SAS Institute. 1999.** SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA. 1028 p.
- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H. y Rocha-Sosa M. 2003.** La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 355-363.
- Silvar, C., Merino, F., and Díaz, J. 2008.** Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. Journal of Plant Physiology 165: 1120-1124.
- Takeuchi, Y., Yoshikawa, M., Takeba, G., Kunisuke, T., Shibata, D., and Horino, O. 1990.** Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, in soybean. Plant Physiology 93:673-682.
- Van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. 2006.** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44:135-162.
- Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R. I., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A. M., y Zavaleta-Mejía, E. 2009.** Respuesta hipersensitiva en el follaje de chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *N. aberrans*. Nematropica 39:143-155.

- Ward, E.W.B., Unwin, CH., Stoessl A. 1974.** Post infectious inhibitors from plants. III. Fungitoxicity of the phytoalexin capsidiol and related sesquiterpenes. Canadian Journal of Botany 52:2481-2488.
- Zavala-Páramo, G., Chávez-Moctezuma, M. P., García-Pineda, E., Yin, S., Chappell, J., and Lozoya-Gloria, E. 2000.** Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene synthase gene (*Gpeas1*) from chilli pepper (*Capsicum annuum*). Physiologia Plantarum 110:410-418.

CAPITULO III

GENES DE DEFENSA, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y CONTENIDO DE CAPSIDIOL EN CHILE CM-334 RESISTENTE A *Phytophthora capsici* E INFECTADO POR *Nacobbus aberrans*

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la acumulación de transcritos de los genes *POX* (peroxidasa), *GLU* (β -1,3-glucanasa), *PR-1* (proteína PR1) y *EAS* (5-*epi*-aristoloueno sintasa), la actividad enzimática de peroxidasas, glucanasas y el contenido de capsidiol en raíces de CM-334 inoculadas con *N. aberrans* (*Na*), *P. capsici* (*Pc*) y la combinación de ambos patógenos. Cada planta de CM-334 se inoculó con 2000 J₂ de *N. aberrans* y/o 300,000 zoosporas de *P. capsici*. A las 6, 12, 24 y 48 h posteriores a la inoculación (hpi) con el oomiceto se analizó por PCR en tiempo real la acumulación de los genes mencionados, y se determinó la actividad de las enzimas y el contenido del capsidiol. En Chile CM-334 inoculado sólo con *Pc* los transcritos de *EAS* mostraron la máxima acumulación (23.4 veces) a las 6 hpi, mientras que en la interacción *Na-Pc* para este mismo tiempo, se registró una reducción significativa (6.9 veces) de los transcritos del gen. En el tratamiento de *Na-Pc* la máxima acumulación de *EAS* fue de 12 veces, después declinó a 7.3 y 6.5 veces a las 24 y 48 hpi, respectivamente. En la interacción CM-334-*N. aberrans* se observó niveles bajos de transcritos de *EAS*, así como de los genes PRs, lo cual contrastó significativamente con la acumulación en la interacción CM-334-*P. capsici*. Los transcritos de PRs se detectaron desde las 6 hpi, incrementándose gradualmente hasta las 48 hpi. La actividad de β -1,3-glucanasas y peroxidasas en CM-334 inoculadas con *Na* fue baja con respecto a las inoculadas con *Pc* o ambos patógenos, donde la actividad fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) a las 12, 24 y 48 hpi. En las raíces de plantas CM-334 inoculadas sólo con el nematodo se encontraron reducciones en el contenido de capsidiol de 31.6, 54.4, 57.2 y 66.6% con respecto a las inoculadas sólo con *Pc*; en cambio en las raíces en donde estuvo presente el oomiceto, tratamientos *Pc* y *Na-Pc*, se encontraron niveles significativamente ($P \leq 0.05$) más altos.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, *Nacobbus aberrans*, *Phytophthora capsici*, capsidiol, genes *EAS*, *GLU*, *POX* y *PR-1*, proteínas relacionadas con patogénesis.

INTRODUCCIÓN

La marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) ocasionada por el oomiceto *Phytophthora capsici* es una de las enfermedades más devastadoras para el cultivo de chile (González-Pérez *et al.*, 2004), y se considera que la mejor estrategia para el manejo de la enfermedad sería la resistencia genética. La línea de chile tipo serrano Criollo de Morelos 334 (CM-334) es altamente resistente a *Phytophthora capsici* y su resistencia se ha mantenido aún cuando se ha inoculado con las cepas más patogénicas (Kim y Kim 2009); actualmente se le considera como el resistente universal a *P. capsici* (Oelke *et al.*, 2003; Glosier *et al.*, 2008). En este sentido, Sy y colaboradores (2005) sugieren que en CM-334 existen tres genes de resistencia a *P. capsici* que de manera independiente confieren la resistencia en la raíz, el tallo y el follaje. El chile CM-334 también es altamente resistente a potyvirus y a las tres principales especies del nematodo agallador de la raíz: *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, y *M. javanica* (Pegard *et al.*, 2005), sin embargo, CM-334 es susceptible al nematodo *Nacobbus aberrans* (Vargas-Escobedo *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). En estudios previos, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que el genotipo CM-334 se comporta como susceptible al oomiceto cuando previamente es infectado por el nematodo *N. aberrans* (Hernández *et al.*, 1992; Vargas-Escobedo *et al.*, 1996). El máximo grado de rompimiento de resistencia a *P. capsici* en plantas de chile CM-334 ocurrió cuando 2000 juveniles de la segunda etapa (J₂) de *N. aberrans* fueron inoculados en las plantas de CM-334 y 21 días después con 300,000 zoosporas de *P. capsici* (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005).

La resistencia a *P. capsici* en cultivares de chile se ha asociado a incrementos en la actividad las enzimas β -1,3-glucanasa (Egea *et al.*, 1999), peroxidasas (Fernández-Pavía, 1997) y proteínas PR-1. Las β -1,3-glucanasas, peroxidasas y proteínas PR-1 son proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) que se inducen como respuesta al ataque por patógenos (Vidhyasekaran, 2008). La función de las β -1,3-glucanasas durante la interacción planta-patógeno es hidrolizar la β , 1-3 glucana que es el mayor componente de la pared celular de los oomicetos (Selitrennikoff, 2001). En interacciones incompatibles chile-*P. capsici*, se ha observado una mayor actividad de β -1,3-glucanasas, así como una mayor y más duradera expresión del gen que codifica para dicha enzima, en comparación con las compatibles (Egea *et al.*, 1999). Por otra lado, las peroxidasas participan en el

reforzamiento de la pared celular por la deposición de los polímeros lignina y suberina, que constituyen una barrera física al avance del patógeno (Passardi *et al.*, 2005). Silvar *et al.*, 2008 reportaron que la expresión del gen *CAPO1*, que codifica para la síntesis de una peroxidasa, fue tres veces mayor en la interacción incompatible chile-*P. capsici* en comparación con la interacción compatible. El incremento en la actividad de peroxidasa en chile CM-334 ha sido asociado con la resistencia a *P. capsici* (Fernandez-Pavía, 1997). Por otra parte, las proteínas PR-1 también se asocian con la resistencia a *P. capsici* en chile, y aunque su función exacta es todavía incierta (Hong y Hwang, 2005) algunos autores como Benhamou *et al.* (1991) sugieren que estas proteínas están involucradas en el engrosamiento de la pared celular y, por tanto, pueden ofrecer resistencia a la diseminación de patógenos, mientras que Niderman *et al.* (1995) sugieren que las PR-1 pueden tener un efecto directo en contra de los patógenos. Lee *et al.* (2000) reportaron una fuerte y rápida acumulación de transcritos del gen *CABPR1*, que codifica para una proteína PR-1, en interacciones incompatibles chile-*P. capsici*. Además, la sobre-expresión del gen *PR-1* en plantas transgénicas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* cv. House Momotaro) mostraron un aumento en resistencia al oomiceto *Phytophthora capsici*, en contraste, las plantas testigos (no transformadas) mostraron síntomas severos de la enfermedad (Sarowar *et al.*, 2006). En general, las PRs se consideran como uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas (Van Loon *et al.*, 2006).

El capsidiol, es la principal fitoalexina sesquiterpenica en chile y su acumulación en las zonas de infección inhibe o restringe el crecimiento de *P. capsici* durante la interacción incompatible *P. capsici*-chile (Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000). La enzima clave en la biosíntesis de esta fitoalexina es la 5-*epi*-aristolóqueno sintasa, codificada por el gen *EAS* (Bohlmann *et al.*, 2002). La expresión del gen *EAS* como consecuencia de la inoculación con *P. capsici* o del tratamiento con elicitores (celulasa o Pep-13) en plantas de chile ha sido reportada con anterioridad (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008; Zavala-Páramo *et al.*, 2000). Por ejemplo, Zavala-Páramo y colaboradores (2000) mencionan que la inoculación de *P. capsici* en plantas de chile de la var. Sonora Anaheim, indujo una expresión fuerte del gen *EAS* (*PEAS*) a las 24 h después de haber sido inoculadas con el oomiceto, mientras que en las plantas no inoculadas no se detectó la expresión del gen. Además de los mecanismos de defensas citados anteriormente, la

resistencia a *P. capsici* también se ha asociado con incrementos en la actividad de la fenilalanina amonioliasa (PAL) y compuestos fenólicos con propiedades tóxicas (Candela *et al.*, 1995; Fernandez-Pavia, 1997).

Recientemente nuestro grupo reportó que la inoculación de *N. aberrans* en plantas de chile CM-344 reduce la actividad de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) y de peroxidases, así como la concentración de fenoles solubles totales y ácido clorogénico, en comparación con aquellas plantas inoculadas sólo con *P. capsici*, las cuales mostraron una mayor actividad enzimática o concentración, sugiriendo que la pérdida de resistencia podría asociarse con la reducción de la actividad o el contenido de éstos compuestos (Godínez-Vidal *et al.*, 2008; López-Martínez, 2010). En este sentido, Zavaleta-Mejía *et al.* (2009) indican que el fenómeno de rompimiento de resistencia a *P. capsici* en CM-334 podría también asociarse con cambios en la expresión de genes de defensa que codifican para peroxidases, enzimas de la ruta de fenilpropanoides (*PAL*, *C₄H*, *4CL*, *CCR*) e isoprenoides [*hmg* (3-hidroxi-3-metilglutaril CoA-reductasa), *EAS* (5-*epi*-aristoloueno sintasa) y *SS* (escualeno sintasa)], cuya expresión o represión podría favorecer la acumulación de metabolitos que inhiben o favorecen la infección por *P. capsici*.

Con base en estos antecedentes y con la idea de aportar información que ayude a entender la influencia o cambios inducidos por *N. aberrans* en la expresión de genes de defensa en chile CM-334, el objetivo de la presente investigación fue comparar por PCR en tiempo real la acumulación de transcritos de los genes *POX*, *GLU*, *PR-1* y *EAS*, y determinar la actividad enzimática de peroxidases, glucanasas y el contenido de capsidiol en raíces de plantas de CM-334 inoculadas con *P. capsici*, *N. aberrans* y la combinación de ambos patógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de los experimentos. Plántulas de chile CM-334 se crecieron en macetas conteniendo arena esterilizada y se mantuvieron en cámara de crecimiento a 26 °C ± 1° C con un fotoperiodo de 14 h luz y 10 h oscuridad. Cada experimento constó de cuatro tratamientos: 1) plantas de CM-334 no inoculadas (Testigo), 2) plantas de CM-334 inoculadas con *P. capsici* (*Pc*), 3) plantas de CM-334 inoculadas con *N. aberrans* (*Na*) y

4) plantas de CM-334 inoculadas con *N. aberrans* y *P. capsici* (*Na-Pc*), cada tratamiento constó 60 plantas. Las plantas de chile con cuatro a cinco hojas verdaderas se inocularon con 2000 J₂ del nematodo y 21 días después con 300,000 zoosporas del oomiceto. Para corroborar, tanto la patogenicidad del aislamiento como la eficacia de la inoculación, 10 plantas de chile del cv J. E. Parker susceptible a *P. capsici* fueron también inoculadas. El aislamiento 6143 de *P. capsici* usado en este trabajo fue proporcionado por la Dra. Sylvia Patricia Fernández-Pavía (Profesora de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). El cultivo del oomiceto, la inducción de la esporulación y la cuantificación de zoosporas, así como, la obtención e inoculación de *N. aberrans* se realizó de acuerdo a lo reportado por Villar-Luna y colaboradores (2009). El experimento completo se repitió una vez, bajo las mismas condiciones.

A las 6, 12, 24 y 48 h posteriores a la inoculación (hpi) con el oomiceto, se tomaron de cada tratamiento 15 plantas para cada tiempo, se cortaron las raíces, se lavaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a - 80 °C.

Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real. El RNA total de raíces de chile se extrajo a partir de 0.5 g de tejido congelado usando el Kit RNeasy® (QIAGEN) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El RNA se almacenó a -80 °C. La calidad e integridad del RNA se verificó en gel de agarosa desnaturalizante al 1.2%.

La síntesis de cDNA se realizó en dos pasos: 1) la primer mezcla de reacción estuvo constituida por 2 µg de RNA total, 0.4 µL de oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen®), y se aforó a un volumen de 12 µL con agua libre de RNAsas y DNAsas para incubarse a 70 °C por 10 min, al terminar se colocó la mezcla en hielo, 2) a la primer mezcla de reacción se le adicionaron 8 µL de una segunda mezcla, la cual consistió de 4 µL de amortiguador 5x para retrotranscripción, 2 µL de ditiotreitól (0.1 M), 1 µL dNTP mix (10 mM) y 1 µL de la retrotranscriptasa (M-MLV Reverse transcriptase -Promega®-). La mezcla se colocó en un termociclador (BIO-RAD®) durante 60 min a 37 °C y 10 min a 70 °C.

Los pares de oligonucleótidos utilizados en el estudio se muestran en el Cuadro 1; con excepción de los oligos para el gen *PR-1*, los demás se diseñaron usando el programa

DNASTAR® a partir de las secuencias de genes disponibles en el GenBank del NCBI. La mezcla de reacción de PCR en tiempo real consistió de 2.5 µL de buffer 10X para PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pM de cada primer, 2 mM de dNTP mix, 1:30,000 SYBR® Green (Molecular Probe, Eugene, OR), 10 nM de fluoresceína, 1.5 µL de cDNA, 0.125 µL de Amplicasa (Biogenica®) y se aforó a un volumen de 25 µL con agua libre de RNAsas y DNAsas, en un sistema estándar de PCR en tiempo real ABI7500 (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 94 °C/4 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C/0.30 s, 60 °C/35 s y 72 °C/35 s extensión. Las identidades de los productos que se amplificaron con los oligonucleótidos que se diseñaron en el presente estudio, se corroboraron mediante la purificación de los productos de PCR con el Kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) y su posterior secuenciación en el IBT (UNAM). El gen de gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GAPDH) se usó como gen de expresión constitutiva para normalizar la expresión y las plantas no inoculadas representaron la expresión 1x del gen de interés. El cálculo de la expresión relativa de cada gen se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

Cuadro 1. Oligonucleótidos usados para analizar la acumulación de algunos genes relacionados con la defensa en plantas de CM-334 inoculadas con *N. aberrans* y *P. capsici*.

Gen	Acceso	Referencia	Primer		
			Nombre	Secuencia primer (5´- 3´)	Amplición
Gliceraldehído 3-P					
deshidrogenasa (<i>GAPDH</i>)	AJ246011	DPE	GLIFW	GGCCTTATGACTACAGTTCACTCC	217 pb
PR-1 (<i>CABPRI</i>)	AF053343	Gayoso <i>et al.</i> 2007	PR1FW	GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT	301 pb
Peroxidasa (<i>CAPO1</i>)	AF442386	DPE	POXFW	CCAGTACGTGCCCAAGAGCTG	560 pb
β- 1,3-glucanasa (<i>CABGLU</i>)	AF227953	DPE	GLUFW	GAGGCTCCAACATTGAAGTTATG	480 pb
5- <i>epi</i> -aristolóqueno sintasa (<i>PEAS</i>)	AJ005588	DPE	SESFW	GCTCAAGAAATTGAACCGCCGAAG	200 pb
			SESREV	TCTTCATTATAGACATCGCCCTCG	

DPE: diseñados en el presente estudio. *CABPRI*=*PR-1*; *CAPO1*=*POX*; *CABGLU*=*GLU*; *PEAS*=*EAS*.

Extracción de proteína y actividad enzimática de peroxidasa. La extracción de proteína se hizo a partir de 0.25 g de tejido macerándolo en un mortero que contenía buffer frío de Tris-HCL 50 mM, pH 7.5. El extracto se centrifugó a 12,000 g a 4 °C por 5 min y el sobrenadante recuperado se almacenó a -20 °C. La concentración de proteínas se determinó con el Kit Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para lo cual se utilizó albúmina sérico-bovina, fracción V (Sigma), como estándar. La actividad de peroxidasa se determinó con el incremento de absorbancia a 470 nm debido a la formación de tetraguaiacol (Hammerschmidt *et al.*, 1982). La mezcla de reacción consistió de 220 µL de amortiguador de Tris-HCl (50mM, pH 7.5), 15 µL de peróxido de hidrógeno a 0.25 %, 25 µL de guaiacol 0.1 M y 5 µg de proteína total. La actividad enzimática se reportó como µmoles de tetraguaiacol µg⁻¹ de proteína. Para cada experimento de cada tratamiento y para cada tiempo se realizaron dos extracciones y cada extracción se cuantificó por triplicado.

Extracción de proteína y actividad enzimática de β-1,3-glucanasa. Se maceró 0.25 g de tejido de raíces usando como buffer acetato de sodio 0.05 M, pH 5.2. El extracto se centrifugó a 15,000 g a 4 °C por 10 min y el sobrenadante recuperado se almacenó a -20 °C. La actividad de β-1,3-glucanasas se determinó usando el ensayo de laminarina-ácido dinitrosalicílico de Abeles y Forrence (1970) con algunas modificaciones. A 25 µL de extracto crudo de la enzima se le adicionaron 25 µL de laminarina al 1% y se incubó a 40 °C durante 10 min. La reacción se detuvo adicionando 375 µL de ácido dinitrosalicílico y calentando por 5 min en agua hirviendo (100 °C). Se enfrió la solución, se agitó en vortex y se leyó la absorbancia a 500 nm. El blanco consistió del extracto de la enzima y el laminarina con cero tiempos de incubación. La reducción de azúcar se calculó usando una curva estándar de glucosa. Una unidad de actividad de β-1,3-glucanasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de glucosa por 10 min, bajo las condiciones arriba citadas (Pan *et al.*, 1991). Para cada experimento se realizaron dos extracciones por cada tiempo de cada tratamiento, y cada extracción se cuantificó por triplicado.

Extracción y cuantificación de capsidiol. El capsidiol se extrajo de acuerdo a la metodología descrita por Egea *et al.* (1996b), con algunas modificaciones. De cada tratamiento y tiempo se tomó una muestra de 0.5 g de tejido radical, se maceró por 30 s en

N líquido y posteriormente por 1 min en una mezcla de cloroformo y metanol (2:1). Cada extracto se filtró y evaporó a sequedad a temperatura ambiente y se redisolvió en cloroformo para su análisis por cromatografía en capa fina, la cual se desarrollo con una mezcla de hexano:acetato de etilo (1:6) utilizando placas cromatográficas de silica gel 60 F₂₅₄ (Merck®). Las muestras fueron cromatografiadas en banda y eluídas conjuntamente con una muestra de capsidiol puro. Se recortó la porción correspondiente al estándar, la cual se reveló con una disolución de sulfato cérico amoniacal 2N en H₂SO₄ y se confrontó físicamente con la porción eluída y no revelada de cada tratamiento, las regiones correspondientes al R_f = 0.28 característico del capsidiol se rasparon, se lavaron con cloroformo, se filtraron y evaporaron a sequedad.

La estimación del contenido de capsidiol se realizó siguiendo la metodología descrita por Chávez y Lozoya (1996), con algunas modificaciones. Las muestras se redisolviéron en 250 µL de metanol y para la cuantificación se preparó una mezcla de reacción de extracto y vainillina 2% en ácido sulfúrico en relación 1:1, la cual se incubó a temperatura ambiente durante 40 min y se leyó a una longitud de onda de 640 nm en un Nanodrop®. Para la cuantificación de la fitoalexina se utilizó una curva estándar previamente preparada con concentraciones conocidas de capsidiol puro, aislado e identificado por nuestro grupo de investigación (Villar-Luna *et al.*, 2009).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza para un modelo completamente al azar usando el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1999) y para la comparación de medias de tratamientos se aplicó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS

Niveles relativos de genes relacionados con la defensa. En comparación con las raíces de las plantas testigo, en las de chile CM-334 tratadas con *P. capsici* (*P.c*) o con la interacción de *N. aberrans* y *P. capsici* (*Na-Pc*), se registró una acumulación significativamente mayor de los transcritos de los genes evaluados (*EAS*, 5-epi-aristoloxeno sintasa; *POX*, peroxidasa; *GLU*, β-1,3-glucanasa; y proteína PR-1) después de la inoculación con el oomiceto; de ellos el gen *EAS* presentó el mayor incremento 23.4

veces a las 6 hpi y después declinó drásticamente a 9.7, 8.8 y 4.2 veces a las 12, 24 y 48 hpi, respectivamente (Fig. 1).

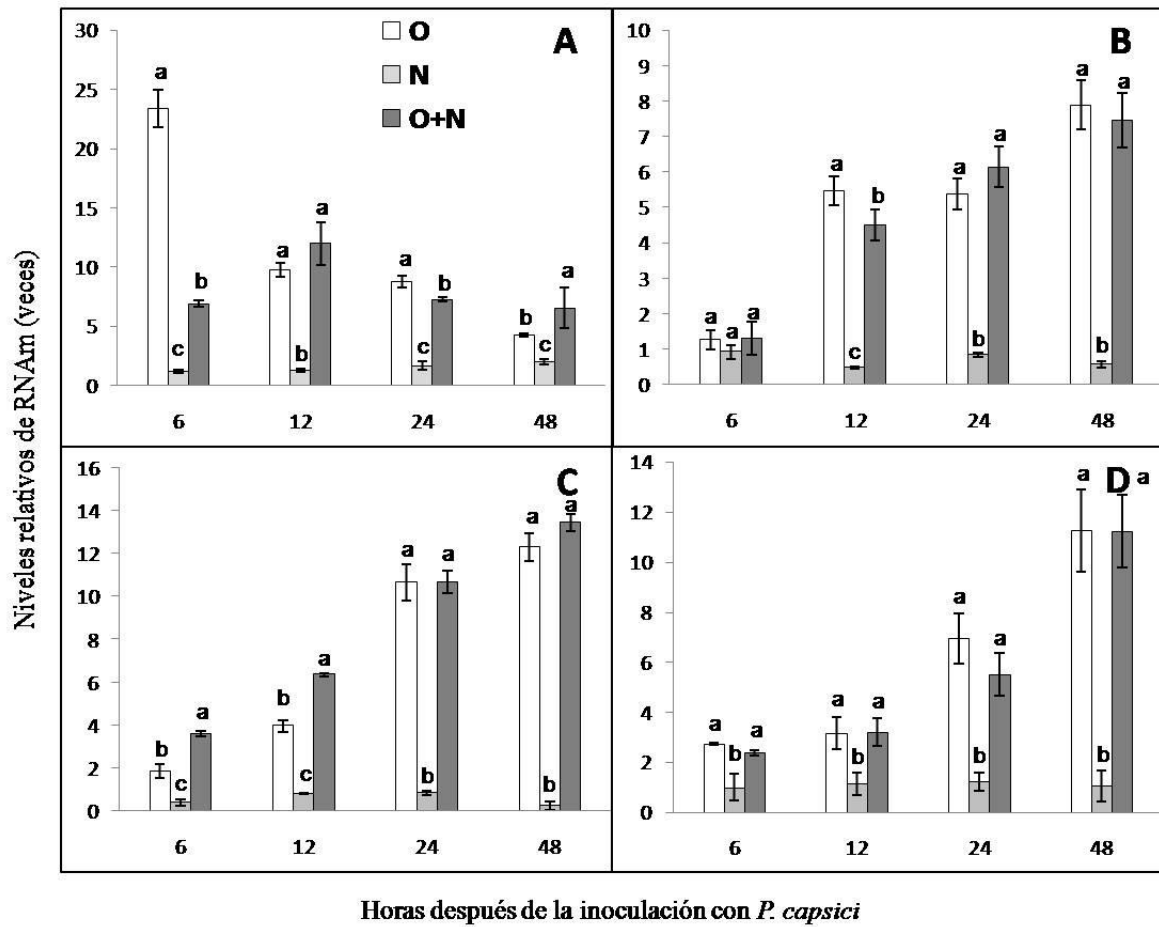


Fig. 1. Niveles relativos de expresión de genes relacionados con la defensa en raíces de plantas de chile CM-334 inoculadas con *P. capsici* y *N. aberrans*, respecto a las plantas no inoculadas. A) *EAS* = 5-*epi*-aristolóqueno sintasa, B) *PR-1*, C) *POX*= peroxidasa, y D) *GLU*= β -1,3-glucanasa. Cada barra representa el promedio de dos experimentos independientes con tres determinaciones cada uno; la línea de cada barra representa la desviación estándar. Para cada tiempo, las barras con diferente letra fueron significativamente diferente (Tukey, $P \leq 0.05$).

En raíces de chile CM-334 inoculadas sólo con *P.c* los transcritos del gen *EAS*, responsable de codificar para la enzima 5-*epi*-aristolóqueno sintasa clave en la síntesis de capsidiol, mostraron la máxima acumulación (23.4 veces) a las 6 hpi, mientras que en el tratamiento de la interacción *Na-Pc* para este mismo tiempo, se registró una reducción

significativa (6.9 veces) de los transcritos del gen en comparación con las plantas testigo. En el tratamiento de *Na-Pc* la máxima acumulación del gen *EAS* fue de 12 veces y se detectó a las 12 hpi, después declinó a 7.3 y 6.5 veces a las 24 y 48 hpi, respectivamente.

En la interacción compatible de plantas de chile CM-334-*Na* fue baja la acumulación de transcritos del gen *EAS*, así como la de los genes que codifican para las proteínas relacionadas con patogénesis para las cuales codifican los genes *POX*, *GLU* y *PR-1*, lo cual contrastó significativamente con la acumulación de transcritos observada en la interacción incompatible CM-334-*P. capsici*, donde los transcritos de los genes *POX*, *GLU* y *PR-1* se detectaron desde las 6 hpi, incrementándose gradualmente hasta las 48 hpi, tiempo en el que se registró el máximo valor. La expresión de los genes *POX*, *GLU* y *PR-1* en las plantas inoculadas sólo con el nematodo fue ligeramente mayor a la observada en las plantas testigo.

Actividad enzimática. La actividad de β -1,3-glucanasas y peroxidasas tanto en las raíces de las plantas testigo como en las inoculadas sólo con nematodo fueron bajas a lo largo de los cuatro tiempos evaluados (Fig. 2A y 2B); en contraste, la actividad fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) en las raíces de plantas de chile CM-334 inoculadas con el oomiceto o con ambos patógenos desde las 12, 24 y 48 hpi con *P. capsici*. La inoculación de CM-334 sólo con *P. capsici* mostró incrementos en la actividad de β -1,3-glucanasas de 38.5, 77.5 y 87.1%, y en la interacción *Na-Pc* de 51.1, 71.5 y 96.9 % a las 12, 24 y 48 hpi, respectivamente, con respecto a las plantas testigo. En el tratamiento de *Pc* la actividad de peroxidasas en CM-334 tuvo incrementos de 41.2, 48.2 y 48.4%, mientras que en el tratamiento de *Na-Pc* los incrementos fueron de 38.1, 52.7 y 56.3% a las 12, 24 y 48 hpi, respectivamente, en comparación con las plantas testigo.

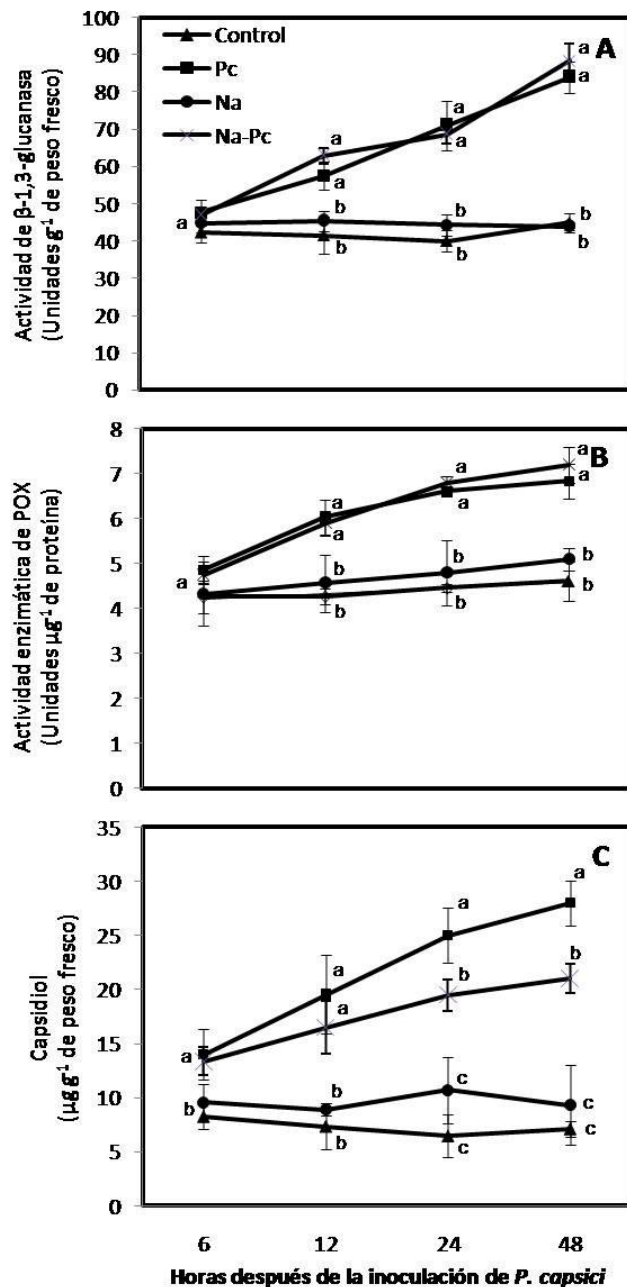


Fig. 2. Actividad enzimática total de β -1,3-glucanasas (A), y peroxidasas (B) y contenido de la fitoalexina capsidiol (C) en raíces de chile CM-334 no inoculadas (Testigo) e inoculadas con *P. capsici* (Pc), *N. aberrans* (Na) o ambos patógenos (Na-Pc). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes, con dos extracciones y tres lecturas por extracción; la línea en cada punto representa la desviación estándar. Para cada tiempo, los puntos con diferente letra fueron significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). Para el tiempo de 6 h, puntos con una sólo letra indica que no hubo diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$).

Contenido de capsidiol. En las raíces de las plantas testigo y en las inoculadas con nematodo se detectaron contenidos bajos de la fitoalexina a lo largo de los cuatro tiempos evaluados, sin diferencias significativas entre ambos (Fig. 2C). En comparación con las plantas inoculadas sólo con *P. capsici*, con las inoculadas únicamente con el nematodo y con las plantas testigo el contenido de capsidiol se redujo en 31.6, 54.4, 57.2 y 66.6%, y en 41, 62.3, 74 y 74.5% a las 6, 12, 24 y 48 hpi, respectivamente. En cambio en las raíces en donde estuvo presente el oomiceto, tratamientos *Pc* y *Na-Pc*, se encontraron niveles significativamente ($P \leq 0.05$) más altos. Ambos tratamientos no mostraron diferencias significativa ($P \leq 0.05$) en el contenido de capsidiol a las 6 y 12 hpi; sin embargo, a las 24 y 48 hpi, las plantas inoculadas solamente con el oomiceto presentaron incrementos significativos de 28.2 y 33.3%, respectivamente.

DISCUSIÓN

La expresión diferencial de genes de defensa y la acumulación de los metabolitos para los cuales codifican dichos genes se ha observado en varias interacciones planta-patógeno. En nuestro estudio la mayor expresión de los genes *GLU*, *POX*, *PR-1* y *EAS* se observó durante la interacción incompatible CM-334-*P. capsici* mientras que en la compatible CM-334-*N. aberrans* la acumulación de transcritos fue menor. Al respecto, Silvar *et al.* (2008) mencionan que la compatibilidad e incompatibilidad hospedante-patógeno está determinada por el grado de coordinación entre las diferentes estrategias de defensa, la rapidez y la magnitud con la que ocurre la expresión de genes que codifican para la síntesis de metabolitos que inhiben el crecimiento del patógeno, siendo tales cambios más rápidos y de mayor magnitud en las interacciones incompatibles.

La sobre expresión de los transcritos de los genes *POX* en la interacción de CM-334 con *Pc* o con *Na-Pc* se asoció con incrementos en la actividad de la enzima respectiva, en contraste en la interacción compatible CM-334-*N. aberrans* tanto la acumulación de transcritos del gen, como la actividad de peroxidasas fue baja. Se ha consignado que la expresión de *POX* y la actividad de peroxidasas se incrementan en las plantas como resultado del ataque por patógenos (Chittoor *et al.*, 1999; Van Loon *et al.*, 2006). Las peroxidasas contribuyen a la resistencia de las plantas al crear un ambiente tóxico por la acumulación de especies reactivas de oxígeno y al participar en el reforzamiento de la

pared celular por la deposición de los polímeros lignina y suberina, que constituyen una barrera física al avance del patógeno (Passardi *et al.*, 2005). Do *et al.* (2003) reportaron que en plantas de Chile del cv Hanbyul inoculadas con los aislamientos de *P. capsici* S197 (compatible) y CBS178.26 (incompatible), la expresión del gen *CAPO1* que codifica para una peroxidasa, fue más rápida y abundante en la interacción incompatible en comparación con la compatible. La mayor expresión del gen *POX* y la mayor actividad de las peroxidases en las plantas inoculadas con *Pc* podrían estar implicadas en el reforzamiento de la pared celular de las raíces de CM-334; en cambio, la baja expresión y menor actividad de la enzima en las plantas inoculadas con *Na* podría favorecer el establecimiento del nematodo, facilitando su avance en el tejido radical al no ocurrir el reforzamiento de la pared celular. También Zacheo *et al.* (1993) observaron que hubo un ligero incremento en la actividad de peroxidases en líneas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) susceptibles a *M. incognita*, mientras que, en la interacción incompatible la actividad enzimática se incrementó en un 100% en comparación con la interacción compatible. Según Zinov'eva *et al.* (2004), en las interacciones planta-nematodo se ha observado que la actividad de ciertas isoformas de peroxidases son capaces de suprimir tanto enzimas hidrolíticas, mientras que otras pueden oxidar a las toxinas producidas por los nematodos convirtiéndolas en compuestos inócuos para la planta.

El hecho de que la acumulación de transcritos del gen *GLU* y la correspondiente actividad de la enzima β -1,3-glucanasa se hayan incrementado en las plantas inoculadas con el oomiceto en presencia (CM-334-*Na-Pc*) y ausencia del nematodo (CM-334-*Pc*), sugiere que tales incrementos son inducidos por *P. capsici* y no por el nematodo. En presencia de *N. aberrans* (interacción compatible CM-334-*Na*) los niveles tanto de los transcritos del gen *GLU*, como de la actividad de la enzima correspondiente para la que codifica dicho gen, fueron similares a los observados en las plantas testigo. Las β -1,3-glucanasas se han asociado con la defensa de las plantas a hongos y oomicetos (Egea *et al.*, 1999; Hong y Hwang 2005; Jung *et al.*, 2005; Saikia *et al.*, 2005) y muy probablemente carezcan de importancia como mecanismo de defensa contra nematodos, en virtud de que las β -1,3-glucanasas degradan polímeros de la pared celular de los oomicetos mediante la hidrolización de su principal componente la β , 1-3 glucana (Selitrennikoff, 2001). La mayor expresión del gen que codifica para β -1,3-glucanasa, así como la mayor

actividad de dicha enzima en las interacciones chile-*P. capsici* ha sido previamente reportada (Egea *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2005). En presencia del nematodo el nivel de expresión de *GLU* y la actividad de la enzima fueron similares, sugiriendo que el nematodo fue incapaz de contrarrestar el fuerte efecto elicitor de *Pc*.

La información acerca de la inducción de β -1,3-glucanasas en las interacciones planta-nematodo, es escasa y contradictoria, y parece depender de la especie de nematodo con el que se establece la interacción; así por ejemplo, en la interacción *Globodera pallida*-papa, tanto compatible como incompatible, se incrementó el contenido de β -1,3-glucanasas (Rahimi *et al.*, 1996); en contraste Oka *et al.* (1997) reportan que en la interacción compatible tomate-*M. javanica* no hubo incremento en la acumulación de estas enzimas, de manera similar como ocurrió en la presente investigación en la interacción compatible CM-334-*N. aberrans*, mientras que con la aplicación de los elicitors químicos ácido salicílico (SA) o etefón, sí hubo acumulación de estas proteínas.

La acumulación de transcritos del gen *PR-1* se incrementó significativamente siempre que las plantas fueron inoculadas con *Pc*, independientemente de que estuviera o no presente el nematodo; esto sugiere que para este gen el nematodo no ejerce ninguna represión en presencia del oomiceto. Kim y Hwang (2000) observaron que en la interacción incompatible chile cv. Hanbyul-*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (aislamiento Bv5-4a) la acumulación de los RNAm del gen *CABPR-1*, que codifica para una proteína PR-1, fue más rápida, más prolongada y de mayor magnitud que aquella de la interacción compatible chile cv. Hanbyul-*X. campestris* pv. *vesicatoria* (aislamiento Ds1). Aún cuando la función y el mecanismo de acción de las proteínas PR-1 son todavía desconocidos, se ha propuesto que, debido a que ellas se acumulan en los espacios intercelulares y en la interface entre el patógeno (*P. capsici*) y las células de la planta de chile (cv. Hanbyul), tales proteínas podrían participar en la defensa contra el oomiceto, ejerciendo un efecto tóxico directo que retrasa el desarrollo del patógeno (Lee *et al.*, 2000).

La información sobre el efecto protector de las proteínas PRs en contra de los nematodos fitoparásitos también es escasa y en algunos casos contradictoria. Varios autores reportan la ausencia de inducción de proteínas PRs en las interacciones

compatibles planta-nematodo (Oka *et al.*, 1997), mientras que otros, indican que durante la interacción compatible entre *Cucumis sativum*-*M. incognita* se inducen las PRs β , 1-3 glucanasas en la raíces del hospedante (Zinov'eva *et al.*, 2001). En general, se considera que la producción de proteínas PRs es un mecanismo importante de defensa y se les relaciona con la resistencia a fitopatógenos (Linthorst, 1991; Van Loon, 1999); sin embargo, en las interacciones planta-nematodo no se ha observado una correlación directa entre la acumulación de PRs y el grado de resistencia (Rahimi *et al.*, 1993; Rahimi *et al.*, 1996), aunque en otros sí existen evidencias de que existe tal relación (Qiu *et al.*, 1997).

En nuestro estudio se observó la expresión constitutiva de todos los genes que codifican para las proteínas PRs (β -1,3-glucanasa, peroxidasa y PR-1) y la actividad enzimática de β -1,3-glucanasas y peroxidadas. Al respecto, Van Loon (1999) indica que las proteínas PRs pueden ser detectadas en tejido no infectado, sugiriendo que ellas pueden estar presentes en tejido sano en cantidades pequeñas. La presencia de β -1,3-glucanasas y peroxidadas en raíces de chile CM-334 no inoculadas tiene sentido si consideramos que éstas enzimas, además de funcionar en defensa, también intervienen en diversos procesos fisiológicos y del desarrollo de las plantas como: maduración y desarrollo de frutos (Gaspar *et al.*, 1982), división celular (Fulcher *et al.*, 1976), embriogénesis (Dong y Dunstan, 1997), germinación de semillas (Leubner-Metzger y Meins, 1999), rompimiento de dormancia (Krabel *et al.*, 1993), respuestas a bajas temperaturas y ozono (Gaspar *et al.*, 1982; Schraudner *et al.*, 1992), daño mecánico y luz UV (Ishige *et al.*, 1993; El Ghaouth *et al.*, 2003), entre otros.

La expresión de *EAS* en raíces de chile CM-334 inoculadas con ambos patógenos (CM-334-*Na-Pc*) fue tardía en comparación con las plantas inoculadas sólo con el oomiceto. La tardía acumulación de los transcritos de *EAS* durante la interacción CM-334-*Na-Pc* por un lado, y la mayor acumulación de *EAS* en la interacción CM-334-*Pc* por el otro, sugiere que *N. aberrans* modificó el patrón de expresión de este gen en las raíces de las plantas de chile. El incremento en la expresión *EAS* como resultado de la inoculación con *P. capsici* ha sido reportada previamente (Zavala-Páramo *et al.*, 2000). *EAS* codifica para la 5-*epi*-aristolóqueno sintasa (EAS), que es la enzima clave en la biosíntesis del capsidiol, la principal fitoalexina sintetizada en chile. Los resultados obtenidos indicaron

una estrecha relación entre la expresión de *EAS* y la acumulación de capsidiol en las raíces de Chile, así en las plantas infectadas con *Pc* hubo una mayor acumulación de capsidiol, en comparación con aquellas inoculadas con ambos patógenos y con las inoculadas sólo con el nematodo. La magnitud en la acumulación del capsidiol se ha asociado con el grado de resistencia a *P. capsici* en diversos genotipos de Chile (Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000). Además, varios investigadores han demostrado *in vitro* los efectos deletéreos del capsidiol sobre *P. capsici* (Ward *et al.*, 1974; Molot *et al.*, 1980) y en el nematodo *N. aberrans* (Godínez-Vidal *et al.*, 2010).

El hecho de que en plantas inoculadas sólo con el nematodo y con ambos patógenos (*Na-Pc*) haya habido tanto una menor expresión de *EAS* como un menor contenido de capsidiol, en comparación con aquellas inoculadas solamente con el oomiceto, permite especular que *N. aberrans* abate éste y otros mecanismos de defensa en plantas de Chile CM-334, lo que podría redundar en la creación de un ambiente favorable tanto para el establecimiento del nematodo como del oomiceto; con frecuencia se menciona que el grado de resistencia de los genotipos de Chile está estrechamente relacionado con la rapidez y la magnitud con la que acumulan a la fitoalexina capsidiol (Candela *et al.*, 2000). Godínez-Vidal *et al.* (2010) mencionan que en raíces de Chile CM-334 infectadas con el nematodo *N. aberrans* tuvieron un menor contenido capsidiol en comparación con las no inoculadas, y que la fitoalexina causó la inmovilización de los J₂ del nematodo en condiciones *in vitro*. Por otra parte, Villar-Luna *et al.* (2009) encontraron que en plantas de Chile CM-334 infectadas con *N. aberrans* se redujo la acumulación de capsidiol en hojas infiltradas con *P. capsici* o *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*, en comparación con las inoculadas solamente con el oomiceto o la bacteria. Se ha consignado que la inoculación con *N. aberrans* reduce otras respuestas de defensa en las plantas de CM-334; como son la menor expresión del gen *Hmg2* involucrado en la síntesis de capsidiol (Godínez-Vidal *et al.*, 2009), menor actividad de la enzima PAL (Godínez-Vidal *et al.*, 2008) y una acumulación menor de fenoles solubles totales en comparación con las plantas no inoculadas (López-Martínez *et al.*, 2010). Este último autor también encontró que en plantas de CM-334 la actividad de peroxidasas se redujo tanto en las plantas inoculadas sólo con *Na* como en aquellas inoculadas con los dos patógenos (*Na-Pc*), estos resultados difieren de lo que se encontró en la presente investigación. Se ha sugerido que

el abatimiento de estas respuestas de defensa podría explicar en parte, el fenómeno de rompimiento de resistencia de las plantas de Chile CM-334 a *P. capsici*, cuando son previamente infectadas por *N. aberrans*. La mayor y más rápida acumulación tanto de *EAS* como del capsidiol en raíces de CM-334 inoculadas con sólo *P. capsici*, da sustento a la idea de que la fitoalexina es un mecanismo importante en la defensa de este genotipo al oomiceto. La tardía y expresión tanto de *EAS* como del capsidiol en presencia de *N. aberrans*, sugieren que el nematodo altera el patrón de expresión de *EAS* y por tanto, la síntesis de la fitoalexina capsidiol, con el fin de evitar su efecto negativo.

La mayor acumulación de los transcritos de los genes *EAS*, de las PRs *GLU* y *POX* y los incrementos en la actividad de las enzimas correspondientes (β -1,3-glucanasas y peroxidases), así como la mayor acumulación de los transcritos de *PR-1* obtenida en la interacción CM-334-*Pc* indican que estos genes y enzimas están asociadas con la respuesta de defensa de CM-334 en contra de *P. capsici*. En presencia de *N. aberrans* se abatió la acumulación de los transcritos de las PRs y *EAS*, la actividad de las enzimas β -1,3-glucanasa y peroxidasa, y el contenido de capsidiol en las raíces de las plantas de CM-334; sin embargo, en las plantas inoculadas con ambos patógenos únicamente se reprimió la expresión de *EAS* que se asoció con una reducción significativa en la acumulación de capsidiol.

LITERATURA CITADA

- Abeles, F.B., and Forrence, L.E. 1970.** Temporal and hormonal control of β -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 45:395-400.
- Benhamou, N., Grenier, J., and Asselin, A. 1991.** Immunogold localization of pathogenesis-related protein P14 in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38:237-253.
- Bohlmann, J., Stauber, E. J., Krock, B., Oldham, N. J., Gershenzon, J., and Baldwin, I. T. 2002.** Gene expression of 5-*epi*-aristolochene synthase and formation of capsidiol in roots of *Nicotiana attenuate* and *Nicotiana sylvestris*. *Phytochemistry* 60: 109-116.

- Candela, M.E, Alcázar M.D., Espín, A, Egea, C., and Almela, L. 1995.** Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. Plant Pathology 44: 116-123.
- Candela, M.E., Egea, C., Garcia, P.M.D, Costa, J., and Candela, M. 2000.** Breeding papryka type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. Acta Horticulturae 522: 79-86.
- Chávez, M.M.P., and Lozoya, G.E. 1996.** Biosynthesis of the sesquiterpenic phytoalexin capsidiol in elicited root cultures of chili pepper (*Capsicum annuum*). Plant Cell Reports 15:360-366.
- Chittoor J. M., Leach J. E. and White F. F. 1999.** Induction of peroxidase during defense against pathogens. pp. 171-187. In: Datta S.K. and Muthukrishnan S. (Eds.). Pathogenesis-related proteins in plants. Boca Raton, FL: CRC Press. USA.
- Do, H.M., Hong, J.K., Jung, H.W., Kim, S.H., Ham, J.H., and Hwang, B.K. 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 Interactions 16:196-205.
- Dong, J.Z., and Dunstan, D.I. 1997.** Endochitinase and β -1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. Planta 201:189-194.
- Egea, C., Alcázar, M.D., and Candela, M.E. 1996a.** Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. Physiologia Plantarum 98:737-742.
- Egea, C., Dickinson, M.J., Candela, M., and Candela, E. 1999.** β -1,3-glucanasa isoenzymes and genes in resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici*. Physiologia Plantarum 107:312-318.
- Egea, C., Garcia, P.M.D., and Candela, M.E. 1996b.** Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. Journal of Plant Physiology 149:762-764.
- El Ghaouth, A., Wilson, C. L., and Callahan, A. M. 2003.** Induction of chitinase, β -1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-treatment. Phytopathology 93:349-355.

- Fernandez-Pavia, S. 1997.** Host-Pathogen interactions in the root rot *Phytophthora capsici*/*Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph D. Dissertation. New México State University. 109 p.
- Fulcher, R.G., Mc Cully, M.E., Setterfield, G., Sutherland, J. 1976.** β , 1-3 glucans may be associated with cell plate formation during cytokinesis. Canadian Journal of Botany 54:459-542.
- Gaspar, T., Penel, C., and Greppin, H. 1982.** Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. University of Geneva Press, Geneva. 324 p.
- Gayoso, C., Martínez de Iarduya O., Pomar, R., and Merino, F. 2007.** Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. European Journal of Plant Pathology 118:199-209.
- Glosier, B.R., Ogundiwin, E.A., Sidhu, G.S., Sischo, D.R., and Prince, J.P. 2008.** A differential series of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. Euphytica 162:23-30.
- Godinez-Vidal, D., Rocha-Sosa, M., León-Mejía, P., Lozoya-Gloria, E., and Zavaleta-Mejía, E. 2009.** Changes in the mevalonate pathway in chili CM-334 infected by *Nacobbus aberrans*. XII National Congress of Biochemistry and Plant Molecular Biology & 6th Symposium México-USA. November 9-13. Guanajuato, México. P-91.
- Godinez-Vidal, D., Rocha-Sosa, M., Sepúlveda-García, E. B., Lara-Reyna, J., Rojas-Martínez, R., and Zavaleta-Mejía, E. 2008.** Phenylalanine ammonia lyase activity in chili CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. European Journal of Plant Pathology 120:299-303.
- Godinez-Vidal, D., Soto-Hernández, M., Rocha-Sosa, M., Lozoya-Gloria, E., Rojas-Martínez, R.I., and Zavaleta-Mejía, E. 2010.** Capsidiol accumulation in chili CM-334 infected by *Nacobbus aberrans* and its effect on second stage juveniles. Nematropica (*in press*).
- González-Pérez, E., Yáñez-Morales, M., Santiago-Santiago, V. y Montero-Pineda, Ángel. 2004.** Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. Agrociencia 38:653-661.

- Hammerschidt, R., Nuckles, E.M., and Ku, F. 1982.** Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiology Plant Pathology* 20:73-82.
- Hernández, A.A.M., Zavaleta-Mejía, E., y Carrillo, G. 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.
- Hong, J. K., and Hwang B. K. 2005.** Functional characterization of PR-1 protein, β -1,3-glucanase and chitinase genes during defense response to biotic and abiotic stresses in *Capsicum annuum*. *The Plant Pathology Journal* 21:195-206.
- Ishige, F., Mori, H., Yamazaki, K., and Imaseki, H. 1993.** Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. *Plant Physiology* 101:193-199.
- Jung, W. J., Jin, Y. L., Kim, K. Y., Park, R. D., y Kim, T. H. 2005.** Changes in pathogenesis-related proteins in pepper plants with regard to biological control of phytophthora blight with *Paenibacillus illinoisensis*. *BioControl* 50:165-178.
- Kim, S.G., and Kim, Y.H. 2009.** Histological and cytological changes associated with susceptible and resistant responses of chili pepper root and stem to *Phytophthora capsici* infection. *Plant Pathology Journal* 25:113-120.
- Kim, Y. J., and Hwang, B. K. 2000.** Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia plantarum* 108:51-60.
- Krabel, D., Eschrich, W., Wirth, S., and Wolf, G. 1993.** Callase (1,3- β -D-glucanase) activity during spring reactivation in deciduous trees. *Plant Science* 93:19-23.
- Lee, Y. K., Hippe-Sanwald, S., Lee, S. Ch., Hohenberg, H., and Hwang, B. K. 2000.** *In situ* localization of PR-1 mRNA and PR-1 protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. *Protoplasma* 211:64-75.
- Leubner-Metzger G. and Meins, F. 1999.** Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). pp. 49-66. *In*: Datta S.K. and Muthukrishnan S. (Eds.). *Pathogenesis-related proteins in plants*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Linthorst, H.J. M. 1991.** Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10:123-150
- Livak, K.J., and Schmittgen, T. D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402-408.

- López-Martínez, N., Colinas-León, M.T., Peña-Valdivia, C.B., Salinas-Moreno, Y., Fuentes-Montiel, P., Biesaga, M., and Zavaleta-Mejía, E. 2010.** Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. Plant Soil (DOI 10.1007/s11104-010-0553-5).
- Maldonado-Bonilla, L.D., Betancourt-Jiménez, M., and Lozoya-Gloria, E. 2008.** Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. European Journal of Plant Pathology 121:439-449.
- Molot, P. M., Mas, P., and Hilario, A. L. 1980.** La résistance du piment (*Capsicum annuum*) á *Phytophthora capsici* Leon. VI. Pouvoir inhibiteur du capsidiol sur la croissance et l'activité pectinolytique d'isolats d'agressivité variable. Annales de Phytopathologie 12:1-9.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., and Mössinger, E. 1995.** Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. Plant Physiology 108:17-27.
- Oelke, M.L., Bosland, P.W., and Steiner, P. 2003.** Differentiation of races specific resistance to Phytophthora root rot and roliar blight in *Capsicum annuum*. Journal American Society Horticultural Science 128:213-218.
- Oka, Y., Chet, I., and Spiegel, Y. 1997.** Are pathogenesis-related proteins induced by *Meloidogyne javanica* or *Heterodera avenae* invasion?. Journal of Nematology 29:501-508.
- Pan, S.Q., Ye, S.X., and Kuc, J. 1991.** Association of β -1,3- glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. Physiological and Molecular Plant Pathology 39:25-39.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. and Dunand, C. 2005.** Peroxidases have more functions than army knife. Plant Cell Reports 24:255-265.
- Qiu, J., Hallmann, J., Kokalis-Burelle, N., Weaver, D.B., Rodríguez-Kábana, R., and Tuzun, S. 1997.** Activity and differential induction of chitinase isozymes in

soybean cultivars resistant or susceptible to root-knot nematodes. *Journal of Nematology* 29:523-530.

- Rahimi, S., Perry, R.N., Wright, D.J. 1993.** Induction and detection of pathogenesis-related proteins in leaves and roots of potato plants infected with pathotypes of *Globodera pallida*. *Fundamental and Applied Nematology* 16:549-556.
- Rahimi, S., Perry, R.N., and Wright, D.J. 1996.** Identification of pathogenesis-related proteins induced in leaves of potato plants infected with potato cyst nematodes, *Globodera* species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49:49-59.
- Saikia R., Singh, B. P., Kumar, R., Arora D.K. 2005.** Detection of pathogenesis-related proteins-chitinase and β -1,3- glucanase in induced chickpea. *Current Science* 89:659-663.
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, E.N., Kim, K.D., Choi, J.Y., Hyung, N.I., and Shin, J.S. 2006.** Constitutive expression of two pathogenesis-related genes in tomato plants enhanced resistance to oomycete pathogen *Phytophthora capsici*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86:7-14.
- SAS Institute. 1999.** SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA. 1028 p.
- Schraudner, M., Ernst, D., Langebartels, C., Sandermann, H. 1992.** Biochemical plant responses to ozone. *Plant Physiology* 99:1321-1328.
- Selitreffnikoff, P. C. 2001.** Antifungal Proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2883-2894.
- Silvar, C., Merino, F., and Díaz, J. 2008.** Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 165:1120-1124.
- Sy, O., Bosland, P.W., and Steiner, R. 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., Zavaleta-Mejía, E., Rojas-Martínez, R. I. y Lara, J. 2005.** Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici*, inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile (*Capsicum annuum*). *Nematropica* 35:37-44.

- Van Loon, L. C. 1999.** Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. pp. 1-12. In: Pathogenesis-related proteins in plants. Datta S. K. and Muthukrishnan, S. (Eds.). CRC Press LLC. USA.
- Van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. 2006.** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44:135-162.
- Vargas-Escobedo, M. T., Zavaleta-Mejía, E. y Hernández-Anguiano, A.M. 1996.** Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* en chile serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. Nematropica 26:159-166.
- Vidhyasekaran, P. 2008.** Induction and evasion of pathogenesis-related proteins. pp: 345-409. In: Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms. Second Edition. CRC Press, USA. 509 p.
- Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R. I., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A. M., y Zavaleta-Mejía, E. 2009.** Respuesta hipersensitiva en el follaje de chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *N. aberrans*. Nematropica 39:143-155.
- Ward, E.W.B., Unwin, CH., Stoessl A. 1974.** Post infectious inhibitors from plants. III. Fungitoxicity of the phytoalexin capsidiol and related sesquiterpenes. Canadian Journal of Botany 52:2481-2488.
- Zacheo, G., Orlando, C., y Bleve-Zacheo, T. 1993.** Characterization of anionic peroxidases in tomato isolines infected by *Meloidogyne incognita*. Journal of Nematology 25:249-256.
- Zavala-Páramo, G., Chávez-Moctezuma, M. P., García-Pineda, E., Yin, S., Chappell, J., and Lozoya-Gloria, E. 2000.** Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene synthase gene (Gpeas1) from chilli pepper (*Capsicum annuum*). Physiologia Plantarum 110:410-418.
- Zavaleta-Mejía, E., Godínez-Vidal, D., López-Martínez, N., and Villar-Luna, E. 2009.** Changes induced by *Nacobbus aberrans* which could be related to *Phytophthora capsici* breaking of resistance in chilli. II International Congress of Tropical Nematology/XV Annual Meeting Organization of Nematologists of Tropical America. October 4-8. Maceió Alagoas State, Brazil. Abstract S31-1.

- Zinov'eva, S.V., Vasyukova, N.I., and Ozeretskorskaya, O. L. 2004.** Biochemical aspects of plants interactions with phytoparasitic nematode: a review. Applied Biochemistry and Microbiology 40:111-119.
- Zinov'eva, S.V., Perekhod, E. A., Il'ina, A. V., Udalova, Zh, V., Gerasimova, N. G., Vasyukova, N. I., Ozeretskorskaya, O. L., and Sonin, M. D. 2001.** PR proteins in plants infested with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et white, 1919) Chitwood 1949. Doklady Biological Sciences 379:393-395.