



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**ACTIVIDAD DE PAL, ACUMULACIÓN DE
FENOLES Y FLAVONOIDES EN EL CHILE CM-334
INFECTADO POR *Nacobbus aberrans*
E INOCULADO EN EL FOLLAJE CON
*Phytophthora capsici***

RUTH SANDOVAL LUNA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

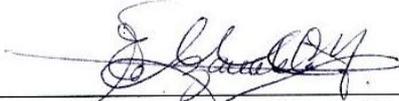
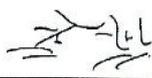
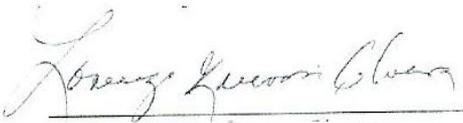
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2011

El presente proyecto de investigación titulado: “**Actividad de PAL, acumulación de fenoles y flavonoides en el chile CM-334 infectado por *Nacobbus aberrans* e inoculado en el follaje con *Phytophthora capsici***” realizado por la alumna: **Ruth Sandoval Luna**, ha sido aprobado por el Comité Particular para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS
ESPECIALISTA EN FITOPATOLOGÍA**

**COMITÉ PARTICULAR
Vo. Bo.**

Consejero	 Dra. Emma Zavaleta Mejía
Asesor	 Dra. Reyna I. Rojas Martínez.
Asesor	 Dra. Sylvia Patricia Fernández Pavia
Asesor	 Dra. María Alejandra Mora Áviles
Asesor	 Dr. Lorenzo Guervara Olvera

Montecillo, Texcoco, México a 6 de Diciembre del 2011

RESUMEN GENERAL

Actividad de PAL, acumulación de fenoles y flavonoides en el chile CM-334 infectado por *Nacobbus aberrans* e inoculado en el follaje con *Phytophthora capsici*

Dra. Ruth Sandoval Luna

Se evaluó la respuesta del chile (*Capsicum annum*) CM-334 infectado con *Nacobbus aberrans* (Na) y en el follaje inoculado con diferentes tipos de inoculación de *Phytophthora capsici*. En plantas completas o con el tallo decapitado se inoculo micelio, en el follaje zoosporas asperjadas, por inmersión en una suspensión de zoosporas y también en la raíz. Se tuvieron experimentos con plantas susceptibles (var. Joe E. Parker) y resistentes (CM-334), infectadas o sin infectar con *N. aberrans* y 21 días posteriores a la inoculación (pi) con el nematodo se inocularon con *P. capsici*; bajo un diseño completamente al azar en cámaras bioclimáticas. De los 5 a los 30 días pi con el oomiceto (pio) se registró la longitud de necrosis (cm), la colonización de hoja, tallo o raíz por el oomiceto y la severidad de la enfermedad. La actividad de PAL, acumulación de fenoles y flavonoides totales fue medida por espectrofotometría y la acumulación de transcritos fue determinada por Northern blot. Los datos se sometieron a análisis de varianza ($P \leq 0.05$) y prueba de Tukey. Con todos los tipos de inoculación las plantas susceptibles presentaron necrosis en el tallo o tizón en las hojas y murieron. La presencia de Na en raíces de las plantas resistentes CM-334 decapitadas inoculadas con micelio permitió que *P. capsici* lograra establecerse, pero en las plantas no decapitadas la presencia del nematodo aparentemente no abatió la resistencia del CM-334; en las raíces de las plantas resistentes inoculadas con ambos patógenos hubo muerte de plantas (11.1%) a los 45 días pio. En plantas inoculadas con micelio y Na, la necrosis y severidad fueron mayores que en las plantas resistentes inoculadas solo con micelio; pero en plantas infectadas por el nematodo e inoculadas por aspersión de zoosporas al follaje no se observaron síntomas. En contraste, con la inmersión en zoosporas, la lesión en las hojas fue macroscópica y como una respuesta de hipersensibilidad que se expresó en las plantas con o sin el nematodo. En plantas decapitadas inoculadas con micelio, la actividad de PAL incrementó en 39.1%, 29.6% y 55.7% en hojas, tallos y raíces a las 12 hpio y 24 hpio, respectivamente. Con la aspersión de zoosporas el incremento se observó a las 12 y 24 hpio, en hojas tallos y raíces (17.7%, 77.9% y 30.2%, respectivamente) en comparación con las

plantas infectadas con ambos patógenos. Similarmente, el contenido de fenoles solubles totales incrementó a las 12 hpio en los tres estratos de las plantas inoculadas con micelio y con zoosporas la acumulación se observó a las 6 y 12 hpi. El contenido de flavonoides incrementó en raíces y tallos de plantas inoculadas con micelio y Na, mientras que en las plantas inoculadas con zoosporas y el nematodo el incremento ocurrió sólo en las raíces. Con la inmersión en zoosporas la actividad de PAL incrementó en un 26.2% y en un 52.3% a las 6 y 12 hpio en hojas y raíces, respectivamente, con relación a las plantas inoculadas con ambos patógenos; de manera similar a las 12 hpio la acumulación de transcritos en las hojas fue mayor 1.5 veces y en las raíces en un 1.9 veces en comparación con las plantas inoculadas con ambos patógenos. Con excepción de las plantas inoculadas por aspersion con zoosporas, en todas las demás *P. capsici* se aisló de plantas infectadas por el nematodo e inoculadas con el oomiceto, probablemente por una disminución en la expresión en los mecanismos de defensa en las plantas infectadas por *N. aberrans*. La presencia de *N. aberrans* en las raíces redujo la actividad de PAL y la acumulación de transcritos en el follaje inoculado con *P. capsici*, sin embargo, la reacción de hipersensibilidad en el follaje no fue inhibida por la presencia del nematodo.

Palabras clave: chile CM-334, fenoles, flavonoides, PAL, micelio, *Phytophthora capsici*, follaje, *Nacobbus aberrans*, zoosporas.

GENERAL ABSTRACT

PAL activity, phenols and flavonoids accumulation in the pepper CM-3344 infected by *Nacobbus aberrans* and the foliage inoculated with *Phytophthora capsici*

Dra. Ruth Sandoval Luna

The response of pepper (*Capsicum annuum*) CM-334 infected with *Nacobbus aberrans* (Na) and in foliage was inoculated with different kinds of inoculums of *Phytophthora capsici*. In whole plants or the decapitated stem was inoculated with mycelium, the leaves inoculated with zoospores sprayed and immersion on suspension of zoospores, and zoospores at the root were evaluated. The experiments had susceptible plants (var. Joe E. Parker) and resistant (CM-334), infected or not infected with *N. aberrans* and 21 days post inoculation (pi) with the nematode, these were inoculated with *P. capsici*, under a completely randomized design in a bioclimatic chambers. From 5 to 30 days pi with the oomycete (pio) was recorded the length of necrosis (cm), the colonization of the leaf, stem or root by the oomycete and severity of the disease. PAL activity, accumulation of phenolics and total flavonoids were measured by spectrophotometry and the accumulation of transcripts by Northern blot analysis, data were subjected to analysis of variance ($P \leq 0.05$) and Tukey test. With all types of inoculation of susceptible plants showed necrosis on the stem or leaf blight and died. The presence of Na in roots of resistant plants decapitated CM-334 inoculated with mycelium allowed *P. capsici* failed to establish, but not decapitated plants the presence of nematode resistance apparently struck the CM-334, in the roots of resistant plants were inoculated with both pathogens death of plants (11.1%) at 45 days principle. In plants inoculated with mycelium and Na, necrosis and severity were higher than in resistant plants inoculated with mycelium alone, but in nematode-infected plants and zoospores inoculated by spraying the foliage symptoms were not observed. In contrast, with immersion in zoospores, damage to the leaves was a hypersensitive response was expressed in plants with or without the nematode. In decapitated plants inoculated with mycelium, PAL activity increased by 39.1%, 29.6% and 55.7% in leaves, stems at 12 hpio and roots at 24 hpio, respectively. With the increasing zoospore spray was observed at 12 and 24 hpio, leaf stems and roots (17.7%, 77.9% and 30.2% respectively) compared with plants infected with both pathogens. Similarly, the total soluble phenolic content decreased at 12 hpio in the three layers of plants inoculated with

mycelium and Na, Na and zoospores but the decrease was observed at 6 and 12 hpi. The flavonoid content increased in roots and stems of plants inoculated with mycelium and Na, whereas in plants inoculated with zoospores with the nematode the increase occurred only in the roots. Zoospores with immersion in PAL activity increased by 26.2% and 52.3% at 6 and 12 hpio in leaves and roots, respectively, relative to plants inoculated with both pathogens similar to the 12 hpio the transcript accumulation in the leaves was increased 1.5 times and in the roots by 1.9-fold compared with plants inoculated with both pathogens. The presence of *N. aberrans* in the roots reduced the activity of PAL and the accumulation of transcripts in the leaves inoculated with *P. capsici*, however, the hypersensitivity reaction in the foliage was not inhibited by the presence of the nematode. With the exception of plants inoculated by spraying with zoospores, in all other *P. capsici* was reisolated from infected plants by the nematode and inoculated with the oomycete, probably by a decrease in expression of defense mechanisms in plants infected by *N. aberrans*. The presence of *N. aberrans* in the roots reduced the activity of PAL and the accumulation of transcripts in the leaves inoculated with *P. capsici*, however, the hypersensitivity reaction in the foliage was not inhibited by the presence of the nematode.

Keywords: pepper CM-334, phenols, flavonoids, PAL, mycelium, *Phytophthora capsici*, foliage, *Nacobbus aberrans*, zoospores.

DEDICATORIA

Para Daniel, mi hijo.

Eres todo mi universo, mi aliento y motivación.

A mis padres Mirna y Felipe, mis hermanos Ada y Felipe, por su amor.

Son la esencia y raíz de mi ser.

Para mis queridos tíos: César, José Manuel y Catalina Luna.

Con mucho cariño, a las familias Guzmán Luna, Rueda Luna, Luna Mera, Ramírez Luna,

Luna López, Luna Paz, Solano, Sandoval, Rucoba, tíos, primos y sobrinos.

A mis amigos.

A ti...amor.

AGRADECIMIENTOS

Al aliento de vida.

A mi país México, que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología me otorgó una beca para la realización de mis estudios de posgrado y financió el proyecto de investigación.

Al Colegio de Postgraduados por la oportunidad que me ha brindado y seguirá brindando a muchos estudiantes.

Gracias Dra. Emma por su amistad, su ejemplo de constancia y dedicación a la fitopatología son un camino que marcó mi quehacer científico y profesional.

A la Dra. Sylvia un sincero agradecimiento, por ser un ejemplo a seguir.

A la Dra. Alejandra, Dr. Lorenzo, Dra. Reyna, Dra. Olga, Dr. Marcos Soto, Dr. Heber y Dr. David por sus acertadas observaciones y amistad.

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, aunque poco tiempo, la experiencia fue enorme gracias Dr. Mario Rocha Sosa, Valdemar y Paty.

A los compañeros y trabajadores del Laboratorio 209, Laboratorio de Fitoquímica, y del Laboratorio de Microbiología gracias por compartir y crecer en la experiencia.

A mis amigos gracias por alegrar y formar parte de mi vida.

Al Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria y a los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de Yucatán, Campeche, Tabasco, Quintana Roo y Chiapas por el apoyo brindado.

A los integrantes del Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del Sureste: Daniel, José Abrahán, José Manuel, Edda y Servando.

Al grupo 7mo. C. generación 1998-2002. Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo insistió por quiénes son y por lo que quieren llegar a ser.

Gracias Tío Cesar por tu ejemplo y cariño, lo que has hecho por mí y mi familia es inolvidable.

Por tu amor y apoyo, gracias Armando.

NOTA

El presente trabajo fue realizado como parte del proyecto:

**“ROMPIMIENTO DE RESISTENCIA A *Phytophthora capsici* POR *Nacobbus aberrans*
EN EL CHILE CM-334”**

Financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 28594-b).

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN GENERAL	II
GENERAL ABSTRACT	IV
TABLA DE CUADROS	XI
TABLA DE FIGURAS	XI
CAPITULO I	1
REVISIÓN DE LITERATURA	1
ORIGEN E IMPORTANCIA DEL CHILE (<i>CAPSICUM ANNUUM</i> L.)	1
MARCHITEZ DEL CHILE CAUSADA POR <i>PHYTOPHTHORA CAPSICI</i> LEO.	1
RESISTENCIA DEL CHILE A <i>P. CAPSICI</i>	3
INTERACCIÓN MOLECULAR ENTRE PLANTAS Y OOMICETOS	3
INFLUENCIA DEL TIPO DE INÓCULO -ZOOSPORAS O MICELIO- Y DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE SÍNTOMAS Y GENES	5
RESPUESTAS DE DEFENSA DEL CHILE CM-334 CONTRA <i>P. CAPSICI</i>	5
METABOLISMO SECUNDARIO: LA RUTA FENILPROPANOIDE	7
PAL Y COMPUESTOS FENILPROPANOIDES CONTRA OOMICETOS.....	9
INTERACCIÓN DEL CHILE CM-334 CON NEMATODOS AGALLADORES	11
FENILPROPANOIDES EN INTERACCIONES DE PLANTAS Y NEMATODOS	15
LITERATURA CITADA.....	17
CAPITULO II	30
RESPUESTA DEL CHILE CM-334 A LA INOCULACIÓN CON MICELIO DE <i>PHYTOPHTHORA CAPSICI</i> EN PLANTAS DECAPITADAS E INFECTADAS POR <i>NACOBBUS ABERRANS</i>	30
RESUMEN	30
ABSTRACT.....	31
INTRODUCCIÓN	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
<i>MATERIAL VEGETAL</i>	34
<i>INOCULACIÓN CON N. ABERRANS</i>	35
<i>INOCULACIÓN CON P. CAPSICI</i>	35
<i>TRATAMIENTOS</i>	35
<i>AVANCE DE LA NECROSIS Y COLONIZACIÓN DEL TEJIDO POR P. CAPSICI</i>	36
<i>INFECCIÓN POR N. ABERRANS</i>	37
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	37
RESULTADOS.....	37
<i>RESPUESTA DE LAS PLANTAS RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A LA INFECCIÓN CON P. CAPSICI</i>	37
<i>NECROSIS CAUSADA POR EL MICELIO DE P. CAPSICI EN PLANTAS DE CM-334 COMPLETAS Y DECAPITADAS</i>	37
<i>SEVERIDAD CAUSADA POR P. CAPSICI EN PLANTAS DE CM-334 COMPLETAS Y DECAPITADAS</i>	41
<i>COLONIZACIÓN DEL MICELIO DE P. CAPSICI EN PLANTAS DEL CM-334 COMPLETAS O DECAPITADAS</i> ..	43
<i>INFECCIÓN POR N. ABERRANS</i>	43
DISCUSIÓN	45
LITERATURA CITADA.....	48
CAPITULO III	53
ACTIVIDAD DE PAL, ACUMULACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDEOS EN EL CHILE CM-334 INFECTADO POR <i>NACOBBUS ABERRANS</i> E INOCULADO CON <i>PHYTOPHTHORA CAPSICI</i>	53
RESUMEN	53

ABSTRACT.....	54
INTRODUCCIÓN	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
<i>MATERIAL VEGETAL</i>	58
<i>PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE P. CAPSICI E INOCULACIÓN</i>	58
<i>ESTABLECIMIENTO DE LOS EXPERIMENTOS</i>	58
<i>Experimento 1. Inoculación por aspersión de zoosporas</i>	58
<i>Experimento 2. Inoculación con micelio en plantas decapitadas</i>	59
<i>EVALUACIÓN DE LOS EXPERIMENTOS</i>	59
<i>AVANCE DE LA NECROSIS Y COLONIZACIÓN DEL TEJIDO POR P. CAPSICI</i>	59
<i>TOMA DE MUESTRA PARA LAS DETERMINACIONES DE LA ACTIVIDAD DE PAL Y CONTENIDO DE FENOLES SOLUBLES Y FLAVONOIDES</i>	60
<i>CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PAL</i>	60
<i>CUANTIFICACIÓN DE FENOLES SOLUBLES TOTALES</i>	61
<i>CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES</i>	61
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	61
<i>INFECCIÓN POR N. ABERRANS</i>	61
RESULTADOS.....	62
<i>Experimento 1. Inoculación por aspersión de zoosporas</i>	62
<i>Experimento 2. Inoculación con micelio en plantas decapitadas</i>	66
DISCUSIÓN	70
LITERATURA CITADA.....	72
CAPITULO IV	78
ACTIVIDAD DE PAL EN EL CHILE CM-334 INFECTADO CON NACOBBUS ABERRANS Y EL FOLLAJE INOCULADO POR INMERSIÓN EN ZOOSPORAS DE PHYTOPHTHORA CAPSICI	78
RESUMEN	78
ABSTRACT.....	79
INTRODUCCIÓN	79
MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
<i>MATERIAL VEGETAL</i>	82
<i>OBTENCIÓN DE INÓCULO DE NACOBBUS ABERRANS</i>	82
<i>OBTENCIÓN DE INÓCULO E INOCULACIÓN CON ZOOSPORAS POR INMERSIÓN</i>	83
<i>ESTABLECIMIENTO DEL EXPERIMENTO</i>	83
<i>AVANCE DE LA NECROSIS</i>	83
<i>CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PAL</i>	83
<i>ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE PAL</i>	84
<i>Extracción de RNA total</i>	84
<i>Generación de la Sonda Homóloga para PAL</i>	84
<i>Hibridación</i>	85
<i>Toma de muestras</i>	85
<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i>	85
<i>INFECCIÓN POR N. ABERRANS</i>	85
RESULTADOS.....	85
<i>ACTIVIDAD Y ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE PAL EN LAS HOJAS DEL CM-334</i>	86
<i>ACTIVIDAD Y ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE PAL EN LAS RAÍCES DEL CM-334</i>	86
DISCUSIÓN	91
LITERATURA CITADA.....	92

TABLA DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Colonización de <i>P. capsici</i> en segmentos de tallo y de raíz a los 25 días después de la inoculación con micelio en tallos y zoosporas en raíces de plantas de chile CM-334 en presencia o ausencia de <i>N. aberrans</i>	43

TABLA DE FIGURAS

		Página
Fig. 1.	Ruta de los fenilpropanoides. Abreviaciones: C4H, cinamato 4-hidroxilasa; 4-CL, 4-coumarato:CoA ligasa; PAL, L-fenilalanina amonía liasa.....	9
Fig. 2.	Localización de las secciones de tallo (de 0.5 cm cada una) tomadas de plantas de chile resistente a CM-334 en los que se determinó el avance de la colonización por <i>P. capsici</i> a los 25 días posteriores de la inoculación del oomiceto en las plantas.....	34
Fig. 3.	Necrosis en cm de plantas completas o decapitadas e infectadas con micelio o zoosporas en la raíz en presencia y ausencia de <i>N. aberrans</i>	38
Fig. 4.	Síntomas desarrollados en plantas de chile resistente (R) y susceptible (S), decapitadas (d) o completas e inoculadas con micelio de <i>P. capsici</i> (Om) en presencia o ausencia de <i>N. aberrans</i> (Na) a los 20 días posteriores a la inoculación con el oomiceto (pio).....	39
Fig. 5.	Porcentaje de severidad en plantas decapitadas o completas e infectadas con micelio o zoosporas en la raíz en presencia y ausencia de <i>N. aberrans</i> . R+Na+Omd: Chile R decapitado e inoculado con el nematodo y micelio del oomiceto sobre el área decapitada.....	41
Fig. 6.	Síntomas desarrollados en plantas no decapitadas de chile resistente (R) y susceptible (S), inoculadas con zoosporas asperjadas de <i>P. capsici</i> (Za) en presencia o ausencia de <i>N. aberrans</i> (Na), a los 35 días después de la inoculación con el oomiceto.....	62
Fig. 7.	Porcentaje de severidad (a) y necrosis (b) en plantas completas e inoculadas con zoosporas asperjadas (Za) al follaje en presencia y ausencia de <i>N. aberrans</i> (Na).....	63
Fig. 8.	Actividad de PAL (a), concentración de fenoles solubles (b) y flavonoides totales (c) en hojas, tallos y raíces del chile CM-334 no decapitado infectado con <i>Nacobbus aberrans</i> (Na) e inoculado por aspersión (a) de zoosporas (Z) de <i>Phytophthora capsici</i>	64
Fig. 9.	Síntomas desarrollados en plantas de chile resistente (R) y susceptible (S), decapitadas (d) e inoculadas con micelio de <i>P. capsici</i> (Md) en presencia o ausencia de <i>N. aberrans</i> (Na), a los 35 días posteriores a la inoculación con el oomiceto.....	66
Fig. 10.	Porcentaje de severidad (a) y necrosis (cm) (b) en plantas decapitadas	

	(d), e inoculadas con micelio (M) en el tallo en presencia y ausencia de <i>N. aberrans</i> (Na).....	67
Fig. 11.	Actividad de PAL (a), concentración de fenoles solubles (b) y flavonoides totales (c) en hojas, tallos y raíces del chile CM-334 decapitado infectado con <i>Nacobbus aberrans</i> (Na) e inoculado con micelio de <i>Phytophthora capsici</i>	68
Fig. 12.	Región de amplificación del exón 2 del gen <i>PAL</i> de <i>Solanum tuberosum</i> , las flechas indican la posición de los iniciadores o primers (PAL1Fow: Foward, PAL1Rev: Reverse).....	83
Fig. 13.	Necrosis (cm) (a) y porcentaje de severidad (b) de las plantas del chile CM-334 infectadas con <i>Nacobbus aberrans</i> y el follaje inoculado por inmersión con una suspensión de zoosporas de <i>P. capsici</i>	86
Fig. 14.	Síntomas de las plantas del chile CM-334 infectadas con <i>Nacobbus aberrans</i> e inoculadas por inmersión en una suspensión de zoosporas de <i>P. capsici</i> a las 6 h y a los 15 días pio.....	87
Fig. 15.	Acumulación de transcritos de <i>PAL</i> en hojas (a) y raíces (b) del chile CM-334 infectado con <i>N. aberrans</i> (Na) y el follaje inoculado por inmersión con zoosporas de <i>P. capsici</i> (Zi), en presencia o ausencia de a las 2, 6 y 12 horas posteriores a la inoculación con el oomiceto (hpio)...	88
Fig. 16.	Actividad de <i>PAL</i> en las hojas (a) y raíces (b) del chile CM-334 infectado con <i>N. aberrans</i> (Na) y el follaje inoculado por inmersión con una suspensión de zoosporas de <i>P. capsici</i> (Zi).....	89

CAPITULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

Origen e importancia del chile (*Capsicum annuum* L.)

El chile *Capsicum annuum* L., es uno de los cinco chiles domesticados en América que tienen variaciones en forma, tamaño y color de sus frutos. Junto con el maíz, el chile forma parte de la dieta neotropical de México (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009). De las 25 especies reconocidas del género *Capsicum* (familia Solanaceae), cinco son económicamente importantes *C. annuum*, *C. frutescens* L., *C. baccatum* L., *C. pubescens* Ruiz. y Pav., y *C. chinense* Jacq. (Perry *et al.*, 2007). En Mesoamérica fueron domesticados *C. annuum* y *C. frutescens*, mientras que *C. baccatum*, *C. pubescens* y *C. chinense* se domesticaron en Sudamérica (Pickersgill, 2007). La evidencia arqueológica indica que el chile fue utilizado en México como fuente de alimento cerca del año 8000 A. C. (Smith, 1967), los chiles más antiguos fueron encontrados en el Valle de Tehuacán domesticados entre el 5000 y 6000 A. C. (Perry *et al.*, 2007; Pickersgill, 2007). Durante miles de años, las variedades de chile fueron cultivadas junto a otros cultivos en el nuevo mundo, poco a poco se dispersaron principalmente al norte y sur de América, posteriormente fueron introducidas a Europa (Pickersgill, 1977; 1969). Actualmente, el chile (*C. annuum*) es considerado como una de las cinco hortalizas más importantes a nivel mundial y México ocupa el segundo lugar en producción del cultivo (FAOSTAT, 2011). Durante el ciclo agrícola 2010, los productores mexicanos sembraron 148,758.88 has, obteniendo una producción de 2,335,560.31 tons (SAGARPA, 2011).

Marchitez del chile causada por *Phytophthora capsici* Leo.

El cultivo de chile es afectado por plagas y enfermedades que limitan su desarrollo, la enfermedad conocida como marchitez del chile causada por el oomiceto *Phytophthora capsici* es de gran importancia debido a que puede provocar hasta el 40% de mortalidad de plantas (Velásquez-Valle *et al.*, 2001) y en la época de lluvias la incidencia de la enfermedad aumenta del 20 al 80% (Guigón-López y González-González, 2001). Los síntomas son diferentes dependiendo del sitio de infección; en el cuello del tallo y en las raíces de la planta causa pudriciones, mientras que en el follaje las lesiones son circulares y de aspecto húmedo (Lee *et al.*, 2001; Velásquez-Valle *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 1994). El manejo de la enfermedad se ha realizado principalmente mediante la aplicación de fungicidas como el

Mefenoxam; sin embargo, en los últimos años *P. capsici* ha desarrollado resistencia y por lo tanto se han implementado otras alternativas de control como el control biológico (Ezziyani *et al.*, 2004) y el uso de cultivares resistentes a *P. capsici* (Ristaino y Johnston, 1999; Walker y Bosland, 1999).

Resistencia del chile a *P. capsici*

En México, investigadores del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), encontraron que la línea del chile “Criollo de Morelos 334” es altamente resistente a *P. capsici*. Se ha determinado que el chile CM-334 tiene resistencia a los tres síndromes causados por *P. capsici*: tizón de hojas y tallos, y pudrición de la raíz (Sy *et al.*, 2005; Redondo, 1985; Guerrero-Moreno y Laborde, 1980). Guerrero-Moreno y Laborde (1980) reportan que la resistencia en raíces es conferida por dos genes recesivos, en cambio, Gil Ortega *et al.*, (1991), indican que son tres genes dominantes. Tal resistencia se ha mantenido aún cuando se ha inoculado con las cepas más patogénicas del oomiceto bajo diferentes ambientes (Glosier *et al.*, 2008; Alcántara y Bosland, 1994; Gil Ortega *et al.*, 1991; Guerrero-Moreno y Laborde, 1980). Por otro lado, Reifschneider *et al.*, (1992), concluyen que existen dos genes y la resistencia se manifiesta cuando un gen dominante y otro como recesivo en epistasis. Respecto a la herencia de la resistencia en el follaje, Walker y Bosland (1999) proponen que ésta, es conferida por dos genes diferentes dominantes independientes a los de la raíz. Por su parte, Sy *et al.*, (2005), indican que los genes que confieren la resistencia en los tres estratos (raíz, tallo, hojas) son diferentes. Sin embargo, los resultados en híbridos de un análisis por mapas del *loci* de caracteres cuantitativos (QTLs por sus siglas en inglés) resultantes de cruza del CM-334 y el genotipo susceptible Yolo Wonder, sugieren que la resistencia de CM-334 contra *P. capsici* es poligénica y parcial (Bonnet *et al.*, 2007).

Interacción molecular entre Plantas y Oomicetos

Actualmente, la comunicación molecular entre plantas y oomicetos está siendo estudiada y la interacción del oomiceto *P. capsici* y las plantas de chile aún tiene mucho por descifrarse, sin embargo, los avances en otros oomicetos pueden en parte explicar lo que ocurre durante la interacción de *P. capsici* con el chile.

Los oomicetos son organismos eucarióticos que han colonizado muchos nichos ecológicos, a pesar de que su origen se encuentra en el ambiente marino, sólo el 5% de los oomicetos son parásitos marinos de algas, diatomeas, crustáceos y nematodos mientras que el 60% son patógenos de plantas (Thines y Kamoun, 2010). Dentro del grupo de los oomicetos, el orden Peronosporales reúne características evolutivas importantes, ya que los antecesores fueron oportunistas saprófitos parecidos al género *Pythium* que han ido gradualmente evolucionando a hemibiótrofos, como las especies de *Phytophthora* y posteriormente a necrótrofos. La expresión de los genes 156 *ELIs* y *ELL*, que codifican para las elicinas, demuestra que las especies de *Phytophthora* provienen de un ancestro común (Jiang *et al.*, 2006). La evolución de los oomicetos biotróficos a hemibiotróficos o necrotrofos ha sido acompañada por la expansión y diversificación de las proteínas efectoras, como las RXLR que sólo se han detectado en los Peronosporales (Haas *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2007; Tyler *et al.*, 2006). El ciclo de vida del género *Phytophthora* involucra hifas, las cuáles se diferencian en zoosporas para la dispersión e infección del hospedante, tal diferenciación se relaciona con la fosforilación de proteínas (Judelson *et al.*, 2010), cambios de temperatura y disponibilidad de humedad. La penetración y colonización del hospedante se lleva a cabo regularmente por las zoosporas, que se enquistan y germinan directamente o forman un esporangio, se ha demostrado que los genes *Car* están involucrados con la síntesis de proteínas tipo mucinas que facilitan la adhesión y su síntesis fue inducida antes de la penetración del hospedante (Görnhardt *et al.*, 2000). Posterior a la adhesión de la superficie de la planta, la penetración está dada por la secreción de enzimas degradadoras de la pared celular como cutinasas, proteasas, endoglucanasas, exoglucanasas y quitinasas (Bruner *et al.*, 2002). Los genes *CBEL* (cellulose-binding elicitor por sus siglas en inglés, GenBank X97205), identificados en *P. parasitica*, también se relacionan con la adhesión y codifican para proteínas que se unen a la celulosa, tales genes se expresaron durante la adhesión a sustratos celulíticos, no obstante, su silenciamiento no detuvo a la infección (Gaulin *et al.*, 2002).

Interacción molecular entre el oomiceto *P. capsici* y el chile

Desde que Leonian en 1922 describió a *P. capsici* la comprensión de la interacción del chile con este oomiceto ha ido avanzando y actualmente la importancia de *P. capsici* radica principalmente en su amplio rango de hospedantes, su rápida adaptación a diferentes condiciones ambientales y su alto grado resistencia a fungicidas (Ristaino y Johnston, 1999).

La resistencia del CM-334 contra *P. capsici* se menciona que es conferida por dos genes dominantes simples dependiendo de tejido que infecta el oomiceto; el primero de ellos es el gen *Pfo* responsable de la resistencia foliar y el gen *Pfr* que confiere la resistencia al fruto (Wang y Bosland, 2006; Sy *et al.*, 2005; Walker y Bosland, 1999). Recientemente, el genoma de *P. capsici* se secuenció y algunos avances revelan que el genoma del oomiceto es de 65 Mpb; contiene 420 genes RXLR, 146 genes RXLR+EER y 96 genes HMN relacionados como efectores en la traslocación de proteínas (Lamour *et al.*, 2007). Asimismo, Muñoz y Baley (1998), identificaron los genes que codifican para las cutinasas, enzimas clave durante la penetración en la interacción del chile Ancho San Luis y *P. capsici* (cepa P1314-T1).

Influencia del tipo de inóculo -zoosporas o micelio- y diferencias en la expresión de síntomas y genes

La aparición de síntomas causados por los oomicetos es dependiente del tipo de inóculo que entra en contacto en la superficie de las plantas. Por ejemplo, la necrosis en el chile CM-334 inoculado con el micelio de *P. capsici* es visible entre los 6 y 9 días posteriores a la inoculación; mientras que con zoosporas los síntomas se observan hasta los 15 y 35 días (Candela *et al.*, 2004). Molecularmente, también existen diferencias en la expresión de genes dependiendo si la inoculación se hace con zoosporas o con micelio. Por ejemplo, en la interacción de *Nicotiana tabacum* cv Pitit Havana y *P. nicotianae*, la inoculación con zoosporas indujo la acumulación de transcritos de los genes que codifican para las celulasas, el transportador ABC, la enzima ribonucleotido reductasa y la enzima xilitol deshidrogenasa; en cambio en la inoculación con micelio no ocurrió la acumulación de transcritos (Skalamera *et al.*, 2004). Las diferencias no sólo se observan en los genes expresados por la planta, sino también en los expresados por el patógeno dependiendo del tipo de inóculo; así, en condiciones *in vitro* el micelio de *P. infestans* expresó el gen *infl*, pero no fue inducida su expresión en esporangióforos, zoosporas, zoosporas enquistadas ni en zoosporas germinadas (Kamoun *et al.*, 1997).

Respuestas de defensa del chile CM-334 contra *P. capsici*

Las respuestas de defensa del chile CM-334 contra *P. capsici* son tanto estructurales como químicas. La defensa estructural de CM-334 contra *P. capsici* se ha relacionado con la presencia de tricomas en hojas y tallos, ya que la ausencia de tricomas en tallos y hojas en la

descendencia de cruces entre CM-334 y el cultivar Americano (susceptible), predispuso a que las plantas fueran susceptibles al oomiceto (Egea-Gilabert *et al.*, 2008).

La defensa química del chile CM-334 a *P. capsici* se manifestó después de la penetración del oomiceto y la detención del avance del mismo fue producto del efecto fungistático ejercido por la acumulación de metabolitos tóxicos, más que por la presencia de barreras físicas (Fernández-Pavía, 1997). Las enzimas y metabolitos que se han relacionado con la resistencia a *P. capsici* en los genotipos de chile, incluyendo a CM-334, son las quitinasas, β -1,3-glucanasas, peroxidasas, fenilalanina amonio liasa (PAL), β -D-glucosidasas, polifenoloxidasas, *trans*-cinamato 4-hidroxilasa (CA4H), compuestos fenólicos, especies reactivas de oxígeno y capsidiol (Koc *et al.*, 2011; Alcázar *et al.*, 1995; Candela *et al.*, 1995; Lizzi *et al.*, 1995; Mozzetti *et al.*, 1995; Kim y Hwang, 1994). En las hojas de CM-334 inoculadas con zoosporas de *P. capsici*, se observó la reacción de hipersensibilidad microscópicamente y fue asociada con un rápido incremento en la concentración de ácido jasmónico que disminuyó a las 2 h posteriores a la inoculación, mientras que el ácido salicílico se incrementó (Ueeda *et al.*, 2006). Tanto en el chile CM-334 como en la línea Quadrato, ambos resistentes a *P. capsici*, la resistencia se asoció en parte con un incremento en la actividad de la enzima fenilalanina amonio-liasa (Koc *et al.*, 2011; Fernández-Pavía, 1997; Mozzetti *et al.*, 1995). En las raíces de CM-334 infectadas con zoosporas de *P. capsici*, la acumulación de transcritos de los genes *Pal* ocurrió a las 6 h, tal acumulación se relacionó con cambios cualitativos y cuantitativos en los compuestos fenólicos y la actividad de peroxidasas acídicas también se incrementó; los compuestos fenólicos inhibieron el crecimiento del oomiceto *in vitro* (Fernández-Pavía, 1997). En las hojas de CM-334 inoculadas con *P. capsici* se observó una inducción en la actividad de PAL a los 2 días posteriores a la inoculación, también se presentó un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, H₂O₂, y una menor peroxidación de lípidos en la medida en que se incrementó la densidad de inóculo y transcurrió el tiempo durante la infección (Koc *et al.*, 2011). López-Martínez *et al.*, (2011) encontró que las hojas de chile CM-334 tuvieron un mayor contenido de ácido clorogénico (105%) más en comparación con un cv susceptible, y el ácido clorogénico se ha relacionado con la resistencia a patógenos (Wuyts *et al.*, 2006; Pegard *et al.*, 2005; Shadle *et al.*, 2003; Huang y Rhode, 1973).

Metabolismo secundario: La ruta fenilpropanoide

Las plantas producen alrededor de 50,000 estructuras de bajo peso molecular, es probable que varios miles de compuestos del metabolismo secundario no sean aún conocidos (Berhow y Vaughn, 1999). Una clase importante de compuestos del metabolismo secundario en las plantas son los fenilpropanoides, los cuales tienen un papel en la interacción de las plantas con el ambiente incluyendo los factores bióticos y abióticos (Berhow y Vaughn, 1999). La síntesis de compuestos fenólicos inicia en la ruta del shikimato que es la que controla el flujo de entrada de carbono, en la ruta del shikimato intervienen los intermediarios eritrosa 4 fosfato y el fosfoenolpiruvato del metabolismo de carbohidratos y glicólisis que son condensados a DAHP (3-deoxy-D-arabino-heptulosanato 7-fosfato) por la actividad de la enzima DAHP sintasa y este es el primer paso para que en esta ruta se produzca el aminoácido aromático L-fenilalanina, que es deaminado por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL; EC 4.3.1.5). PAL cataliza la deaminación no oxidativa de la L-fenilalanina formando el ácido *trans*-cinámico y un ión amonio libre (Vogt *et al.*, 2010; Ferrer *et al.*, 2008). Con esta reacción inicia la síntesis de una amplia gama de compuestos como los ácidos fenólicos, flavonoides, isoflavonoides, coumarinas, ligninas, ésteres de ácidos hidroxicinámicos y otros compuestos fenólicos (Fig. 1) (Jones, 1984).

PAL es la enzima principal en la síntesis de compuestos fenólicos, se ha demostrado que existe una correlación entre los genes PAL/proteína expresión/actividad e incrementos en los compuestos fenólicos en respuesta a un estímulo. La regulación de la producción de estos compuestos se menciona que es vía síntesis de novo, pero también por retroalimentación (Blount *et al.*, 2000) o modificaciones postranscripcionales (Cheng *et al.*, 2001; Allwood *et al.*, 1999). Stanfford (1974) menciona que PAL también participa en la formación de complejos enzimáticos responsables de la canalización metabólica específica para la biosíntesis de fenólicos, conocidos como los compartimentos metabólicos o metabolones (Rasmussen y Dixon, 1999). Experimentos recientes revelaron los metabolones en plantas de tabaco transgénicas en las que se expresaron dos isoformas de PAL independientes (PAL1 y PAL2) en relación con la enzima cinamato 4-hidroxilasa (C4H). Los resultados sugieren que la localización de las dos isoformas de PAL es diferente y depende de la cantidad de C4H capaz para organizar el complejo con PAL1 (Achnine *et al.*, 2004). PAL1 fue ubicada en el retículo endoplasmático, mientras que PAL2 fue localizada en el citosol, ambas isoformas

producen ácido cinámico, pero la diferenciación en su colocalización permite la diversificación en la síntesis de los compuestos fenilpropanoides. Los metabolitos también han sido evidenciados en *Arabidopsis*, esta planta tiene cuatro isoformas de la enzima 4-coumarato CoA ligasa (4CL) y se ha observado que *AtCL1* y *AtCL2* tienen una ligera preferencia por el ácido cafeíco que por el *p*-coumarato en comparación con la isoforma *AtCL3*, el ácido cafeíco representa una ruta menor hacia la biosíntesis de lignina, sin embargo, el ácido *p*-coumarato sirve como un intermediario tanto para la síntesis de lignina como de flavonoides (Ethling *et al.*, 1999).

Los fenoles son compuestos que se componen de un o varios alcoholes unidos a un anillo aromático (benceno) (Vermerris y Nicholson, 2008). Algunos fenólicos solubles están ampliamente distribuidos en las plantas (ejemplo: ácido clorogénico) pero otras estructuras de fenólicos están restringidos a un género o familias específicas y por lo tanto funcionan como biomarcadores en estudios taxonómicos (Vermerris y Nicholson, 2006). Los fenoles solubles de bajo peso molecular tienen una alta propiedad antifúngica en comparación con los de alto peso molecular (Harborne, 1980). Friend (1981) sugiere que los ácidos fenólicos que se enlazan en la pared celular, crean barreras físicas y químicas contra el patógeno invasor.

Los flavonoides pueden encontrarse en las plantas como glicósidos o aglicones, pero principalmente como glicósidos libres en estructuras de quince carbonos C₆-C₃-C₆; los flavonoides tienen funciones de señalización, protectantes contra la luz UV y como compuestos antimicrobianos (Berhow y Vaughn, 1999). Su acumulación tiene relación con la presencia de microorganismos, patógenos u organismos simbióticos (Gianinazzi-Pearson, 1996; Spaink, 1995; Dixon *et al.*, 1994).

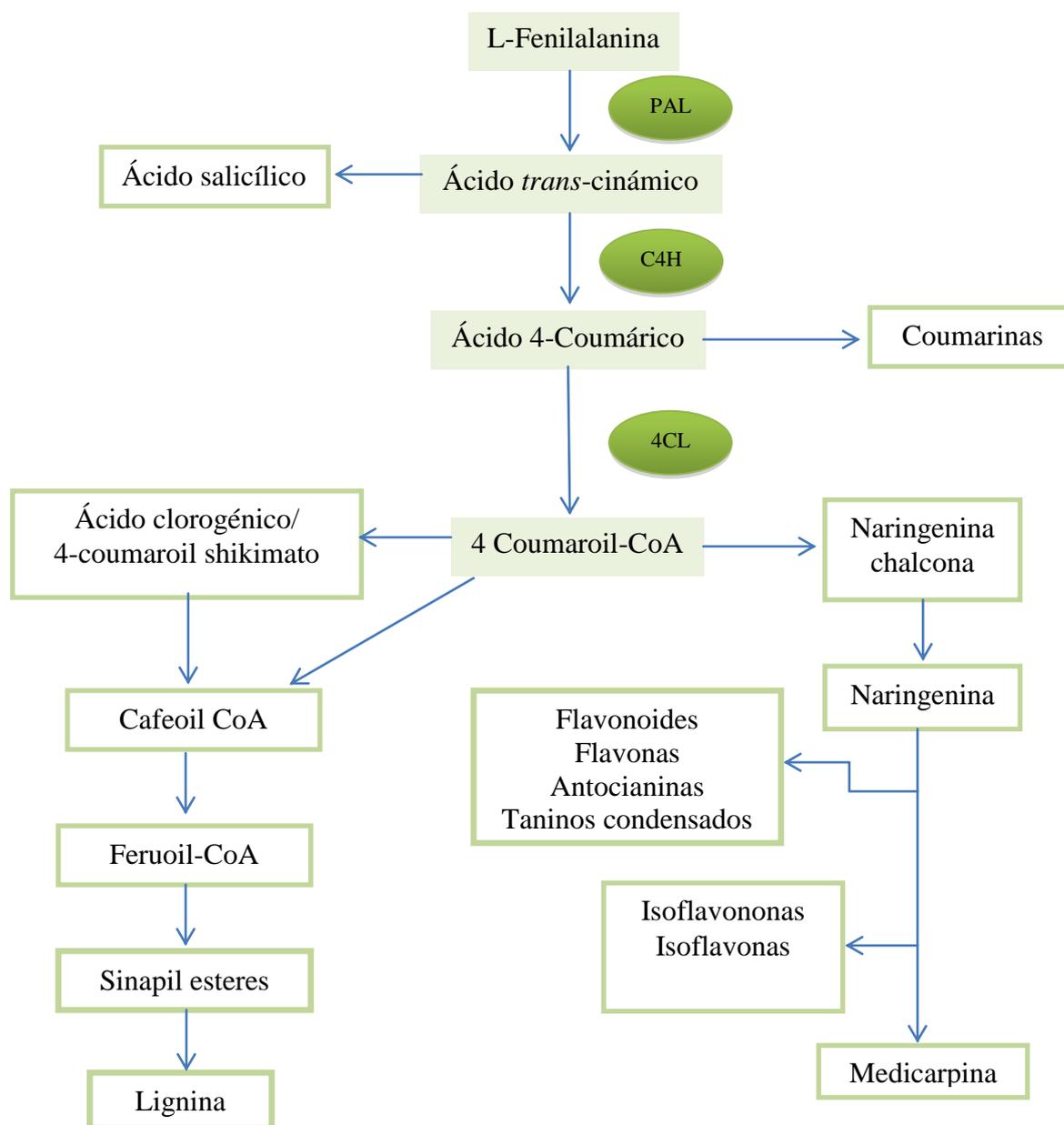


Fig. 1. Ruta de los fenilpropanoides. Abreviaciones: C4H, cinamato 4-hidroxilasa; 4-CL, 4-coumarato:CoA ligasa; PAL, L-fenilalanina amonía liasa (Dixon *et al.*, 2002).

PAL y compuestos fenilpropanoides contra oomicetos

PAL es una enzima tetramérica que se acumula principalmente en células que responden hipersensitivamente (RH) y en algunos casos la acumulación de esta enzima determina si la interacción planta-patógeno será compatible o incompatible (Hahlbrock y Scheel, 1989). PAL presenta diferentes isoformas y es codificada por una familia de genes (Cramer *et al.*, 1989), así en *Solanum* se reportan de 40 a 50 isoformas (Joos y Hahlbrock, 1992). La expresión de isoformas específicas se ha relacionado con la resistencia a un patógeno particular; así, en

plantas transgénicas de tabaco, *Arabidopsis* y papa, la infección foliar por *Erwinia carotovora* favoreció la expresión de la isoforma *PAL3* (Shufflebottom *et al.*, 1993).

En papa, se determinó que reducciones en los niveles de expresión de PAL se relacionaron con disminuciones en el contenido de ácido cinámico y un incremento en susceptibilidad a *P. infestans* (Yao *et al.*, 1995). En *Eucalyptus calophylla* resistente a *P. cinnamomi*, PAL incrementó su actividad durante las primeras 48 h, pero al término de este periodo los niveles de PAL disminuyeron drásticamente respecto a las plantas sin inocular; mientras que la concentración de lignina y fenoles solubles aumento a las 96 h posteriores a la inoculación, (Cahl y McComb, 1992). Los flavonoides pueden tener efecto tóxico sobre algunos fitopatógenos, por ejemplo el flavonoide kaempferido triglicósido considerado como fitoalexina relacionada con la resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *dianthi*, las plantas que presentaron un incremento en este flavonoide fueron resistentes a la infección (Curir *et al.*, 2001). Sin embargo, no todos los patógenos responden igual al efecto de los flavonoides; por ejemplo, Steinkellner y Mammerler (2007), cuando probaron doce flavonoides en cinco concentraciones, no observaron una inhibición en el crecimiento o germinación de las esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y estimularon la germinación de *F. solani* f. sp. *pisi* (Straney *et al.*, 2002). Otros isoflavonoides, como la daidzeina y genisteina, funcionan como atrayentes durante la germinación de zoosporas de *P. sojae* (Morris *et al.*, 1998).

Fenilpropanoides contra *P. capsici*

Dentro de los fenilpropanoides, los ácidos fenólicos son los que principalmente se han asociado con la defensa contra *P. capsici* al inhibir el crecimiento del oomiceto. Los ácidos fenólicos solubles como el ácido *t*-cinámico, el *p*-hidroxibenzoico, vainílico y salicílico inhibieron *in vitro* el crecimiento del micelio de *P. capsici* (Candela *et al.*, 1995). Alcázar *et al.*, (1995), reportaron que en el genotipo resistente Smith-5, en comparación con un cv susceptible, hubo tanto un incremento del 99% en la actividad de PAL (662 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína min^{-1}) como en la concentración de peroxidasas; estas últimas fueron liberadas en el espacio intercelular generando condiciones adversas para el establecimiento del oomiceto. En el mismo chile Smith-5 inoculado con *P. capsici* se observó un engrosamiento de la pared celular relacionado con la acumulación de lignina y peroxidasas (Egea *et al.*, 2001). Asimismo, en tallos decapitados del chile resistente Phyto 636 e inoculados con el oomiceto, se detectó una mayor concentración del ácido clorogénico y una menor concentración de los

flavonoides glucosilados apigenina y luteína, que en pruebas *in vitro* inhibieron el crecimiento del patógeno (Lizzi *et al.*, 1995).

Interacción del chile CM-334 con nematodos agalladores

El chile CM-334 también es resistente a los nematodos agalladores *Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, *M. incognita* (Kofoid and White) Chitwood, y *M. javanica* (Treub) Chitwood dificultando la penetración de los juveniles de segundo estadio (J2) y bloqueando el desarrollo de aquellos J2 que logran penetrar, debido a la expresión del gen *Me7* localizado en el cromosoma P9 (Pegard *et al.*, 2005). En las raíces de plantas CM-334 se incrementó de manera significativa la concentración del ácido clorogénico en comparación con el chile susceptible (Djian-Caporalino *et al.*, 2001; López-Martínez *et al.*, 2011; Pegard *et al.*, 2005). En contraste con lo anterior, el chile CM-334 es susceptible al nematodo *Nacobbus aberrans* y cuando las plantas fueron infectadas por el nematodo previo a la inoculación con *P. capsici*, éstas mostraron susceptibilidad al oomiceto, es decir se “rompió su resistencia” (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 1996).

El nematodo falso agallador *N. aberrans* Thorne y Allen

El género *Nacobbus* Thorne y Allen, 1944 incluye nematodos endoparásitos de las especies *N. aberrans* y *N. dorsalis*, ambas formadores de agallas y endémicas del norte y sur de América. *Nacobbus* se desarrolla predominantemente en ambientes de secos a semisecos en altitudes altas y tiene un amplio rango de hospedantes. En México, *N. aberrans* fue reportado causando pérdidas económicas en los cultivos de jitomate, frijol y chile (Toledo *et al.*, 1993).

N. aberrans presenta dimorfismo sexual, la hembra es de forma globosa tiene un solo ovario y vulva terminal, cuando la hembra se encuentra en un estado inmaduro es vermiforme y de forma obesa-hinchada cuando madura; el macho es vermiforme, con bursa terminal, campo lateral con cuatro incisuras irregularmente areoladas, dehiridios ausentes, área labial redondeada y glándulas esofágicas sobrepuestas al intestino (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

El ciclo de vida inicia con la movilidad del juvenil del segundo estadio (J2), el cuál penetra y muda invade intracelularmente las raíces formando cavidades o lesiones en los tejidos radicales durante su recorrido. Para completar su desarrollo es necesaria la formación del sitio

de alimentación denominado sincitio, inducido por la hembra inmadura vermiforme y por la hembra J4. La formación del sincitio inicia con la modificación estructural de algunas células alrededor del estilete, las células afectadas generalmente muestran citoplasma denso, núcleo y pared celular hipertrofiada, vacuolación, formación de gránulos y lisis celular (Manzanilla-López *et al.*, 2002). El ciclo tiene una duración de 28 a 95 días dependiendo de la temperatura y las hembras pueden ovopositar entre 1000 y 1500 huevecillos por saco (Clark, 1967; Prasad y Wibster, 1969; Quimí, 1979; Inserra *et al.*, 1985; Manzanilla-López *et al.*, 1997, 1999; Thorne y Allen, 1944).

La formación del sitio de alimentación por nematodos agalladores

Las interacciones de las plantas con los nematodos agalladores son complejas, ya que en este caso, los nematodos agalladores alteran la expresión génica de las células de la planta destinadas a formar el sitio especializado de alimentación, las células gigantes o el sincitio (Atkinson, 1994; Opperman *et al.*, 1994; Niebel *et al.*, 1993; Sijmons, 1993). Cuando el nematodo localiza las raíces de su hospedante, inserta el estilete por la pared celular sin dañar la membrana plasmática produciendo una invaginación y ocurre la deposición de calosa; en la membrana se origina un orificio muy pequeño por donde penetra el estilete (Hussey *et al.*, 1992). A través del estilete, el nematodo inyecta secreciones de las glándulas esofágicas que inducen la formación del sitio especializado, una vez formado el sitio de alimentación, el nematodo depende totalmente de él para completar su ciclo de vida (Gheynsen y Fenoll, 2002). La formación del sincitio por los nematodos inicia con la disolución de la pared celular de una célula y posteriormente la fusión de las células adyacentes, conforme se desarrolla el nematodo el sincitio aumenta de tamaño y en algunos casos puede estar formado por cientos de células (Vanholme *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 1981). Estructuralmente el sincitio consta de células hipertrofiadas y multinucleadas con citoplasma denso granular, una cantidad extensa de pequeñas vacuolas, proliferación de núcleos y un incremento en la cantidad de organelos como mitocondrias, plastidios, ribosomas libres, aparato de golgi y retículo endoplasmático (Wyss *et al.*, 1992). Tales modificaciones muestran la alta actividad metabólica de estas células (Jones y Northcote, 1972) que principalmente cambian su ciclo celular (Goverse *et al.*, 2000; Niebel *et al.*, 1996) y la estructura del citoesqueleto (de Almeida *et al.*, 2004).

Se ha encontrado que durante la formación del sincitio se modificó la expresión de al menos 24 genes en plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas por el nematodo *Heterodera schachtii* (Hermsmeier *et al.*, 2000). Por ejemplo, en la interacción de *M. incognita*-*Arabidopsis thaliana* se detectó la sobreexpresión del gen de la enzima la D-ribulosa-5 fosfato-3 epimerasa del ciclo de Calvin y de las pentosas fosfato, por lo que estos autores concluyen que durante la formación del sincitio existe una reprogramación de las rutas metabólicas primarias en el hospedante (Favery *et al.*, 1998). Potenza *et al.*, (2001) observaron que en plantas de *Medicago sativa* infectadas por *M. incognita* se expresaron los genes *Mia1*, *Mia2*, *Mia3* y *Mia4*; la expresión de los genes *Mia1* y *Mia2* fue mayor en las raíces y en cotiledones durante la migración y la formación de agallas por el nematodo. Los genes *Mia1* y *Mia2* codifican para una proteína con zonas ricas en glicina y para una fosfoenolpiruvato carboxinasa, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los genes *Mia3* y *Mia4* fueron similares a la isoflavona reductasa y la de metalotionina, estas enzimas son importantes en el secuestro de radicales libres de oxígeno los cuales son el resultado del estrés oxidativo durante la interacción del nematodo con su hospedante susceptible (Potenza *et al.*, 2001)

Otros reportes consignan incrementos en la expresión del gen que codifica para la síntesis de extensina (Vander Eycken *et al.*, 1992), proteína estructural de la pared celular y del gen *TobRB7*, responsable de la síntesis de proteínas formadoras de canales de membrana en raíces (Conkling *et al.*, 1990). También se ha reportado la sobreexpresión de algunos genes implicados en la reorganización del citoesqueleto en células gigantes (Jammes *et al.*, 2005; de Almeida Engler *et al.*, 2004). Al respecto se reportaron que tres genes de forminas *AtFH1*, *AtFH6* y *AtFH10* (de Almeida *et al.*, 2004) son específicamente inducidos en células gigantes. Las forminas son una familia de proteínas altamente conservada, que están implicadas en la polimerización de novo de filamentos de actina (Evangelista *et al.*, 2003). De Almeida Engler *et al.*, (2004) observaron que *AtFH6* está uniformemente distribuido en membrana plasmática lo que podría regular el crecimiento isotrópico de la célula gigante, ello mediante el control del ensamblaje de los fibras de actina. En este caso, las fibras podrían ser requeridas para orientar el tráfico de vesículas en la biogénesis de la membrana plasmática y pared celular de la célula gigante.

Durante la interacción entre las plantas y los nematodos sedentarios, las plantas también activan sus defensas. Los mecanismos de defensa consisten en incrementar la concentración de compuestos como peroxidasa, quitinasas, lipoxigenasas, extensinas, e inhibidores de proteinasas. En soya, se ha observado que la biosíntesis de fitoalexinas como la gliceolina incrementa en presencia de *M. incognita* (Kaplan *et al.*, 1980), también aumenta la deposición de calosa o lignina que actúan como barreras físicas contra la penetración del nematodo *Meloidogyne naasi* (Balhadere y Evans, 1995). Se menciona que *M. incognita* puede reprimir la expresión del gen *Pal* (Goddijn *et al.*, 1993) modificando la síntesis de fenoles, ligninas, coumarinas, flavonoides, compuestos fenólicos y fitoalexinas (Piñol y Palazón, 1996; Klessing y Malamy, 1994). Por ello, se ha determinado que los genes que se inducen durante esta interacción planta nematodo principalmente son de la ruta de isoprenoides hidroximetilglutaril CoA Reductasa (HMGR) (Cramer *et al.*, 1993) y los genes de los fenilpropanoides, principalmente los genes que codifican a la enzima chalcona sintasa (CHS) (Hutangura *et al.*, 1999).

Rompimiento de Resistencia por *N. aberrans* en el chile CM-334

El fenómeno de rompimiento de resistencia por nematodos agalladores en materiales resistentes a enfermedades por hongos y/o oomicetos ha sido documentado por varios investigadores (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005, Vargas *et al.*, 1996; Hernández *et al.*, 1992; Pérez y Pérez, 1988; Powell, 1971; Bowman y Bloom, 1966; Thomason *et al.*, 1959; Jenkins y Coursen, 1957; Martin *et al.*, 1956; Sasser *et al.*, 1955) y se explicaba por el daño mecánico causando por penetración del nematodo a las raíces; posteriormente se evidenció que es un proceso muy complejo que involucra cambios metabólicos y fisiológicos inducidos por el nematodo en el hospedante (Bowman y Bloom, 1966; Vargas *et al.*, 1996).

Se ha propuesto que el rompimiento de resistencia en el chile CM-334 se debe a la reprogramación génica que el nematodo produce en las células de la planta al inducir el desarrollo del sitio especializado de alimentación (Zavaleta-Mejía, 2002); Zavaleta-Mejía y colaboradores (2009) indican que el fenómeno de rompimiento de resistencia a *P. capsici* en CM-334 podría asociarse con cambios en la expresión de genes de las rutas de los fenilpropanoides e isoprenoides, cuya expresión o represión podría favorecer la acumulación de metabolitos que facilitarían la infección por *P. capsici*.

El rompimiento de la resistencia en CM-334 ocurrió cuando las plantas se inocularon con un mínimo de 3×10^5 zoosporas mL^{-1} a los 21 días después de haber inoculado 2000 J₂ de *N. aberrans* por planta (Trujillo–Viramontes *et al.*, 2005). Entonces, se observó que la actividad de PAL en las raíces del CM-334 se redujo en un 48% a los 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo, en comparación con la determinada en plantas no inoculadas con *N. aberrans* (Godínez-Vidal *et al.*, 2008). Asimismo, la actividad enzimática de PAL fue más baja en plantas inoculadas solo con el nematodo y en la interacción nematodo-oomiceto que en plantas inoculadas solo con el oomiceto (Godínez–Vidal *et al.*, 2008). La disminución en la actividad de PAL y se asoció con un menor contenido de fenoles solubles totales y en particular del ácido clorogénico en las raíces inoculadas con *N. aberrans* sólo o en combinación con *P. capsici* (López–Martínez *et al.*, 2011).

Fenilpropanoides en interacciones de plantas y nematodos

La acumulación de flavonoides, isoflavonoides, y otros compuestos fenólicos son una respuesta típica de la defensa de la planta; sin embargo, los flavonoides inhiben el transporte de auxinas y su producción local podría disparar la acumulación de la auxina (Hutangura *et al.*, 1999), regulador de crecimiento considerado importante para el desarrollo de las células gigantes o del sincitio. Se tiene también evidencia de que rutas específicas de defensa en la planta, pueden ser localmente reprimidas dentro de los sitios específicos. Por ejemplo, la acumulación de la fitoalexina gliceolina en plantas de soya aumenta después de la infección por *M. incognita* (Kaplan *et al.*, 1980) y *H. glycines* (Huang y Barker, 1991), limitando el establecimiento de estos nematodos en los tejidos. En otra interacción de *Pinus strobus*-*Bursaphelenchus xylophilus* se detectó la acumulación de estilbeno (3-*O*-metildihidropinosilvin estilbenoide) y una flavona (2*S*-pinocembrina flavonona), ambos con propiedades que limitan el crecimiento del nematodo (Hanawa *et al.*, 2001). En *Phaseolus lunatus*, la fitoalexina coumestrol incremento desde el primer día de la inoculación con *Pratylenchus scribneri* de 40 μg por g de raíz hasta 70 μg en el cuarto día posterior a la inoculación (Rich *et al.*, 1977). El coumestrol tiene un efecto en la movilidad del nematodo con una $\text{DL}_{50} = 10\text{-}15 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra *P. scribneri* pero no en *Meloidogyne javanica* (Veech, 1982; Rich *et al.*, 1977). También en las interacciones incompatibles del chile CM-334 con *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*, se encontró que el contenido de fenoles solubles

totales se incrementó, especialmente el ácido clorogénico (Pegard *et al.*, 2005). En contraste con lo anterior, en la interacción compatible del chile CM-334 con *N. aberrans*, la acumulación de fenoles solubles y del ácido clorogénico fueron reducidos (López-Martínez *et al.*, 2011). En genotipos de *Cajanus cajan* resistentes a *Fusarium udum* se observaron disminuciones en la acumulación del isoflavonoide y fitoalexina cajanol después de la infección por *M. incognita* y *M. javanica* (Marley y Hillocks, 1994).

Los resultados obtenidos hasta ahora por nuestro grupo de trabajo indican que *N. aberrans* abate algunos mecanismos de defensa de la planta, como son la actividad de las enzimas PAL (López-Martínez *et al.*, 2011; Godínez-Vidal *et al.*, 2008) y peroxidasas (López-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Herrera, 2011), la acumulación de los transcritos de los genes *EAS*, *PR-1*, *POX* y *GLU* (Fernández-Herrera, 2011), y la acumulación de fenoles (López-Martínez *et al.*, 2011). Estos resultados sugieren que *N. aberrans* reduce las respuestas de defensa contra *P. capsici* en las raíces del chile CM-334. Por lo anterior y dado que la expresión de síntomas en CM-334 depende del tipo de inóculo de *P. capsici* (Candela *et al.*, 2004) y de que los genes de resistencia de la raíz son diferentes a los del follaje (Sy *et al.*, 2005), la presente investigación tuvo los siguientes objetivos e hipótesis:

Objetivos

- Evaluar la respuesta de resistencia de plantas CM-334 a la inoculación foliar con *P. capsici* e inoculadas previamente con *N. aberrans*.
- Comparar la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL), la expresión de genes PAL, y la acumulación de compuestos fenólicos en plantas de chile CM-334 infectadas y no infectadas con *N. aberrans* e inoculadas en el follaje con *P. capsici*.

Hipótesis

- Las plantas de CM-334 inoculadas con *N. aberrans* muestran un menor grado de resistencia a diferentes tipos de inoculación de *P. capsici*.
- En el follaje de plantas CM-334 inoculadas con *N. aberrans* solo o en combinación con *P. capsici* se presenta una disminución en la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL), en la expresión de genes PAL, y en la acumulación de compuestos fenólicos en comparación con plantas inoculadas sólo con el oomiceto.

LITERATURA CITADA

- Achnine, L., Blancaflor, B. E., Rasmussen, S., and Dixon, A. R. 2004. Colocalization of L-Phenylalanine Ammonia-Lyase and Cinnamate 4-Hydroxylase for Metabolic Channeling in Phenylpropanoid Biosynthesis. *The Plant Cell* 16:3098-3109.
- Aguilar-Meléndez, A., Morrell, L. P., Roose L. M., and Seung-Chul, K. 2009. Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from México. *American Journal of Botany* 96:1190-1202.
- Alcantara, P. T., and Bosland, W. P. 1994. An inexpensive disease screening technique for foliar blight of chile pepper seedlings. *HortScience* 29:1182-1183.
- Alcazar, M. D., Egea, C., Espín, A., and Candela, M. E. 1995. Peroxidase isoenzymes in the defense response of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 94:736-742.
- Allwood, E. G., Smertenko, A. P., and Hussey, P. J. 2001. Phosphorylation of plant actin-depolymerising factor by calmodulin-like domain protein kinase. *FEBS Letters* 499:97-100.
- Atkinson, H. J. 1994. Plant-nematode interactions: Molecular and genetic basis. In *Pathogenesis and Host-Parasite Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases*, K. Kohmoto, U.S. Singh, and R.P. Singh, eds. Oxford, UK: PergamonPress. 355-369 pp.
- Balhadére, P., and Evans A. F. A. 1995. Cytochemical investigation of resistance to root-knot nematode *Meloidogyne naasi* in cereals and grasses using cryosections of roots. *Fundamentals Applied Nematology* 18:539-547.
- Berhow, M. A., and Vauhn, S. F. 1999. Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. *In: Principles and Practices in Plant Ecology: Allelochemical interactions*. Inderjit, Dakshini, K. M. M. and Foy, C., eds. CCR Press, Boca Raton, FL, US. 423-438 p.
- Bonnet, J., Danan, S., Boudet, C., Barchi, L., Sage-Palloix, A. M., Caromel, B., Palloix, A., and Lefebvre, V. 2007. Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theoretical Applied Genetics* 115:253-264.
- Bowman, P., and Blomm, J. 1996. Breaking resistance of tomato varieties to Fusarium wilt by *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology* 56:871.

- Brunner, F., W., Wirtz, J. K. C., Rose, A. G., Darvill, F. Govers, D. Scheel, T. Nurnberger 2002. A beta-glucosidase/xylosidase from the phytopathogenic oomycete *Phytophthora infestans*. *Phytochemistry* 59: 689–696.
- Cahl, D. M., and McComb, A. J. 1992. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40:315-332.
- Candela, M. E., Requena, E. M., and Egea-Gilabert, C. 2004. Análisis de rasgos cuantitativos de líneas de Pimiento (*Capsicum annuum* L.), mejoradas en relación con la resistencia a *Phytophthora capsici*. *Actas de Horticultura Número 41. II Congreso de Mejora Genética de plantas.* 141-144 p.
- Candela, M. E., Alcazar, M. D., Espin, A., Egea, C., and Almela, L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* items infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44:116-123.
- Clark, S. A. 1967. The development and life history of the false root-knot nematode, *Nacobbus serendipiticus*. *Nematologica* 13:91-101.
- Chen, B., Piel, H. W., Gui, L., Bruford, E., and Monteiro, A. 2005. The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergent evolution. *Genomics* 86:627-637.
- Conkling, A., Cheng, C., Yamamoto, Y., and Goodman, H. 1990. Isolation of transcriptionally regulated root-specific genes from tobacco. *Plant Physiology* 93:1203-1211.
- Cramer, C. L., Weissenborn, D. L., Cottingham, C. K., Denbow, C. J., and Eisenback, J. D. 1993. Regulation of defense-related gene expression during plant-pathogen interactions. *Journal of Nematology* 25:507–518.
- Cramer, C. L., Edwards, K., Dron, M., Liang, X., Dildine, S. L., Bolwell, G. P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., and Schuch, W. 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Molecular Biology* 12:367-383.
- Curir, P., Dolci, M., Lanzotti, V., and Tagliata-Scafati, O. 2001. Kaempferide triglycoside: a possible factor of resistance of Carnation (*Dianthus caryophyllus*) to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Phytochemistry* 56:717-721.

- de Almeida Engler, J., Van Poucke, K., Karimi, M., De Groodt, R., Gheysen, G. D. C., Engler, G., Gheysen, G. D. R., 2004. Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. *The Plant Journal* 16:2529-2540.
- Dixon, A. R., Achnine, L., Kota, P., Chang-Jun, L., Srinivasa, S. M. R., and Liangjiang W. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defense: A genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3:371-390.
- Dixon, R. A., Harrison, M. J., and Lamb, C. J. 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* 32:479-501.
- Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Fazari, A., Samson, M., Gaveau, L., O'Byrne, C., Lefebvre, V., Caranta, C., Palloix, A., and Abad, P. 2001. High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci *Me3* and *Me4* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theoretical Applied Genetics* 103:592-600.
- Egea-Gilabert, C., Bilotti, G., Requena, M. E., Ezziyyani, M., Vivo-Molina, J. M., and Candela M. E. 2008. Pepper morphological traits related with resistance to *Phytophthora capsici*. *Biologia Plantarum* 52:105-109.
- Egea, C., Sid, A. A., and Candela, M. E. 2001. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 158:151-158.
- Ehrling, J., Buttner, D., Wang, Q., Douglas, C. J., Somssich, I. E., and Kombrink, E. 1999. Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily distinct classes in angiosperms. *Plant Journal* 19:9–20.
- Evangelista, M., Zigmond, S., and Boone, C. 2003. Formins: signalings effectors for assembly and polarization of actin filaments. *Journal of Cell Science* 116:2603-2611.
- Ezziyyani, M., Pérez, S. C., Ahmed, S. A., Requena, M. A., y Candela, M. A. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *P. capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26:35-45.
- FAOSTAT, 2011. Estadísticas de producción de chiles verdes. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Consultado el 11 de agosto de 2011.
- Favery, B., Lecomte, P., Gil, N., Bechtold, N., Bouchez, D., Dalmaso, A. and Abad, P. 1998. RPE a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. *The EMB Journal* 17:6799-6811.

- Fernández-Herrera, E. 2011. Genes de defensa, actividad enzimática y contenido de capsidiol en chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* e infectado por *Nacobbus aberrans*. Tesis de doctorado. Instituto de Fitosanidad. Fitopatología. Colegio de Postgraduados. 73 p.
- Fernández-Pavia S. P. 1997. Host-pathogen interaction in the root rot resistant *Phytophthora capsici*/*Capsicum annuum* CM-334 pathosystem. Ph. D. Thesis. New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico, USA. 109 p.
- Ferrer, J. L., Austin, B. M., Stewart, C. Jr., and Noel, P. J. 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:356-370.
- Friend, J. 1981. Plant phenolics, lignification and plant disease. *In*: Harborne J. B., Swain T., eds. *Progress Phytochemistry*. Vol. 1. New York. USA: Pergamon Press. 197-261.
- Gaulin, E., Jauneau, A., Villalba, F., Rickauer, M., Esquerré-Tugayé, T. M., and Bottin, A. 2002. The CBEL glycoprotein of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* is involved in cell wall deposition and adhesion to cellulosic substrates. *Journal of Cell Science* 115:4565-4575.
- Gheysens G., and Fenoll, C. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology* 40:191-219.
- Gil Ortega, R., Español P. C., and Zueco, J. C. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line 'SCM-334'. *Plant Breeding* 107:50-55.
- Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Gollote, A., Tahiri, A., and Gianinazzi, S. 1996. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 133:45-57.
- Glosier, R. B., Ogundiwin, A. E., Sidhu, S. G., Sischo, R. D., and Prince, P. J. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiological races of P. capsici in pepper*. *Euphytica* 162:23-30.
- Goddijn, M., Lindsey, K., Van der Lee, F., Klap, J., and Sijmons, P. 1993. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harboring promoter-gusA fusion constructs. *Plant Journal* 4:863-873.
- Godínez-Vidal, D., Rocha-Sosa, M., Sepúlveda-García, B. E., Lara-Reyna, J., Rojas-Martínez, R., and Zavaleta-Mejía, E. 2008. Phenylalanine ammonia lyase activity in

- chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal Plant Pathology* 120:299–303.
- Goverse, A., de Almeida Engler, J., Verhees, J., van der Krol, S., Helder, J., Gheysen, G., 2000. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. *Plant Molecular Biology* 43:747–761.
- Guerrero-Moreno A., and Laborde J. A. 1980. Current status of pepper breeding for resistance to *Phytophthora capsici* in Mexico. Synopses of the IVth Meeting of the *Capsicum* Working Group of Eucarpia I. V. T., Wageningen. The Netherlands. Pp 52-56.
- Guigón-López, C., y González-González, P. A. 2001. Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el Sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:49-56.
- Gornhardt, B., Rouhara, I., and Schmelzer, E. 2000. Cyst germination proteins of the potato pathogen *Phytophthora infestans* share homology with human mucins. *Molecular Plant Microbe Interaction* 13:32–42.
- Haas B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H. Y., Handsaker, R. E., Cano, L. M., Grabherr, M., Kodira, C. D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., *et al.*: 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 461:393-398.
- Hahlbrock, K., and Scheel, D. 1989. Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology* 40:347-369.
- Hanawa, F. T., Yamada, T., and Nakashima, T. 2001. Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytochemistry* 57:223-228.
- Harborne, J. B. 1980. Plant phenolics. *In*: Bell E., A., Charlwood, B. V., eds. *Encyclopedia of Plant Physiology NS. Vol. 8: Secondary Plant Products*. Berlin, Germany: Springer, 329-402.
- Hermesmeier, D., Hart, J., Byzova, M., Rodermel, S., and Baum, T. 2000. Changes in mRNA abundance within *Heterodera schachtii*-infected roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:309-315.
- 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.

- Huang S. J., and Barker, R. K. 1991. Glyceollin I in soybean-cyst nematode interactions: spatial and temporal distribution in roots of resistant and susceptible soybeans. *Plant Physiology* 96:1302-1307.
- Hung, C. L., and Rhode, R. A. 1973. Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. *Journal of Nematology* 5:253-258.
- Hutangura, P., Mathesius, U., Jones, M. G. K., and Rolfe, B. G. 1999. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. *Australian Journal of Plant Physiology* 26:221-231.
- Hussey, S., Mims, C., and Westcott, S. 1992. Immunochemical localization of callose in root cortical cells parasitized by the ring nematode *Criconebella xenoplax*. *Protoplasma* 171:1-6.
- Hwang, K. B., and Kim, H. C. 1995. Differential accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45:195-209.
- Insera, R. N., Griffin, D. G., and Anderson, L. J. 1985. The false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. Research Bulletin, Utah Agricultural Experimental Station No. 510:14 pp.
- Jammes, F., Lecomte, P., de Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette L. M., Renou, J. P., Abad, P., and Favery, B. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 44:447-458.
- Jenkins, W. R., and Coursen, B. W. 1957. The effect of root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita acrita* and *M. hapla*, on Fusarium wilt of tomato. *Plant Disease Reporter* 41:182:186.
- Jiang H. Y. R., Tyler, M. B., Stephen, C., Adrienne, H. R. W., and Govers, F. 2006. Ancient origin of elicitor gene clusters in *Phytophthora* Genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 23:338-351.
- Jones, H. D. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry* 23:1349-1355.
- Jones, M. G. K. 1981. Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and function of giant cells and syncytia. *Annual Applied Biology* 97:353-372.

- Jones, M. G. K., and Northcote, D. H., 1972. Nematode-induced syncytium-a multinucleate transfer cell. *The Journal Cell Science* 10:789–809.
- Joos, H., and Hahlbrock, K. 1992. Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum*) genomic complexity, structural comparison of two select genes and modes of expression. *European Journal of Biochemistry* 204:621-629.
- Judelson, S. H., Ah-Fong, A. M. V., and Fabritius, A. L. 2010. An RNA symbiont enhances heat tolerance and secondary homothallism in the oomycete *Phytophthora infestans*. *Microbiology* 156:2026-2034.
- Kamoun, S., P., van West, A. J., de Jong, K. E., de Groot, V. G. A. A., Vleeshouwers, and F. Govers. 1997. A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of Potato. *Molecular Plant Microbe Interactions* 10:13-20.
- Kaplan, D. T., Keen, N. T., and Thomason, I. J. 1980. Studies on the mode of action of glyceollin in soybean incompatibility to the root-knot nematode, *Meloidogyne* intracellular and intercellular trafficking in plants. *The Plant Cell* 11:535-548.
- Klessing, D., and Malamy, J. 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* 26:1439-1458.
- Kim, J. Y., and Hwang K. B. 1994. Differential accumulation of β -1,3-glucanase and chitinase isoforms in pepper stems infected by compatible and incompatible isolates of *Phytophthora capsici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45:195-209.
- Koc, E., Sülün Üstüna, A., Islek, C., and Kasko, Y. A. 2011. Defense responses in leaves of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars infected with different inoculum concentrations of *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae* 128:434-442.
- Lamour H. K., Win, J., and Kamoun, S. 2007. Oomycete genomics: new insights and future directions. *Federation of European Microbiological Societies Microbiological Letters* 274:1–8.
- Lee B. K., Kim B. S., Chang S. W., and Hwang B. K. 2001. Aggressiveness to pumpkin cultivars of isolates of *Phytophthora capsici* from Pumpkin and Pepper. *Plant Disease* 85:497-500.
- Lizzi, Y., Roggero, J. P., and Coulumb, P. J. 1995. Behaviour of the Phenolic Compounds on *Capsicum annuum* Leaves Infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Phytopathology* 143:619-627.

- López-Martínez, N., Colinas-León, M. T., Peña-Valdivia, B. C., Salinas-Moreno, Y., Fuentes-Montiel, P., Biesaga, M., and Zavaleta-Mejía, E. 2011. 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 and Soil* 338:399-409.
- Manzanilla-López, Costilla, H. R., Doucet A. M., Franco, M., Inserra, J., Lehman, R. N., Cid del Prado-Vera, V. I., Souza M. R., and Evans, K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda:Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149-227.
- Manzanilla-López, R. H., Harding, S., and Evans, K. 1999. Morphometric study on twelve populations of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae) from Mexico and South America. *Nematology* 1:477-498.
- Manzanilla-López, R. H., Halford, P., Russell, M., Evans, K., Cid del Prado-V. I., and Rowe, J. 1997. Characterization of *Nacobbus aberrans* from Mexico and South America. *Nematropica* 27:114.
- Marley, S. P., and Hillocks, J. R. 1994. Effect of root-knot nematodes on cajanol accumulation in the vascular tissues of pigeonpea after stem inoculation with *Fusarium udum*. 43:172-174.
- Martín, 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.
- Morris, P. F., Bone, E., and Tyler, B. M. 1998. Chemotropic and contact responses of *Phytophthora sojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates. *Plant Physiology* 117:1171-1178.
- Mozzetti, C., Ferraris, L., Tamietti, G., and Matta, A. 1995. Variation in enzyme activities in leaves on cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*–pepper interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 46:95-107.
- Muñoz, I. C. and Bailey, M. A. 1998. A cutinase-encoding gene from *Phytophthora capsici* isolated by differential-display RT-PCR. *Current Genetics* 33:225-230.
- Niebel, A., Almeida, J., Tiré, C., Engler, G., Van Montagu, M., and Gheysen, G. 1993. Induction patterns of an extensin gene in tobacco upon nematode infection. *Plant Cell* 5:1697-1710.
- Opperman, H., Taylor, G., and Conkling, M. 1994. Root-knot nematode –directed expression of a plant root specific gene. *Science* 263:221-223.

- 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 phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95:158-165.
- Pérez, M. L., y Pérez, V. J. J. 1988. Interacción *Phytophthora capsici*–*Nacobbus aberrans* en cuatro materiales de Chile *Capsicum annuum* resistentes al hongo, bajo condiciones de invernadero. Memorias XV Congreso Nacional de Fitopatología. Xalapa, Veracruz. México. 65 p.
- Perry, L., Dickau, R., Zarrillo, S., Holst, I., Pearsall, M. D., Piperno, R. D., Berman, J. M. *et al.* 2007. Starch fossils and the domestication and dispersal of chili peppers (*Capsicum* spp. L.) in the Americas. *Science* 315:986-988.
- Pickersgill, B. 2007. Domestication of plants in the Americas: Insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany* 100:925-940.
- Pickersgill, B. 1977. Taxonomy and the origin and evolution of cultivated plants in the New World. *Nature* 268:591-595.
- Pickersgill, B. 1969. The archaeological record of chili peppers (*Capsicum* spp.) and the sequence of plant domestication in Peru. *American Antiquity* 34:54-61.
- Piñol, M. T., y Palazon, J. 1996. Metabolismo Secundario. Pp. 237-283. *In: Fisiología y Bioquímica Vegetal*. J. Azcon-Bieto y M. Talon Eds. McGraw Hill Interamericana de España, Madrid.
- Potenza, C., Thomas S., and Sengupta-Gopalan, C. 2001. Genes induced during early response to *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible alfalfa cultivars. *Plant Science* 161:289-299.
- Powell, N. T. 1971. Interactions between nematodes and fungi in diseases complexes. *Annual Review of Phytopathology* 9:253-274.
- Prasad, S. K., and Webster, M. J. 1967. Effect of temperature on the rate of development of *Nacobbus serendipiticus* in excised tomato roots. *Nematologica* 13:85-90.
- Quími, V. H. 1979. Studies on the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. Ph.D. thesis, University of London, Imperial College, U.K. 235 pp.
- Rasmussen, S., and Dixon, R. A. 1999. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *The Plant Cell* 11:1537–1551.

- Redondo, J. E. 1985. Mecanismo de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici* Leo. Tesis de doctorado. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. Méx. 182 p.
- Reifschneider, F. J. B., Boiteux, S. L., Della Vecchia, T. P., Poulos, M. J., and Kuroda, N. 1992. Inheritance of adult-plant resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. *Euphytica* 62:45-49.
- Rich, J. R., Keen, T. N., and Thomason, J. 1977. Association of coumestans with the hypersensitivity of lima bean roots to *Pratylenchus scribneri*. *Physiological Plant Pathology* 10:105-116.
- Ristaino, J. B., and Johnston, A. S. 1999. Ecologically Based Approaches to Management of Phytophthora Blight on Bell Pepper. *Plant Disease* 83:1080-1089.
- Roberts, P. D., McGovern, R. J., Kucharek, T. A., and Mitchell, D. J. 1994. Vegetable Diseases caused by *Phytophthora capsici* in Florida. University of Florida Extension. Institute of Food and Agricultural Sciences. PP-176. 3 p.
- SAGARPA. 2011. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). www.siap.sagarpa.gob.mx Consultado el 9 de septiembre de 2011.
- Sasser, J. N., Lucas, G. B., and Powers, H. 1955. The relationship of root-knot nematodes to black shank resistance in tobacco. *Phytopathology* 45:459-461.
- Shadle, G. L., Wesley, S. V., Korth, K. L., Chen, F., Lamb, C., Dixon, R. A. 2003. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 64:153-161.
- Shufflebottom, D., Edwards, K., Wolfgang, S., and Bevan, M. 1993. Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction patterns. *The Plant Journal* 3:835-845.
- Sijmons, C. 1993. Plant nematode interactions. *Plant Molecular Biology*. 23:917-931.
- Skalamera, D., Wasson, A. P., and Hardham, A. R. 2004. Genes expressed in zoospores of *Phytophthora nicotianae*. *Molecular Genetics Genomics* 270:549-557.
- Smith, C. E. 1967. Plant remains. In D. S. Byers [ed.], *The prehistory of the Tehuacan Valley*, vol. 1, Environment and subsistence, 220-225 pp. University of Texas Press, Austin, Texas, USA.
- Spaink, H. P. 1995. The molecular basis of infections and nodulation by rhizobia; the ins and outs of symbiogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33:345-368.

- Stafford, H. A. 1974. Possible multienzyme complexes regulating the formation of C6-C3 phenolic compounds and lignins in higher plants. *Recent Advances in Phytochemistry* 8:53–79.
- Steinkellner, S., and Mammerler, S. 2007. Effect of flavonoids on the development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Journal of Plant Interactions* 2:17-23.
- Straney, D., Khan, R., Tan, R., and Bagga, S. 2002. Host recognition by pathogenic fungi through plant flavonoids. *In: Flavonoids in cell function*. Buselig, B., Manthey, J., Eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA. 9-22 p.
- Sy, O., Bosland, W. P., 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 for Horticultural Science* 130:75-78.
- Tian, M., Win, J., Song, J., van der Hoorn, R., van der Knaap, E., and Kamoun, S. 2007. A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant Physiology* 143:364-77.
- Thines, M., and Kamoun, S. 2010. Oomycete–plant coevolution: recent advances and future prospects. *Current Opinion in Plant Biology* 13:427-433.
- Thomason, I. J., Edwin, D. C., and Garger, M. J. 1959. The relationship of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* to Fusarium wilt in cowpea. *Phytopathology* 49:602-606.
- Thorne, G. D., and Allen, W. M. 1944. *Nacobbus dorsalis*, nov. gen. nov. spec. (Nematoda:Tylenchidae) producing galls on the roots of alfileria, *Erodium cicutarium* (L.) L’Her. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 11:27-31.
- Toledo, R., Sosa-Moss, C. C. J., and Zavaleta-Mejía, E. 1993. Gama de hospederos de cinco poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 23:105-108.
- 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.
- Tyler, B. M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R. H., Aerts, A., Arredondo, F. D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J. L., et al. 2006. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313:1261-1266.

- Ueeda, 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.
- Vander Eycken, W., Niebel, A., Inze, D., Van Montagu, M., and Gheysen, G. 1992. Molecular analysis of the interaction between *Meloidogyne incognita* and tomato. 21st. International Nematology Symposium in *Nematologica* 38:441.
- Vanholme, B., De Meutter, J., Tytgat, T., Van Montagu, M., Coomans, A., and Gheysen, G. 2004. Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. *Gene* 332:13-27.
- Vargas, E. Ma. T., Zavaleta-Mejía, E., y Hernández, A. A. M. 1996. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo., en Chile (*Capsicum annuum* L.) Serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26:159-166.
- Veech, A. J. 1982. Phytoalexins and their role in the resistance of plants to nematodes. *Journal of Nematology* 14:2-9.
- Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M. M. y Luna-Ruiz, J. de J. 2001. Sintomatología y géneros de patógenos asociados con las pudriciones de la raíz del Chile (*Capsicum annuum* L.) en el Norte-Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:175-181.
- Vermerris, W., and Nicholson R. 2008. Phenolic compound biochemistry. Springer Science Bussines Media B. V. 276 p.
- Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid metabolism. *Molecular Plant* 3:2-20.
- Wang, D., and Bosland, W. P. 2006. The genes of *Capsicum*. *HortScience* 41:1169-1187.
- Walker, J. S., and Bosland, W. P. 1999. Inheritance of *Phytophthora* root rot and foliar blight resistance in pepper. *Journal American Society Horticultural Science* 124:14-18.
- Wuyts, N., Lognay, G., Swennen, R., De Waele, D. 2006. Nematode infection and reproduction in transgenic and mutant *Arabidopsis* and tobacco with an altered phenylpropanoid metabolism. *Journal of Experimental Botany* 57:2825-2835.
- Wyss, U., Grundler, F. M. W., and Munch, A., 1992. The parasitic behaviour of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica* 38:98-111.
- Yao, K. N., Deluca, V., and Brisson, N. 1995. Creation of a metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell* 7:1787-1799.

- 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. Abstract S31-1.

CAPITULO II

RESPUESTA DEL CHILE CM-334 A LA INOCULACIÓN CON MICELIO DE *Phytophthora capsici* EN PLANTAS DECAPITADAS E INFECTADAS POR *Nacobbus aberrans*

RESUMEN

Se evaluó la respuesta del chile (*Capsicum annuum*) CM-334 inoculado en tallo con micelio de *Phytophthora capsici* en plantas completas o decapitadas, e inoculadas con *Nacobbus aberrans*. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar en cámara bioclimática y constó de 12 tratamientos con tres repeticiones y cada repetición comprendió cuatro plantas. Plantas de chile susceptible a *P. capsici* (var. Joe E. Parker) y plantas resistentes de CM-334 infectadas sin infectar con *N. aberrans* fueron inoculadas con micelio en el tallo o zoosporas del oomiceto en la raíz a los 21 días posteriores a la inoculación (pi) con el nematodo. De los 5 a los 30 días pi con el oomiceto (pio) se registró la longitud de necrosis (cm), la colonización del tallo o raíz por el oomiceto y la severidad de la enfermedad. En las plantas susceptibles, con ambos tipos de inoculación, la lesión necrótica en el tallo fue de 6 cm, se observaron síntomas de marchitez y a los 25 días pio murieron. En plantas resistentes CM-334 infectadas por el nematodo e inoculadas con zoosporas en la raíz, hubo muerte de plantas (11.1%) a los 45 días pio. La presencia de *N. aberrans* no inhibió la respuesta de hipersensibilidad (RH) en los tallos de plantas CM-334 decapitadas o sin decapitar, pero la longitud de la lesión necrótica se incrementó en 96.6% con respecto a las plantas no decapitadas y la colonización y la severidad fueron mayores en plantas decapitadas e infectadas con ambos patógenos, en comparación con las plantas decapitadas inoculadas sólo con el micelio. Los resultados obtenidos indican que *P. capsici* logró establecerse únicamente en las plantas resistentes decapitadas e inoculadas previamente con *N. aberrans*, pero en las plantas no decapitadas la presencia del nematodo aparentemente no abatió la resistencia de CM-334, ya que el avance del patógeno fue finalmente detenido. Posiblemente el establecimiento de *P. capsici* en los tallos decapitados de CM-334 fue favorecido por una disminución de la expresión en los mecanismos de defensa en las plantas infectadas con *N. aberrans*.

Palabras clave: *Nacobbus aberrans*, Nematodo falso agallador, Oomicetos, *Phytophthora capsici*, Respuesta de hipersensibilidad.

ABSTRACT

The response of pepper (*Capsicum annuum*) CM-334 inoculated with mycelium of *Phytophthora capsici* on the stem on decapitated or not decapitated plants and inoculated with *Nacobbus aberrans* was evaluated. The experiment was set up under a completely randomized design in a growth chamber and consisted of 12 treatments with three replications and each replication consisted of four plants. Chile plants susceptible to *P. capsici* (var. Joe E. Parker) and resistant plants CM-334 infected or not with *N. aberrans* were inoculated with mycelium on the stem or zoospores of the oomycete on the roots, 21 days post inoculation (pi) with the nematode. From 5 to 30 days pi with the oomycete (pio) the length of necrosis (cm), stem or root colonization by the oomycete and severity of the disease were recorded. In susceptible plants, with both types of inoculation, the necrotic lesion in the stem was 6 cm long, there were signs of wilting and died 25 days pio. Death of the plants (11.1%) was observed 45 days pio only in resistant plants infected by the nematode and inoculated with zoospores at the roots. The presence of *N. aberrans* did not inhibit the HR in the stems of decapitated and non-decapitated plants, but the length of the necrotic lesion was increased by 96.6% as compared to non-decapitated plants and both colonization and severity were higher in plants decapitated and infected with both pathogens, as compared to decapitated plants inoculated only with mycelium. The results indicate that *P. capsici* managed to establish only in the resistant decapitated plants previously inoculated with *N. aberrans*, but in non-decapitated plants the presence of the nematode apparently did not reduce the resistance of CM-334, as the progress of the pathogen was finally arrested. Perhaps, the establishment of *P. capsici* in the decapitated stems of CM-334 was favored by a less expression in the defense mechanisms in plants infected with *N. aberrans*.

Keywords: *Nacobbus aberrans*, False root-knot nematode, Oomycetes, *Phytophthora capsici*, Hypersensitive response.

INTRODUCCIÓN

La marchitez inducida por *Phytophthora capsici* Leo., es la enfermedad más destructiva en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) a nivel mundial (Oelke *et al.*, 2003; Tyler, 2002) y en México, puede causar hasta 40% de mortalidad (Guigón-López y González-González, 2001). *P. capsici* causa principalmente pudriciones en raíces, pero también puede ocurrir la infección de tallos y hojas cuando las temperaturas oscilan entre 23 y 31° C (Schulb, 1983) y cuando el inóculo es dispersado por salpique (Ristaino y Johnston, 1999). En hojas las lesiones son de forma circular, de color café grisáceo y de aspecto húmedo, mientras que en fruto las lesiones son blanquecinas por la presencia de esporangios (Ristaino y Johnston, 1999). Para el manejo de la enfermedad se ha propuesto el uso de materiales resistentes a los tres síndromes causados por el oomiceto (Ristaino y Johnston, 1999; Walker y Bosland, 1999). La línea de chile tipo serrano conocida como Criollo de Morelos 334 (CM-334), ha mostrado resistencia a los tres síndromes causados por diferentes cepas de *P. capsici* en diversas partes del mundo y ha sido clasificado como el resistente universal (Glosier *et al.*, 2008; Oelke *et al.*, 2003). La resistencia al oomiceto se expresa en los tres estratos del chile CM-334, y según Sy *et al.*, (2005) es conferida por un gen independiente diferente para cada estrato. Aunque en el chile CM-334 el tipo de resistencia ha sido un tema de discusión entre investigadores, recientemente en un estudio donde el análisis se hizo mediante QTLs, los autores concluyeron que la resistencia de CM-334 a *P. capsici* es incompleta y poligénica (Bonnet *et al.*, 2007). Se menciona que la resistencia al oomiceto en CM-334 no es influenciada por la concentración de inóculo, la etapa de crecimiento ni la temperatura (Palloix *et al.*, 1988); no obstante, el método de inoculación si parece influir en la respuesta de CM-334, pues tanto el tipo de síntomas como el tiempo de aparición de los mismos, varía dependiendo del método de inoculación. Así, la necrosis se presentó entre los 6 y 9 días después de la inoculación con micelio en plantas decapitadas (Bonnet *et al.*, 2007; Candela *et al.*, 2000); mientras que con la inoculación de zoosporas en plantas decapitadas, los síntomas se presentaron hasta los 15 y 35 días (Candela *et al.*, 2004). En contraste, en hojas inoculadas por aspersión de zoosporas (10^5 zoosporas mL⁻¹) no se presentaron síntomas visibles de hipersensibilidad, aunque a nivel microscópico sí se observó muerte celular hipersensitiva (Ueeda *et al.*, 2006). En las raíces del CM-334 la resistencia a *P. capsici* se asocia con muerte celular hipersensitiva, incrementos en la acumulación de transcritos de la enzima Fenilalanina amonio liasa (PAL) (Fernández-Pavia y Lidell, 1997), acumulación de fenoles (Fernández-Pavia, 1997), actividad de peroxidasas acídicas (Fernández-Pavia, 1997; Egea *et al.*, 1996) e incremento en la

concentración de capsidiol (Arreola-Cortés *et al.*, 2007; Egea *et al.*, 1996; Molot *et al.*, 1981). La resistencia al oomiceto en el follaje del chile CM-334 también se relacionó con la presencia de tricomas en hojas y tallos (Egea-Gilabert *et al.*, 2008) y la reacción de hipersensibilidad (RH) se asoció con incrementos en los niveles de ácido salicílico y ácido jasmónico en hojas inoculadas con zoosporas (Ueeda *et al.*, 2006). La resistencia de las plantas a un determinado patógeno es influenciada tanto por factores bióticos como abióticos. Así, en algunas variedades de plantas la resistencia a hongos u oomicetos puede ser abatida cuando son infectadas por nematodos fitoparásitos, particularmente por los endoparásitos sedentarios, como los agalladores y los formadores de quistes, que inducen cambios en las señales bioquímicas locales y sistémicas de la planta y provocan la reducción en la expresión de los mecanismos de defensa a nivel local y sistémico (Villar-Luna *et al.*, 2009; Caillaud *et al.*, 2008; López-Martínez *et al.*, 2011; Bezemer y van Dam, 2005). En los nematodos agalladores y formadores de quistes, generalmente el segundo estadio (J2) es el infectivo, el cual penetra la raíz directamente y migra hasta la zona de elongación (Hussey y Grundler, 1998). Los J2 migran a través de la corteza de la raíz hasta alcanzar el cilindro vascular. Entonces las células del esófago del nematodo sintetizan y movilizan sus secreciones a través de su estilete, promoviendo la formación del sitio especializado de alimentación consistente en el sincitio o células gigantes uninucleadas o multinucleadas (Hussey, 1989). Con la formación del sitio de alimentación los nematodos sedentarios inician su ciclo reproductivo (Davis y Mitchum, 2005). La secreción de la enzima Corismato Mutasa ha sido identificada en diferentes especies de nematodos sedentarios (*Meloidogyne* spp y *Heterodera* spp), y su actividad se ha relacionado con la modificación del metabolismo celular del hospedante, incrementando la síntesis de auxinas y disminuyendo los precursores de compuestos de defensa (Long *et al.*, 2006; Doyle y Lambert, 2003). Varios investigadores han reportado el incremento de susceptibilidad a fitopatógenos en plantas infectadas por nematodos fitoparásitos; por ejemplo, en las interacciones incompatibles alfalfa-*P. megasperma* f. sp. *medicaginis* y papa-*Verticillium albo-atrum*, la incidencia de plantas muertas y la severidad de síntomas foliares aumentaron en presencia de *Meloidogyne hapla* (Gray *et al.*, 1990) y *Pratylenchus penetrans* (Burpee y Bloom, 1978), respectivamente. En el caso de *Meloidogyne incognita* en interacción con *Fusarium oxysporium* f. sp. *vasinfectum* se incrementó la incidencia y la severidad de la enfermedad en algodón, y hubo una disminución en el rendimiento (De Vay *et al.*, 1997). Las plantas de chile del genotipo CM-334 resistentes *P. capsici*, mostraron susceptibilidad al ser infectadas por *Nacobbus aberrans*, es decir se

rompió su resistencia al oomiceto (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 1996). El rompimiento de resistencia podría en parte explicarse por la reprogramación génica que induce el nematodo en las células hospedantes que se constituyen en el sitio especializado de alimentación, en particular de aquellos genes que codifican para la síntesis de enzimas clave en la ruta de los fenilpropanoides (PAL, fenilalanina amonio liasa) y de los isoprenoides, (HMGC_oA-R, hidroximetilglutaril coenzima A reductasa), principales rutas de síntesis de metabolitos relacionados con la defensa de las plantas y la síntesis de esteroides que requiere el nematodo para su crecimiento y desarrollo (Zavaleta-Mejía, 2002). El rompimiento de resistencia en CM-334 ocurrió cuando se inocularon en la raíz 300,000 zoosporas y 2,000 J2 por planta, éste se hizo más evidente cuando el oomiceto se inoculó 21 días después de haber inoculado el nematodo (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). Se ha determinado que en plantas de CM-334 infectadas por *N. aberrans* hay una reducción en la actividad de PAL y peroxidasas, y una disminución en el contenido de fenoles solubles totales, particularmente del ácido clorogénico (López-Martínez *et al.*, 2011; Godínez-Vidal *et al.*, 2008), disminución del capsidiol (Godínez-Vidal *et al.*, 2010; Villar-Luna *et al.*, 2009), incrementos en la acumulación del gen *hmg1* asociado con la síntesis de fitoesteroides y disminución en el gen *hmg2* relacionado con fitoalexinas sesquiterpénicas (Godínez-Vidal, 2010). Asimismo, las plantas CM-334 infectadas con el nematodo en la raíz y zoosporas infiltradas en las hojas (300,000 zoosporas mL⁻¹) presentaron un retraso en la reacción de hipersensibilidad foliar y una disminución en el contenido de la fitoalexina capsidiol (Villar-Luna *et al.*, 2009). Todos estos cambios probablemente afectan los mecanismos de defensa de las plantas contra el oomiceto no solamente en la raíz, sino también a nivel foliar. Con base en estos antecedentes el presente estudio tuvo por objetivo evaluar la respuesta del chile CM-334 inoculado en tallo con micelio de *P. capsici* en plantas decapitadas o no, e inoculadas con *N. aberrans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se sembraron semillas de chile CM-334 resistente a *P. capsici* y semillas de la variedad susceptibles Joe E. Parker. Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio (1%) por 1 min seguido de tres lavados con agua destilada estéril. Se germinaron a 28°C, cada plántula se trasplantó a una maceta conteniendo 150 cm³ de arena estéril y se mantuvieron en cámaras de crecimiento a una temperatura de 27 ± 3° C, con 14 h luz y 10 h de oscuridad, y una intensidad luminosa de 6,768 lux (luz fluorescente). Cada 24 h se regaron con agua estéril y

se fertilizaron tres veces por semana aplicando una dilución de 1/10 de una solución preparada con 630 g de Nitrofoska (12:12:12:2) en 20 L de agua.

Inoculación con N. aberrans

El inóculo se obtuvo de masas de huevecillos extraídas de raíces agalladas de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* Mill.). Para que eclosionaran los huevecillos, las masas se colocaron en agua destilada estéril con Captan 28[®] y antibiótico Cloranfenicol[®] al 0.1%. Se inocularon 2000 J2 en la base del tallo de cada planta cuando tuvieron desarrolladas la tercera y cuarta hoja verdaderas (Trujillo–Viramontes *et al.*, 2005).

Inoculación con P. capsici

Se cultivó a *P. capsici* (cepa 6143 proporcionada por la Dra. Fernández-Pavía, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) en medio V-8. De cajas Petri con V-8 conteniendo crecimiento micelial de *P. capsici* se tomaron cilindros de aproximadamente 0.5 cm de diámetro y el cilindro se colocó en el tallo de las plantas decapitadas y no decapitadas bajo condiciones asépticas. El cilindro se cubrió con una toalla de papel estéril humedecida con agua destilada estéril y se fijó con parafilm. La decapitación de las plantas se realizó cortando a 0.5 cm por debajo del ápice (Fig. 2).

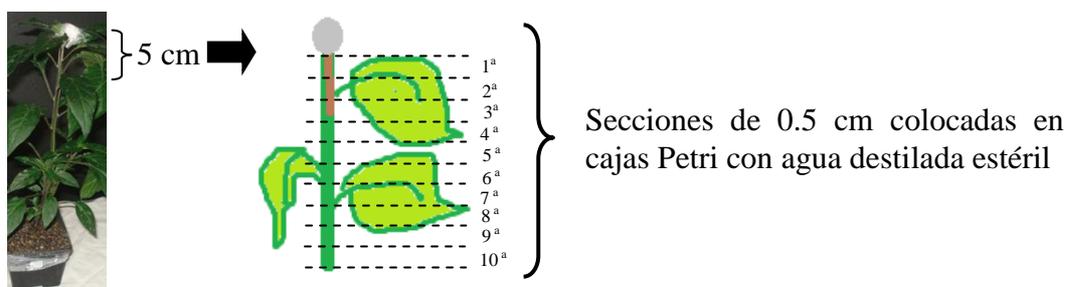


Fig. 2. Localización de las secciones de tallo (de 0.5 cm cada una) tomadas de plantas de chile resistente a CM-334 en los que se determinó el avance de la colonización por *P. capsici* a los 25 días posteriores de la inoculación del oomiceto en las plantas.

Tratamientos

Se analizaron doce tratamientos con tres repeticiones y cada repetición consistió de cuatro plantas. Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1) Plantas resistentes decapitadas e inoculadas con nematodo (Na) y micelio del oomiceto sobre el área decapitada (R+Na+Omd).

- 2) Plantas completas resistentes e inoculadas con nematodo y micelio en planta (R+Na+Om).
- 3) Plantas resistentes decapitadas sin nematodo e inoculadas sólo con micelio sobre el área decapitada (R+Omd).
- 4) Plantas completas resistentes sin nematodo e inoculadas con micelio (R+Om).
- 5) Plantas resistentes decapitadas, sin nematodo y sin micelio (R+d).
- 6) Plantas completas resistentes sin nematodo ni oomiceto (R).
- 7) Plantas completas susceptibles e inoculadas sólo con micelio (S+Om).
- 8) Plantas completas susceptibles, sin micelio ni nematodo (S).
- 9) Plantas completas susceptibles e inoculadas sólo con zoosporas en la raíz (S+Or).
- 10) Plantas completas susceptibles sin zoosporas ni nematodo, con agua en la raíz (S+r).
- 11) Plantas completas resistentes e inoculadas sólo con zoosporas en la raíz (R+Or).
- 12) Plantas completas resistentes inoculadas con nematodo y zoosporas en la raíz (R+Na+Or).

En los tratamientos testigo se colocó un cilindro de medio V8 sin micelio. El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar.

Avance de la necrosis y colonización del tejido por *P. capsici*

Las plantas de CM-334 inoculadas con *P. capsici* en presencia y ausencia de *N. aberrans* fueron evaluadas cada 5 días posteriores a la inoculación con el oomiceto (pio); para ello, se midió la longitud de la necrosis (cm) por abajo del sitio de inoculación y se estimó la severidad con una escala de 0 (planta sana) a 5 (planta muerta) propuesta por Silvar *et al.*, (2005). Con la finalidad de determinar si el micelio había avanzado sistémicamente a lo largo del tallo de las plantas de chile, a los 25 días posteriores a la inoculación con micelio o zoosporas del oomiceto se retiraron tres plantas decapitadas y tres no decapitadas e infectadas o no con *N. aberrans*. De cada planta se obtuvo un fragmento de tallo de aproximadamente 5 cm a partir del sitio de inoculación con el micelio; en raíces inoculadas con zoosporas el procedimiento fue similar, pero se seleccionaron puntas de la raíz con necrosis. El fragmento de 5 cm a su vez fue fraccionado en secciones de 0.5 cm, obteniendo 10 fragmentos de cada planta (Fig. 2). Las secciones de tejido se lavaron tres veces durante 1 min con agua destilada estéril y se colocaron en cajas Petri (60x15 mm). Durante 15 días, cada 24 h se realizaron observaciones para registrar en qué segmentos tanto de tallo como de raíz había colonización por el oomiceto. La identidad de *P. capsici* en cada segmento se confirmó por el micelio cenocítico, la presencia de esporangios y zoosporas.

Infección por *N. aberrans*

Treinta días posteriores a la inoculación con el micelio del oomiceto, se cuantificó el número de agallas por planta en tres plantas de los tratamientos infectados con *N. aberrans*.

Análisis estadístico

Los datos de las variables necrosis y severidad se sometieron a un análisis de varianza y cuando éste indicó diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos, se realizó la comparación de medias de tratamiento mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) usando el paquete SAS versión 9.2 para Windows (SAS Institute, 2008).

RESULTADOS

Respuesta de las plantas resistentes y susceptibles a la infección con *P. capsici*

La respuesta de hipersensibilidad (RH) se observó en las plantas de chile CM-334 resistentes al oomiceto e inoculadas con micelio, independientemente de que éstas hubieran sido o no sometidas a decapitación. En las plantas resistentes decapitadas la RH fue visible 24 h pio y en las no decapitadas después de los 15 días de haber sido inoculadas, tanto en las plantas infectadas como en las no infectadas con *N. aberrans* (Fig. 3).

Por otro lado, las plantas susceptibles no decapitadas e inoculadas con micelio (S+Om), inicialmente mostraron flacidez y manchas acuosas en las hojas superiores cercanas al sitio de inoculación, la lesión necrótica avanzó hasta las hojas inferiores causando tizones en las hojas y tallos (Fig. 4d) y finalmente las plantas murieron a los 25 días pio.

En las plantas susceptibles inoculadas en la raíz con zoosporas (S+Or), la marchitez se presentó en toda la planta, hubo necrosis y crecimiento del micelio en la base del tallo y las plantas también murieron a los 25 día pio (Fig. 4e).

Necrosis causada por el micelio de *P. capsici* en plantas de CM-334 completas y decapitadas

La lesión necrótica, fue mayor en las plantas decapitadas en comparación con las no decapitadas. A los 30 días pio la lesión necrótica fue mayor 30% en las plantas decapitadas e inoculadas con el nematodo y micelio (R+Na+Omd) en comparación con las plantas decapitadas inoculadas con micelio en ausencia del nematodo (R+Omd) (Fig. 3). En contraste, en las plantas de chile CM-334 no inoculadas con el nematodo pero si con micelio

de *P. capsici* (R+Omd), la lesión incrementó su longitud a los 5 días pio y avanzó hasta 2 cm a partir del sitio de inoculación, sólo que la necrosis fue detenida y ya no infectó más tejidos por abajo del sitio de inoculación en el tallo (Fig. 3).

En el tallo de las plantas resistentes no decapitadas (R+Na+Om, R+Om), como se mencionó anteriormente, la RH fue visible macroscópicamente hasta después de los 15 días pi con el oomiceto en presencia o ausencia del nematodo y la lesión necrótica empezó a incrementar su longitud a partir de los 20 días pio, pero el avance de la lesión se detuvo y fue menor a 1 cm (Fig. 3). En contraste, en las plantas susceptibles no decapitadas e inoculadas con el micelio en el tallo (S+Om) desde el primer día pio se observó la necrosis y marchitamiento, a los 5 días pio los síntomas fueron más severos, la lesión necrótica descendió a lo largo del tallo e invadió las hojas superiores e inferiores y fue mayor en comparación con la desarrollada en las plantas resistentes inoculadas con micelio en el tallo e infectadas o no con el nematodo (R+Na+Omd, R+Na+Om, R+Omd, R+Om; Fig. 3).

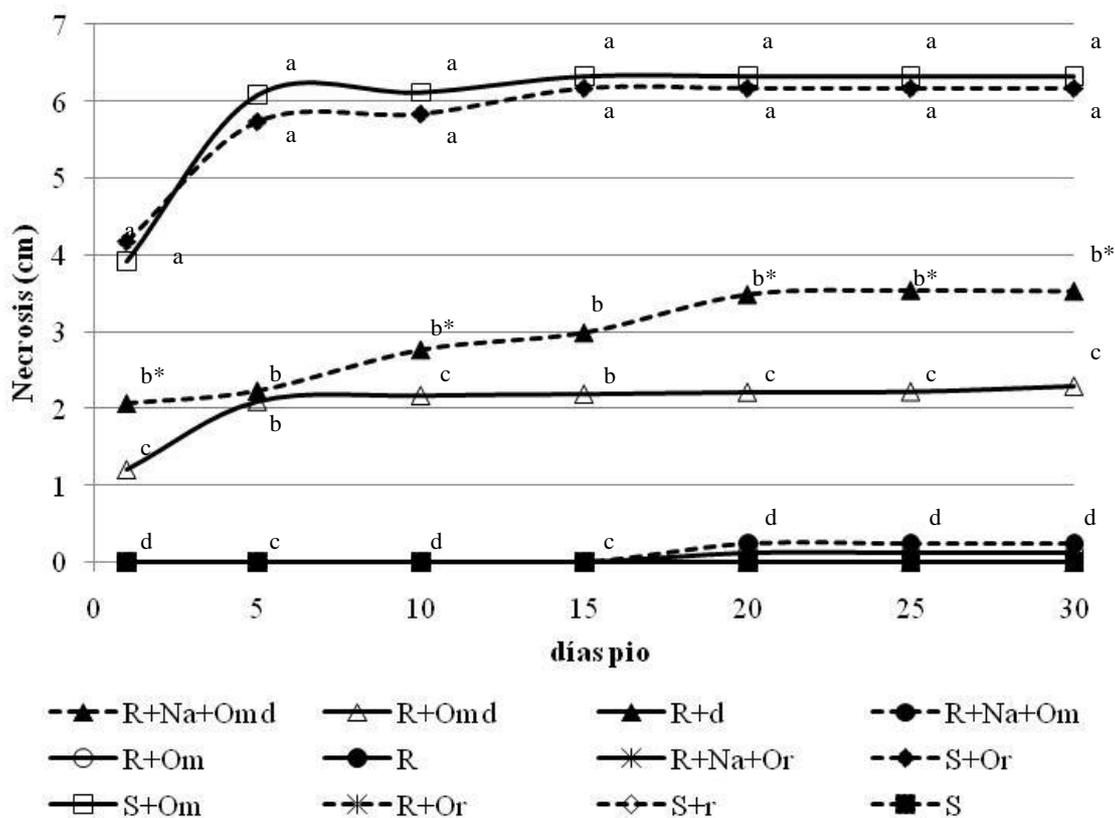


Fig. 3. Necrosis en cm de plantas completas o decapitadas e infectadas con micelio o zoosporas en la raíz en presencia y ausencia de *N. aberrans*. R+Na+Omd: Chile R decapitado e inoculado con el nematodo y micelio del oomiceto sobre el área decapitada. R+Omd: Chile resistente (R) decapitado e inoculado sólo con micelio sobre el área decapitada. R+Na+Om: Chile R completo e inoculado con el nematodo y micelio del oomiceto. R+Om: Chile R completo, inoculado con micelio del oomiceto. R+d: Chile R decapitado sin micelio y sin nematodo. R: Chile R completo, sin nematodo y sin micelio. R+Na+Or: Chile R completo e inoculado con el nematodo y zoosporas del oomiceto en la raíz. S+Om: Chile susceptible (S) completo e inoculado con micelio del oomiceto. S+Or: Chile S completo e inoculado con zoosporas del oomiceto en la raíz. S+r: Chile S con aplicación de agua destilada estéril en la raíz. S: Chile S completo no inoculado. R=Chile CM-334, S=Chile var J. E. Parker. *Indica diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos R+Na+Omd y R+Omd y **R+Na+Om y R+Om a ese tiempo posterior a la inoculación.



Fig. 4. Síntomas desarrollados en plantas de Chile resistente (R) y susceptible (S), decapitadas (d) o completas e inoculadas con micelio de *P. capsici* (Om) en presencia o ausencia de *N. aberrans* (Na) a los 20 días posteriores a la inoculación con el oomiceto (pio). a) Chile resistente (R) decapitado e inoculado con el nematodo y micelio del oomiceto sobre el área decapitada (R+Na+Omd), nótese la magnitud del área necrosada (flechas blancas). b) Chile R decapitado e inoculado sólo con micelio sobre el área decapitada (R+Omd), nótese el tamaño reducido del área necrosada (flecha blanca). c) Chile R completo e inoculado con el nematodo y micelio del oomiceto (R+Na+Om), nótese el tamaño reducido del área necrosada (flecha blanca). d) Chile susceptible (S) completo e inoculado con el nematodo y micelio del oomiceto (S+Om), nótese la magnitud del área necrosada en el tallo (flechas blancas) y el tizón foliar. e) Chile S completo inoculado con zoosporas del oomiceto en la raíz (S+Or), nótese la severa marchitez mostrada por la planta. f) Chile R completo e inoculado con el nematodo y zoosporas del oomiceto en la raíz (R+Na+Or), nótese las agallas en la raíz (flechas amarillas) y el avance de la necrosis en el tallo (flechas blancas) a partir del cuello de la planta a los 45 días pio con el oomiceto. R= Chile CM-334, S= variedad J. E. Parker.

Severidad causada por P. capsici en plantas de CM-334 completas y decapitadas

En plantas resistentes decapitadas e inoculadas con el nematodo y micelio (R+Na+Omd), la severidad incrementó a partir de los 15 días pio en comparación con las plantas decapitadas inoculadas con micelio pero sin nematodo (R+Omd), y en plantas resistentes infectadas con ambos patógenos (R+Na+Omd) la severidad fue significativamente mayor en un 58.9% con respecto a las plantas inoculadas sólo con el micelio (R+Omd). En algunas plantas R+Na+Omd hubo abscisión del ápice del tallo en presencia o ausencia de *N. aberrans* a los 15 días pio y a los 30 días posteriores a la inoculación, la lesión necrótica fue mayor en un 96.3% y presentaron un incremento en la severidad del 95.5% con respecto a las plantas resistentes no decapitadas inoculadas solo con el oomiceto (R+Om) (Fig. 5). En contraste, en las plantas resistentes no decapitadas e inoculadas con micelio (tratamientos R+Na+Om, R+Om) el oomiceto no logró establecerse aún en presencia de *N. aberrans* (Cuadro 1).

La severidad en plantas susceptibles (tratamientos S+Om y S+Or) se incrementó exponencialmente, hasta que finalmente con los dos tipos de inóculo de *P. capsici* las plantas murieron (Fig. 5). En oposición a lo anterior, en las plantas CM-334 resistentes con y sin decapitación (R+Na+Omd, R+Omd, R+Na+Om, R+Om) e inoculadas con micelio no hubo muerte de plantas; sin embargo, cuando la raíz se inoculó con zoosporas en presencia del nematodo (R+Na+Or) sí murieron algunas de ellas (Fig. 4f).

En las plantas resistentes no decapitadas e inoculadas en la raíz con el nematodo y con zoosporas (R+Na+Or) la lesión necrótica se desarrolló en el cuello de la planta hasta después de los 30 días pi con el oomiceto y solamente en este tratamiento se registró una mortalidad de plantas del 11.1%, 45 días pi. En cambio en las plantas resistentes no decapitadas e inoculadas con zoosporas en la raíz pero sin el nematodo (R+Or), no se observó el desarrollo de necrosis en la base del tallo ni muerte de plantas (Fig. 3). Sin embargo, en plantas no decapitadas e infectadas con ambos patógenos (R+Na+Omd), la presencia del nematodo no se asoció con un incremento en la severidad (Fig. 5). En las plantas testigo resistentes decapitadas o no (R+d, R) no se observaron daños o necrosis en el tallo (Fig. 5).

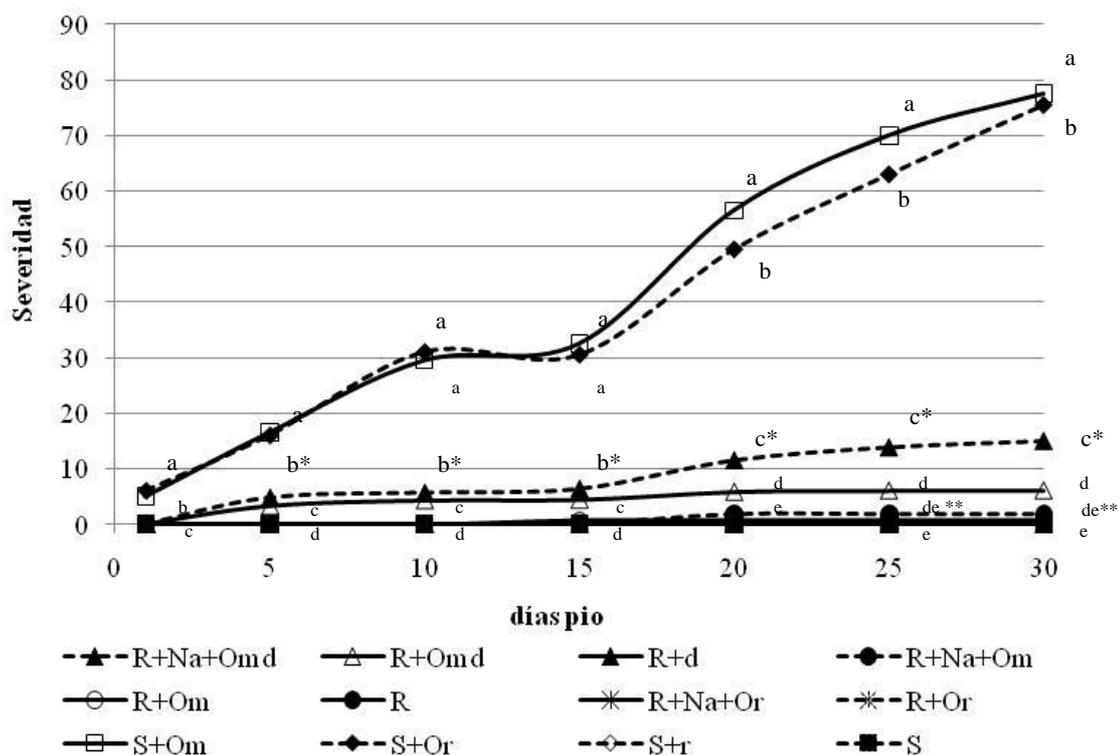


Fig. 5. Porcentaje de severidad en plantas decapitadas o completas e infectadas con micelio o zoosporas en la raíz en presencia y ausencia de *N. aberrans*. R+Na+Omd: Chile R decapitado e inoculado con el nematodo y micelio del oomiceto sobre el área decapitada. R+Omd: Chile resistente (R) decapitado e inoculado sólo con micelio sobre el área decapitada. R+Na+Om: Chile R completo e inoculado con el nematodo y micelio del oomiceto. R+Om: Chile R completo inoculado con micelio del oomiceto. R+d: Chile R decapitado sin micelio y sin nematodo. R: Chile R completo, sin nematodo y sin micelio. R+Na+Or: Chile R completo e inoculado con el nematodo y zoosporas del oomiceto en la raíz. S+Om: Chile susceptible (S) completo e inoculado con micelio del oomiceto. S+Or: Chile S completo e inoculado con zoosporas del oomiceto en la raíz. S+r: Chile S con aplicación de agua destilada estéril en la raíz. S: Chile S completo no inoculado. R=Chile CM-334, S=Chile var J. E. Parker. *Indica diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre tratamientos R+Na+Omd y R+Omd y **R+Na+Om y R+Om a ese tiempo posterior a la inoculación.

Colonización del micelio de P. capsici en plantas del CM-334 completas o decapitadas

La colonización por *P. capsici* en el tallo sólo avanzó en aquellos tratamientos donde las plantas fueron decapitadas, tratamientos R+Na+Omd y R+Omd, pero en este último el avance fue limitado, el oomiceto sólo llegó hasta los 2 cm, mientras que en presencia del nematodo el avance del oomiceto invadió cerca de 3.5 cm y a los 30 días pio presentó un incremento del 64.2% (Cuadro 1).

De manera similar, en la raíz la colonización por *P. capsici* sólo llegó hasta 1.5 cm en ausencia de *N. aberrans* (R+Or), en contraste en presencia del nematodo (R+Na+Or) la colonización del oomiceto avanzó hasta los 5 cm y se presentó un incremento del 78.2% (Cuadro 1). También se observó de manera consistente que los porcentajes de segmentos de tallo y de raíz colonizados por el oomiceto siempre fueron más altos en las plantas previamente inoculadas con el nematodo (Cuadro 1). En plantas resistentes decapitadas e infectadas con ambos patógenos (R+Na+Omd), el oomiceto fue detectado en los tallos a los 25 y a los 50 días pio; pero en plantas resistentes inoculadas sólo con el oomiceto (R+Omd) a los 50 días pio el oomiceto ya no fue aislado.

Infección por N. aberrans

En las raíces de plantas inoculadas con *N. aberrans* hubo un número reducido de agallas, de 5 a 10 agallas por planta a los 50 días después de la inoculación con el nematodo.

Cuadro 1. Colonización de *P. capsici* en segmentos de tallo¹ y de raíz a los 25 días después de la inoculación con micelio en tallos y zoosporas en raíces de plantas de Chile CM-334 en presencia o ausencia de *N. aberrans*.

Tratamiento ^x	Órgano de la planta	% Secciones con esporangios ^w y micelio de <i>P. capsici</i> ^z									
		Distancia en cm ^v									
		0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
R+Na+Omd	Tallo	100 ^w (E, M) +	100 (E, M) ++	100 (E, M) ++	100 (E, M) ++	88.7 (E, M) +	63.1 (M)	56.8 (M)	11.3 (M)	10.9 (M)	1.3 (M)
R+Na+Om	Tallo	^y ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R+Omd	Tallo	85.7 (M)	74.2 (E, M) +	53.8 (E, M) +	35.2 (E, M) +	10.1 (M)	2.7 (M)	ND	ND	ND	ND
R+Om	Tallo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
R+Na+Or	Raíz	100 (E, M) ++	100 (E, M) ++	100 (E, M) ++	100 (E, M) ++	100 (E, M) +	100 (E, M) +	100 (E, M) +	35.9 (E, M) +	10.3 (M)	1.8 (M)
R+Or	Raíz	76.5 (E, M) +	63.1 (E, M) +	23.2 (E, M) +	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^vSegmentos de 0.5 cm de tallo o raíz tomados a partir del sitio de inoculación o de la punta de la raíz, respectivamente de acuerdo con la Fig. 1.

^w(+)=Presencia de micelio y esporangios de *P. capsici* (<10 esporangios/cm²).

(++)=Abundante presencia de micelio y esporangios de *P. capsici* (>10 esporangios/cm²).

E=Esporangios, M=Micelio de *P. capsici*.

^xR+Na+Omd: Chile resistente (R) decapitado e inoculado con el nematodo y micelio del oomiceto sobre el área decapitada. R+Omd: Chile R decapitado e inoculado sólo con micelio sobre el área decapitada. R+Na+Om: Chile R no decapitado e inoculado con el nematodo y micelio del oomiceto. R+Om: Chile R inoculado con micelio del oomiceto. R+Na+Or: Chile R no decapitado e inoculado con el nematodo y zoosporas en la raíz. R= genotipo CM-334.

^yND=No detectado.

^zPromedio de tres plantas por tratamiento con 10 segmentos cada una.

DISCUSIÓN

Los síntomas en plantas resistentes no decapitadas e inoculadas con micelio de *P. capsici* fueron similares a los reportados en genotipos de chile resistentes, incluyendo al CM-334, en los que la lesión necrótica no avanzó más allá de 1 cm por abajo del sitio de inoculación (Sanzón-Gómez, 2010; Bonnet *et al.*, 2007; Candela *et al.*, 2004; Allagui y Lepoivre, 1996; Egea *et al.*, 1996; Candela *et al.*, 1995). Sólo en las plantas decapitadas con y sin nematodo la lesión necrótica provocó la caída del ápice en algunas plantas a los 15 días pio (R+Na+Omd, R+Omd); por su parte Sanzón-Gómez (2010) menciona que en plantas CM-334 más jóvenes la abscisión del ápice ocurrió a los 5 días posteriores a la inoculación con el micelio de *P. capsici*, debido posiblemente a la severa necrosis que se desarrolló en el sitio de inoculación. La abscisión del ápice no ocurrió en las plantas susceptibles a pesar de que la necrosis se incrementó en forma exponencial, en cambio en algunas de las plantas resistentes decapitadas, tanto en presencia como en ausencia de *N. aberrans*, hubo abscisión del ápice, posiblemente como una respuesta de defensa para limitar el avance del oomiceto.

Los resultados obtenidos evidenciaron que las plantas de CM-334 no decapitadas, fueron resistentes a la inoculación con micelio de *P. capsici*, ya que el oomiceto no consiguió establecerse como lo indica el hecho de que no se logró aislar de los segmentos de tallo (Cuadro 1, Fig. 3a); en cambio en plantas resistentes decapitadas, posiblemente el daño mecánico eliminó las primeras barreras físicas de defensa como tricomas, pues Egea-Gilabert *et al.* (2008) reportan que la resistencia (medida en longitud de necrosis) de CM-334 al oomiceto, estuvo relacionada con la presencia de tricomas en las hojas y tallos. La susceptibilidad mostrada por CM-334 fue aún mayor cuando las plantas decapitadas fueron previamente infectadas por el nematodo (R+Na+Omd).

Aparentemente el nematodo no influyó en la rapidez con la que las plantas decapitadas e inoculadas con micelio mostraron la RH (24 h pio); este resultado contrasta con lo reportado por Villar-Luna *et al.* (2009), quienes observaron que en plantas previamente infectadas con *N. aberrans* la respuesta de hipersensibilidad se retrasó cuando las hojas de CM-334 se inocularon con zoosporas. Sin embargo, en el presente estudio el fuerte daño mecánico infligido al decapitar la planta y el tipo de inóculo utilizado (micelio en lugar de zoosporas)

pudo haber enmascarado las posibles diferencias, por lo que el daño mecánico infligido al decapitar quizás favoreció una reacción mucho más extensiva en la planta.

Fue evidente que las plantas no decapitadas, inoculadas con el nematodo o sin inocular (R+Na+Om y R+Om), así como aquellas decapitadas no infectadas por el nematodo (R+Omd) mantuvieron su resistencia; mientras que, las que sufrieron daño mecánico y fueron infectadas por *N. aberrans* (R+Na+Omd) el oomiceto logró establecerse a lo largo del tallo, así las plantas CM-334 mostraron cierto grado de susceptibilidad. Una tendencia similar se presentó en las plantas no decapitadas inoculadas con zoosporas en la raíz (R+Or y R+Na+Or), donde la susceptibilidad solamente se manifestó en presencia del nematodo (R+Na+Or), pudiéndose recuperar al oomiceto a partir de todos los segmentos de raíz y en donde ocurrió la muerte de algunas plantas. Aunque la inoculación con micelio en los tallos de CM-334 decapitados eliminó la primera barrera de defensa, que son los tricomas (Egea-Gilbert *et al.*, 2008), las respuestas bioquímicas propias de este material probablemente fueron inducidas (Fernández-Pavia, 1997; Molot *et al.*, 1994). La respuesta de las plantas CM-334 a la inoculación de tallos decapitados con micelio no evitó su colonización por el oomiceto pero permitió la sobrevivencia de las plantas aún en presencia de *N. aberrans*. Con anterioridad, Villar-Luna *et al.*, (2009) reportaron que con la inoculación de zoosporas en el follaje, se redujo el contenido de la fitoalexina capsidiol en CM-334 inoculado con *N. aberrans* y aunque hubo un retraso en la respuesta de hipersensibilidad, esto no fue suficiente para permitir el establecimiento del oomiceto en el follaje. Era de esperarse que el abatimiento de los mecanismos de defensa inducido por el nematodo sea mayor en la raíz, en donde está ocurriendo el contacto físico entre el fitonemátodo y la planta, y consecuentemente las condiciones sean favorables para que *P. capsici* se pueda establecer en la raíz (Vargas *et al.*, 1996, Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). De ahí que únicamente se observara la muerte de plantas resistentes, cuando las plantas infectadas por el nematodo fueron inoculadas con zoosporas en la raíz (R+Na+Or). La presencia solamente de 5 a 10 agallas por planta indica que el nivel de infección por el nematodo fue incipiente (Manzanilla-López *et al.*, 2002) y esa pudiera ser la razón por la cual no se dieron los cambios con la suficiente magnitud, para que se expresara con intensidad el rompimiento de resistencia en las plantas inoculadas con zoosporas en las raíces. La diferencia entre el grado de susceptibilidad a *P. capsici* mostrado por CM-334 al realizar la inoculación en el tallo o en la raíz, también podría deberse a la acumulación de metabolitos en los sitios especializados de alimentación, como los esteroides

indispensables para el desarrollo tanto del nematodo (Cramer *et al.*, 1993) como del oomiceto (Ribiero, 1983), las cuáles favorecerían el desarrollo de *P. capsici* en la raíz.

La respuesta de hipersensibilidad en el chile CM-334 ha sido inducida al inocular tanto zoosporas como micelio de *P. capsici* (Villar-Luna *et al.*, 2009; Ueeda *et al.*, 2006; Fernández-Pavia, 1997). La defensa en el chile CM-334 contra *P. capsici* involucra una rápida síntesis de compuestos con propiedades antimicrobianas como son los compuestos fenólicos (Fernández-Pavia, 1997) y el capsidiol (Molot *et al.*, 1981), un incremento en los transcritos de la fenilalanina amonio liasa (PAL) enzima clave en la síntesis de compuestos de defensa, aumento en la actividad de peroxidasas (Fernández-Pavia, 1997), así como modificaciones celulares y la acumulación de polifenoles (Sanzón-Gómez, 2010). Tales mecanismos de defensa parecen no ser eficaces para impedir el establecimiento del oomiceto, cuando las plantas CM-334 son previamente infectadas por *N. aberrans*, ya que en presencia de este nematodo las plantas han mostrado susceptibilidad a *P. capsici* (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 1996). La infección por *N. aberrans* en CM-334 se ha asociado con la disminución en las actividades de las enzimas PAL (López-Martínez *et al.*, 2011; Godínez-Vidal *et al.*, 2008) y peroxidasas, un menor contenido de fenoles solubles totales, y en particular del ácido clorogénico (López-Martínez *et al.*, 2011), y de la fitoalexina capsidiol en las raíces (Godínez-Vidal *et al.*, 2010) y en las hojas del CM-334 (Villar-Luna *et al.*, 2009). De manera similar a como ocurre con otros nematodos endoparásitos sedentarios (Hermsmeier *et al.*, 2000; Goddijn *et al.*, 1993), *N. aberrans* también lleva a cabo una reprogramación de la expresión génica de las células hospedantes para inducir la formación del sitio especializado de alimentación; por ejemplo Godínez-Vidal *et al.* (2010) encontraron modificaciones en la acumulación de transcritos de las isoformas del gen *hmg*, responsable de codificar para la enzima HMGC_oA-R clave en la ruta de síntesis de compuestos terpenoides, como los esteroides y el capsidiol. La expresión del gen *hmg1*, asociado con la síntesis de fitoesteroides, se incrementó mientras que disminuyó la de *hmg2*, relacionado con la síntesis de la fitoalexina capsidiol. Dado que los fitoesteroides son fundamentales para el desarrollo del nematodo (Cramer *et al.*, 1993) y de *P. capsici* (Ribiero, 1983), se ha propuesto que estos cambios podrían favorecer no solo al nematodo sino también volver a la raíz de CM-334 un substrato apropiado para el establecimiento del oomiceto (Zavaleta-Mejía, 2002). Los resultados obtenidos hasta ahora por nuestro grupo de trabajo indican que *N. aberrans* abate algunos mecanismos de defensa de la planta, como son la actividad de las enzimas PAL

(López-Martínez *et al.*, 2011; Godínez-Vidal *et al.*, 2008) y peroxidasas (López-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Herrera, 2011), la acumulación de los transcritos de los genes *EAS*, *PR-1*, *POX* y *GLU* (Fernández-Herrera, 2011), y la acumulación de fenoles (López-Martínez *et al.*, 2011).

Todo esto puede ayudar a explicar el hecho de que en las plantas decapitadas e inoculadas con ambos patógenos, el oomiceto se haya establecido y avanzado a lo largo del tallo, indicando que la respuesta inicial de hipersensibilidad no fue lo suficientemente eficaz para impedir el establecimiento del oomiceto.

Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que *P. capsici* logró establecerse solamente en las plantas de CM-334 decapitadas e inoculadas previamente con *N. aberrans*, y que la presencia del nematodo aparentemente no afectó la resistencia foliar de CM-334 cuando las plantas no fueron decapitadas.

LITERATURA CITADA

- Allagui, B. M., and Lepoivre, P. 1996. Comparaison de différentes techniques d'inoculation du piment par *Phytophthora nicotianae* var *parasitica*. *Agronomy for Sustainable Development* 16:433-440.
- Arreola-Cortés, A., Soriano-Bello, L. E., Lozoya-Gloria, E., Barriga-Guzmán, A., and García-Pineda, E. 2007. The effect of acetylation of capsidiol phytoalexin on fungitoxic activity. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 40:69-73.
- Bonnet, J., Danan, S., Boudet, C., Barchi, L., Sage-Palloiz A. M., Caromel, B., Palloix, A., and Lefebvre, V. 2007. Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *TAG Theoretical and Applied Genetics* 115:253-264.
- Burpee, L. L., and Bloom, J. R. 1978. The influence of *Pratylenchus penetrans* on the incidence and severity of Verticillium wilt of potato. *Journal of Nematology* 10:95-99.
- Bezemer, M. T., and van Dam, N. M. 2005. Linking aboveground and belowground interactions via induced plant defenses. *Trends in Ecology and Evolution* 20:617-624.
- Caillaud, M. C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., de Almeida-Engler, J., Abad, P., Rosso, M. N., and Favery, B. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* 165:104-113.

- Candela, M. E., Requena, E. M., and Egea-Gilabert, C. 2004. Análisis de rasgos cuantitativos de líneas de Pimiento (*Capsicum annuum* L.), mejoradas en relación con la resistencia a *Phytophthora capsici*. Actas de Horticultura Número 41. II Congreso de Mejora Genética de Plantas. 141-144 p.
- Candela, M. E., Egea, C., García-Pérez, D. M., Costa, J., and Candela, M. 2000. Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. Acta Horticulturae 522:79-86.
- Candela, M. E., Alcazar, M. D., Espin, A., Egea, C., and Almela, L. 1995. Soluble phenolics in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. Plant Pathology 44:116-123.
- Cramer, C., Weissenborn, D., Cottingham, C., Denbow, C., Elsenback, J., Radin, D., and Xu, X. 1993. Regulation of defense-related gene expression during plant-pathogen interactions. Journal of Nematology 25:507-518.
- Davis, L. E., and Mitchum, G. M. 2005. Nematodes Sophisticated Parasites of Legumes. Plant Physiology 137:1182–1188.
- De Vay, J. E., Gutierrez, A. P., Pullman, G. S., Wakeman, R. J., Garber, R. H., Jeffers, D. P., N. Smith, N. S., Goodell, P. B., and Roberts, A. P. 1997. Inoculum densities of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* and *Meloidogyne incognita* in relation to the development of *Fusarium* wilt and the phenology of cotton plants (*Gossypium hirsutum*). Phytopathology 87:341–346.
- Doyle, E. A., and Lambert, K. N. 2003. *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. Molecular Plant-Microbe Interactions 16:123–131.
- Egea-Gilabert, C., Bilotti, G., Requena, M. E., Ezziyyani, M., Vivo-Molina, J. M., and Candela, M. E. 2008. Pepper morphological traits related with resistance to *Phytophthora capsici*. Biologia Plantarum 52:105-109.
- Egea, C., Alcazar, M. D., and Candela, M. E. 1996. Capsidiol: its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. Physiologia Plantarum 98:737-742.
- Fernández-Herrera, E. 2011. Genes de defensa, actividad enzimática y contenido de capsidiol en chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* e infectado por *Nacobbus aberrans*. Tesis de Doctorado. Instituto de Fitosanidad. Fitopatología. Colegio de Postgraduados. 73 p.
- Fernandez-Pavia, S. P. 1997. Host-pathogen interaction in the root rot resistant *Phytophthora capsici*/*Capsicum annuum* CM-334 pathosystem. Ph. D. Thesis. New México State University, Las Cruces, New Mexico, USA. 109 p.

- Fernández-Pavia, S., and Liddell, C. 1997. Resistance of *Capsicum annuum* CM-334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. *Phytopathology* 87:529.
- Glosier, R. B., Ogundiwin, A. E., Sidhu, S. G., Sischo, R. D., and Prince, P. J. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica* 162:23-30.
- Godijn, M., Lindsey, K., Van der Lee, F., Klap, J., and Sijmons, P. 1993. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harboring promoter-gusA fusion constructs. *The Plant Journal* 4:863-873.
- Godínez-Vidal, D. 2010. Cambios en la ruta mevalónica como respuesta a la infección por *Nacobbus aberrans* en chile CM-334. Tesis de doctorado. Instituto de Fitosanidad. Fitopatología. Colegio de Postgraduados. 104 p.
- Godínez-Vidal, D., Soto-Hernández, M., Rocha-Sosa, M., Lozoya-Gloria, E., Rojas-Martínez, R. I., Guevara Olvera, L., y Zavaleta-Mejía, E. 2010. Contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por *Nacobbus aberrans* y su efecto en juveniles del segundo estadio. *Nematropica* 40:227-237.
- Godínez-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 chilli CM-334 5 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology* 120:299-303.
- Gray, F. A., Griffin, G. D., Johnson, D. A., Eckert, L. W., and Kazimir, J. E. 1990. Interrelationships between *Meloidogyne hapla* and *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* in seedling damping-off and root infection of alfalfa. *Phytopathology* 80:228-232.
- Guigón-López, C., y González-González, A. P. 2001. Estudio regional de las enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el sur de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19:49-56.
- Hermesmeier, D., Hart, J., Byzova, M., Rodermel, S., and Baum, T. 2000. Changes in mRNA abundance within *Heterodera schachtii*-infected roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:309-315.
- Hussey, R. S., and Grundler, M. F. 1998. Nematode parasitism of plants. *In*: R. N., Perry, J. Wright, eds, *Physiology and Biochemistry of Free-Living and Plant Parasitic Nematodes*. CAB International Press, Oxford, 213–243 p.

- Hussey, R. S. 1989. Disease-inducing secretions of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 27:123–14.
- Long, H., Wang, X., and Xu, J. 2006. Molecular cloning and life-stage expression pattern of a new chorismate mutase gene from the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria*. *Plant Pathology* 55:559-563.
- López-Martínez, N., Colinas-León, M. T., Peña-Valdivia, C. B., Salinas-Moreno, Y., Fuentes-Montiel, P., Biesaga, M., and Zavaleta-Mejía, E. 2011. 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 and Soil* 338:399-409.
- López-Martínez, N. 2007. Actividad enzimática y fenoles solubles en Chile (*Capsicum annuum* L.) CM334 durante la pérdida de resistencia a *Phytophthora capsici* inducida por *Nacobbus aberrans*. Tesis de Maestría. Recursos Genéticos y Productividad. Fisiología Vegetal. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. Mex. 68 p.
- Manzanilla-López, R. H., Costilla, A. M., Doucet, M., Franco, J., Inserra, N. R., Lehman, S. P., Cid del Prado-Vera, I., Souza, M. R., and Evans, K. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda:Pratylenchidae): Systematics, Distribution, Biology and Management. *Nematropica* 32:149-227.
- Molot, P. M., Mas, P., Conus, M., and Ferriere, H. 1981. Relations between capsidiol concentration, speed of fungal invasion, and level of induced resistance in cultivars of pepper (*Capsicum annuum*) susceptible or resistant to *Phytophthora capsici*. *Physiological Plant Pathology* 18:379-389.
- Oelke, M. L., Bosland, W. P., and Steiner, P. 2003. Differentiation of races specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128:213-218.
- Palloix, A., Daubeze, A. M., and Pochard, E. 1988. Time sequences of root infection and resistance expression in an artificial inoculation method of pepper with *Phytophthora capsici*. *Journal of Phytopathology* 123:12-24.
- Ribeiro, O. K. 1983. Physiology of asexual sporulation and spore germination in *Phytophthora*, p. 55-70. In D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao (ed.), *Phytophthora*, its biology, taxonomy, ecology, and pathology. APS Press, St. Paul, Minn.
- Ristaino, J. B., and Johnston, S. A. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Disease* 83:1080-1089.

- Sanzón-Gómez, D. 2010. Comparación de los cambios estructurales en células de chile CM334 en una interacción compatible y una incompatible. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados Fitosanidad-Fitopatología. Montecillo, Edo. Mex. 51 p.
- SAS Institute, Inc. 2002-2003. Versión 9. 2. Cary, NC.
- Schulb, R. L. 1983. Epidemiology of *Phytophthora capsici* on bell pepper. The Journal of Agricultural Science 100:7-11.
- Silvar, C., Diaz, J., and Merino, F. 2005. Real-time polymerase chain reaction quantification of *Phytophthora capsici* in different pepper genotypes. Phytopathology 95:1423-1429.
- Sy, O., Bosland, W. P., 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 for Horticultural Science 130: 75-78.
- Trujillo-Viramontes, F., Zavaleta-Mejía, E., Rojas-Martínez, R. I., y Lara, R. 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. Nematropica 35:37-44.
- Tyler, B. M. 2002. Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. Annual Review of Phytopathology 40:137-167.
- Ueeda, 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.
- Vargas, E. M. T., Zavaleta-Mejía, E., and Hernández, A. M. A. 1996. Breaking of resistance to *Phytophthora capsici* Leo. in chili (*Capsicum annuum* L.) serrano CM-334 by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen. Nematropica 26:159-166.
- Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R. I., A. M. Hernández-Anguiano, M. A., O. Gómez-Rodríguez, O., y Zavaleta-Mejía, E. 2009. Respuesta hipersensitiva en el follaje de chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. Nematropica 39:143-155.
- Walker, J. S., and Bosland, P. W. 1999. Inheritance of *Phytophthora* Root Rot and Foliar Blight Resistance in Pepper. Journal of the American Society for Horticultural Science 124:14-18.
- Zavaleta-Mejía, E. 2002. Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparásitos, una hipótesis. Revista Mexicana de Fitopatología 20:118-12.

CAPITULO III

**ACTIVIDAD DE PAL, ACUMULACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES EN EL
CHILE CM-334 INFECTADO POR *Nacobbus aberrans* E INOCULADO CON
*Phytophthora capsici***

RESUMEN

La actividad de PAL, fenoles y flavonoides totales en el chile Criollo de Morelos 334 (CM-334) resistente a *Phytophthora capsici* (Pc) en presencia y ausencia del nematodo *Nacobbus aberrans* (Na) fueron evaluados. Veintiún días posteriores a la inoculación con Na las plantas fueron inoculadas con micelio en plantas decapitadas o con zoosporas de Pc asperjadas al follaje de plantas no decapitadas. A las 1, 6, 12 y 24 horas posteriores a la inoculación (hpio) con el oomiceto, se tomaron 10 plantas por tiempo. La actividad de PAL, fenoles y flavonoides fueron medidos por espectrofotometría y los datos se sometieron a análisis de varianza y prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). En plantas inoculadas con micelio y Na, la necrosis y severidad fueron mayores que en las plantas resistentes inoculadas solo con micelio; pero en plantas infectadas por el nematodo e inoculadas por aspersión de zoosporas al follaje no se observaron síntomas. En plantas infectadas por Na e inoculadas con micelio, la actividad de PAL disminuyó en 39.1%, 29.6% y 55.7% , esta reducción se observó en hojas (12 hpio), tallos (24 hpio) y raíces (12 hpio), respectivamente. En las inoculadas con Na y con zoosporas la reducción fue de 17.7%, 77.9% y 30.2%, respectivamente; en hojas y raíces la reducción ocurrió a las 12 hpio y en tallos a las 24 hpio. Similarmente, el contenido de fenoles solubles totales disminuyó a las 12 hpio en los tres estratos de las plantas inoculadas con micelio y Na, pero con Na y zoosporas la disminución se observó a las 6 y 12 hpio. El contenido de flavonoides incrementó en raíces y tallos de plantas inoculadas con micelio y Na, mientras que en las plantas inoculadas con zoosporas con el nematodo el incremento ocurrió sólo en las raíces.

Palabras clave: Chile CM-334, fenoles, flavonoides, PAL, *Nacobbus aberrans*, *Phytophthora capsici*.

ABSTRACT

PAL activity, total phenols and flavonoids were evaluated in the pepper resistant to *Phytophthora capsici* (Pc) Criollo de Morelos 334 in presence or absence of nematode *Nacobbus aberrans* (Na). Twenty days after inoculation with Na, decapitated plants were challenged with mycelium or zoospores of Pc sprayed on the foliage of non-decapitated plants. At 1, 6, 12 and 24 hours after inoculation (hpio) with Pc, 10 plants were sampled. PAL activity, phenolics and flavonoids were measured by spectrophotometry and the data were subjected to analysis of variance and Tukey test ($P \leq 0.05$). Plants infected by Na and inoculated with mycelium, necrosis and severity were higher than in resistant plants inoculated only with mycelium; but in those infected by Na and inoculated with zoospores sprayed to the foliage showed no symptoms. In plants infected by Na and inoculated with mycelium, PAL activity decreased by 39.1%, 29.6% and 55.7% in leaves, stems and roots, respectively; this decreased was observed in leaves and roots at 12 hpio and in stems at 24 hpio. And in those inoculated with Na and zoospores the reductions were of 17.7%, 77.9% and 30.2%, respectively, the reduction occurred in leaves and roots at 12 hpio and in stems at 24 hpio. Similarly, total soluble phenols decreased at 12 hpio in the three strata of plants inoculated with mycelium and Na, but with Na and zoospores the decreases were observed at 6 and 12 hpio. The flavonoid content increased in roots and stems of plants inoculated with mycelium and Na, whereas in plants inoculated with zoospores and the nematode, the increase occurred only in the roots.

Key words: pepper CM-334, phenols, flavonoids, PAL, *Nacobbus aberrans*, *Phytophthora capsici*.

INTRODUCCIÓN

La línea de chile (*Capsicum annuum* L.) tipo serrano conocida como Criollo de Morelos (CM-334) se ha considerado como el resistente universal a *Phytophthora capsici* Leonian (Glosier *et al.*, 2008; Oelke *et al.*, 2003). Según algunos investigadores consideran la resistencia de CM-334 a *P. capsici* de tipo poligénica y parcial, y los componentes de la resistencia se localizan principalmente en cuatro cromosomas (Bonnet *et al.*, 2007; Ogundiwin *et al.*, 2005; Lefebvre y Palloix, 1996). La resistencia del chile CM-334 a *P. capsici* se manifiesta en toda la planta (Sy *et al.*, 2005). En tallos y hojas la infección por *P. capsici* es limitada por la presencia de tricomas en los tallos (Egea-Gilabert *et al.*, 2008), además la respuesta de hipersensibilidad, misma que se ha asociado con incrementos en los niveles de ácido salicílico y ácido jasmónico (Ueeda *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la resistencia del chile CM-334 al oomiceto no es influenciada por la concentración de inóculo, la etapa de crecimiento del cultivo, ni la temperatura (Palloix *et al.*, 1988), pero si por el método de inoculación (Bonnet *et al.*, 2007; Ueeda *et al.*, 2006; Candela *et al.*, 2004; Candela *et al.*, 2000). La sintomatología y el tiempo de aparición de la misma en CM-334, fue diferente dependiendo del tipo de inoculación realizada; en la inoculación con micelio la necrosis fue visible entre los 6 y 9 días posteriores a la inoculación en plantas decapitadas (Bonnet *et al.*, 2007; Candela *et al.*, 2000) y en plantas inoculadas con zoosporas, los síntomas se observaron hasta los 15 y 35 días (Candela *et al.*, 2004). En contraste, Ueeda *et al.* (2006) reportan que en las hojas inoculadas por aspersion de zoosporas (10^5 zoosporas mL⁻¹) no se desarrolló ningún síntoma visible, aunque a nivel microscópico fue evidente la muerte celular hipersensitiva.

La respuesta de hipersensibilidad se ha asociado con los incrementos en la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, EC. 4.3.1.5) y en algunas interacciones planta-patógeno, PAL determina si la interacción terminará siendo de tipo compatible o incompatible (Hahlbrock y Scheel, 1989; Ride, 1985). La enzima PAL, clave en la ruta de los fenilpropanoides, es de gran importancia ya que a través de ella se sintetizan una variedad de compuestos como ligninias, salicilatos, coumarinas, amidas hidroxicinamicas, flavonoides, fenoles, pigmentos, protectores de luz UV y antioxidantes; algunos de ellos con funciones de defensa contra patógenos (Dixon y Paiva, 1995). PAL es una enzima tetramérica con una estructura compleja y su actividad catalítica corresponde a la expresión de una familia de genes (Hahlbrock y Scheel, 1989). La inducción de los genes *PAL* depende de la planta y del estímulo, se ha reportado que los genes *PAL* son activados trascripcionalmente después de la

inoculación o de la infiltración de elicitores provenientes de microbios (Edwards *et al.*, 1985; Lawton *et al.*, 1983). En tabaco (*Nicotina tabacum* L.) y en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) se han identificado dos familias en cada especie y en cada familia dos isoformas del gen *PAL* cuyas diferencias se basan en algunos nucleótidos (Nagai *et al.*, 1994; Pelligrini *et al.*, 1994; Cramer *et al.*, 1989). En *Arabidopsis thaliana* se reportan cuatro isoformas que se expresan en diferentes condiciones y partes de la planta, las isoformas *Atpal* 1, 2 y 4 se presentaron en tallos mientras que *Atpal3* se encontró en todos los tejidos de la planta pero más en hojas, y durante el desarrollo se observó un incremento de transcritos de las isoformas *Atpal* 1 y 2 (Cochrane *et al.*, 2004). En plantas transgénicas de tabaco, *Arabidopsis* y en papa (*Solanum tuberosum* L.), se indujo la acumulación de la isoforma *PAL3* en hojas infectadas con *Erwinia carotovora* (Shufflebottom *et al.*, 1993). En la interacción entre *Verticillium albo-atrum* y jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) se expresaron cinco isoformas de *PAL*, mientras que en el tratamiento control solo se expresó una isoforma de la enzima (Bernards y Ellis, 1991). En *Arabidopsis thaliana* el promotor del gen *PAL1* fue inducido durante la interacción incompatible con *Peronospora parasitica* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Rookes y Cahill, 2003). También en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en la interacción incompatible con *Colletotrichum lindemuthianum* se observó una acumulación temprana de transcritos de *PAL* y de chalcona sintasa (*CHS*) localizadas en el sitio de infección a las 50 hpio, en contraste, en la interacción compatible la acumulación de estos transcritos ocurrió hasta las 150 hpio (Bell *et al.*, 1986). En las raíces del chile CM-334 la inducción de los transcritos que codifican para la enzima *PAL* se han relacionado con la muerte celular hipersensitiva resultado de la infección por zoosporas de *P. capsici* (Fernández-Pavia y Lidell, 1997). En la interacción de CM-334 con *P. capsici* se observó un incremento en la acumulación de fenoles en las raíces y un aumento en la actividad de peroxidasas acídicas (Fernández-Pavia, 1997). En el chile resistente Smith 5 inoculado en el tallo con micelio de *P. capsici* se observó un incremento en la concentración de los ácidos fenólicos, los cuáles inhibieron el crecimiento micelial del oomieto *in vitro* destacando el ácido *t*-cinámico, seguido del *p*-hidroxibenzoico, vainílico y salicílico (Candela *et al.*, 1995). Contrariamente, Lizzi *et al.*, (1995) en el chile resistente Phyto636, encontraron que la concentración del ácido clorogénico y los glucósidos de los flavonoides apigenina y luteolina disminuyeron probablemente por la actividad glucósidica atribuida al micelio de *P. capsici*. Cambios en el contenido de los compuestos fenilpropanoides también se han consignado en la interacción planta-nematodo; sin embargo, no todos los compuestos fenilpropanoides afectan negativamente al nematodo pues se tienen

reportes que los flavonoides inhiben el transporte de auxinas y la acumulación local de este regulador de crecimiento favorece el desarrollo de los sitios especializados de alimentación (células gigantes y sincitio) inducidos por el nematodo (Brown *et al.*, 2001; Hutangura *et al.*, 1999; Jacobs y Rubery, 1988). En la interacción de *Pinus strobus*-*Bursaphelenchus xylophilus* se detectó la acumulación de estilbeno (3-*O*-metildihidropinosilvin estilbenoide) y una flavona (2*S*-pinocembrina flavonona), ambos con propiedades que limitan el desarrollo del nematodo (Hanawa *et al.*, 2001). En plantas de soya ocurrió la acumulación de la fitoalexina fenilpropanoide gliceolina después de la infección por *M. incognita* (Kaplan *et al.*, 1980) y *H. glycines* (Huang y Barker, 1991), lo que limitó el establecimiento de estos nematodos en los tejidos. En *Phaseolus lunatus*, la fitoalexina coumestrol incrementó desde el primer día de la inoculación con *Pratylenchus scribneri* de 40 µg por g de raíz hasta 70 µg en el cuarto día posterior a la inoculación (Rich *et al.*, 1977). El coumestrol inhibió la movilidad de *Pratylenchus scribneri* con una DL₅₀ de 10-15 µg mL⁻¹ pero no la de *Meloidogyne javanica* (Veech, 1982; Rich *et al.*, 1977). En genotipos de *Cajanus cajan* resistentes a *Fusarium udum* se observaron disminuciones en la acumulación del isoflavonoide y la fitoalexina cajanol después de la infección por *M. incognita* y *M. javanica* (Marley y Hillocks, 1994). También en las interacciones incompatibles del chile CM-334 con *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*, se encontró que el contenido de fenoles solubles totales se incrementó, especialmente el ácido clorogénico (Pegard *et al.*, 2005). En contraste con lo anterior, en la interacción compatible del chile CM-334 con *N. aberrans*, la acumulación de fenoles solubles y del ácido clorogénico fueron reducidos (López-Martínez *et al.*, 2011). Y aún cuando el CM-334 es altamente resistente a *P. capsici*, las plantas mostraron susceptibilidad al oomiceto cuando fueron inoculadas con 2000 juveniles del segundo estadio (J2) de *N. aberrans* y 21 días después se inocularon 300,000 zoosporas mL⁻¹ a la raíz (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). Los cambios bioquímicos inducidos por *N. aberrans* en las raíces de CM-334 incluyen la disminución en la actividad de PAL (López-Martínez *et al.*, 2011; Godínez-Vidal *et al.*, 2008) y peroxidasas; así como en el contenido de fenoles solubles totales, en particular del ácido clorogénico (López-Martínez *et al.*, 2011). De igual manera, el contenido de la fitoalexina sesquiterpenica capsidiol, reportada como inhibidora del crecimiento de *P. capsici* (Villar-Luna *et al.*, 2009; Egea *et al.*, 1996), disminuyó en las raíces y en las hojas del CM-334 (Godínez-Vidal *et al.*, 2010; Villar-Luna *et al.*, 2009) infectadas por *N. aberrans*. Todos estos cambios son inducidos por el nematodo en las plantas CM-334, y podrían ser en parte

responsables de la susceptibilidad que muestran a *P. capsici* una vez que son infectadas por el nematodo.

Con base en estos antecedentes se plantea la hipótesis de que los cambios metabólicos inducidos por *N. aberrans* en las raíces de las plantas CM-334, también se manifiestan de manera sistémica. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue comparar la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL), la acumulación de fenoles solubles y flavonoides en plantas infectadas por *N. aberrans* e inoculadas en el follaje con zoosporas y en tallos con micelio de *P. capsici*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se sembraron semillas de chile CM-334 resistente a *P. capsici* y semillas de la variedad susceptible Joe E. Parker como se describe en el Capítulo II en la sección de materiales y métodos.

Preparación del inóculo de P. capsici e inoculación

Se cultivó a *P. capsici* (cepa 6143 proporcionada por la Dra. Fernández-Pavía, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo) en medio V-8. Cuando las cajas se cubrieron completamente con micelio, el medio fue fragmentado en cuatro partes y cada segmento fue transferido a cajas Petri estériles con agua destilada estéril. La liberación de las zoosporas fue inducido con la intercalación de tiempos por cuatro veces entre la temperatura de -20° C (15 min) y temperatura ambiente (20 min). Se cuantificó el número de zoosporas en la suspensión con un hematocitometro (Marienfeld®), se ajustó a 3×10^5 zoosporas mL⁻¹ y la inoculación se realizó utilizando un aspersor. Para la inoculación con micelio, se obtuvieron discos de aproximadamente de 0.5 cm de diámetro proveniente de cajas Petri con crecimiento micelial de *P. capsici* y se colocó en el tallo en plantas de CM-334 decapitadas como se describió en el Capítulo II. Tanto el micelio como las zoosporas se inocularon a los 21 días después de la inoculación con *N. aberrans* (Trujillo–Viramontes *et al.*, 2005).

Establecimiento de los experimentos

Experimento 1. Inoculación por aspersión de zoosporas

El sustrato de las macetas fue cubierto previamente con un plástico para evitar el contacto de las zoosporas con éste y con las raíces de la planta. Para favorecer la infección por las

zoosporas, las plantas se mantuvieron en cámaras de crecimiento con humedad relativa entre 40 y 60% por 24 h y riegos constantes a saturación. Se establecieron los siguientes tratamientos: 1) plantas resistentes (R) inoculadas con nematodo (Na) y zoosporas (R+Na+Za), 2) plantas resistentes inoculadas sólo con zoosporas (R+Za), 3) plantas resistentes sin Na, sin zoosporas y asperjadas con agua (R+a). Como referencia de la eficacia de la inoculación por aspersión se tuvieron plantas susceptibles asperjadas con zoosporas (S+Za) y plantas susceptibles asperjadas con agua (S+a).

Experimento 2. Inoculación con micelio en plantas decapitadas

Las plantas inoculadas con micelio fueron mantenidas en las cámaras de crecimiento bajo las condiciones anteriormente descritas en la inoculación con zoosporas. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) plantas resistentes decapitadas e inoculadas con nematodo (Na) y micelio (R+Na+Md); 2) plantas resistentes decapitadas e inoculadas sólo con micelio (R+Md); y 3) plantas resistentes decapitadas, sin nematodo y con cilindro de V8 sin micelio (R+d). Para corroborar la eficiencia de la inoculación con micelio se tuvieron plantas susceptibles decapitadas con micelio (S+Md) y plantas susceptibles decapitadas con cilindro de V8 sin micelio (S+d).

Evaluación de los experimentos

Avance de la necrosis y colonización del tejido por *P. capsici*

Las plantas de CM-334 inoculadas con *P. capsici* en presencia y ausencia de *N. aberrans* fueron evaluadas cada 5 días posteriores a la inoculación con el oomiceto (pio). Para ello, se midió la longitud de la necrosis (cm) por abajo del sitio de inoculación y se estimó la severidad con una escala de 0 (planta sana) a 5 (planta muerta) propuesta por Silvar *et al.*, (2005). Con la finalidad de determinar si el micelio había avanzado sistémicamente en los tejidos de las plantas de Chile, a los 20 días posteriores a la inoculación con micelio o zoosporas del oomiceto se muestrearon tres plantas por tratamiento con y sin *N. aberrans*. De cada planta inoculada en el tallo se obtuvo un fragmento de tallo de aproximadamente 5 cm a partir del sitio de inoculación con el micelio y de las inoculadas con zoosporas se muestrearon tres hojas de cada planta. El fragmento de 5 cm se fraccionó en secciones de 1 cm, obteniendo 5 fragmentos de cada planta los cuáles se procesaron como se describió del Capítulo II (Fig. 2). Las hojas de plantas inoculadas con zoosporas fueron disectadas en 10 fragmentos y

sembradas en medio de cultivo. La identidad de *P. capsici* se confirmó por la presencia de esporangios y zoosporas.

Toma de muestra para las determinaciones de la actividad de PAL y contenido de fenoles solubles y flavonoides

Las muestras de tejido de hojas, tallos y raíces se muestrearon a las 1, 6, 12 y 24 horas posteriores a la inoculación (hpio) con las zoosporas o micelio de *P. capsici*. Para cada tratamiento y tiempo se muestrearon 10 plantas resistentes y cada estrato se congeló y pulverizó por separado en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -80° C hasta su utilización. De cada tratamiento se realizaron tres extracciones y de cada extracción se hicieron seis lecturas.

Cuantificación de la actividad de PAL

La extracción de la enzima y la determinación de su actividad se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Reyes y Cisneros-Zevallos (2003) con algunas modificaciones. Se maceraron 250 mg de hojas, tallos o raíces con nitrógeno líquido en un mortero previamente enfriado. Al tejido molido como polvo fino se le adicionó 0.02 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), se homogenizó la muestra a baja velocidad con 2 mL de buffer de borato (50 mM, pH 8.5) que contenía 50 mM de 2-mercaptoetanol L⁻¹. Se centrifugó a 14,000 rpm a 4° C por 20 min dos veces y se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos previamente etiquetados y enfriados. La cuantificación se realizó en un espectrofotómetro Synergy 2 (BioTeK). El blanco fue el buffer de borato y se colocaron 270 µL del extracto en la placa de lectura de UV. La placa con las muestras fue calentada a 40° C por 5 min y posteriormente fue dispensada la L-fenilalanina y el agua. Cada dispensador adicionó 30 µL de agua desionizada y 30 µL de L-fenilalanina (100 mM). La absorbancia fue medida a los 5 y 60 minutos. Se calculó la actividad de la fenilalanina amonio liasa en µmol de ácido *trans*-cinámico (Sigma-Aldrich Co.) por µg de proteína por minuto. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976) a partir de la curva desarrollada con albumina de suero bovino (Sigma-Aldrich Co[®]).

Cuantificación de fenoles solubles totales

En un mortero previamente enfriado se agregaron 1.5 mL de Metanol 80% y se agregó 0.25 g de tejido vegetal se maceró hasta polvo fino y la mezcla se pasó a un tubo eppendorf de 2 mL. Se aforó a 2 mL, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min y se extrajo el sobrenadante. 60 μ L del extracto crudo se colocaron en una placa para espectro visible. Cada dispensador del espectrofotómetro Synergy 2 (BioTek) agregó 150 μ L de Folin Ciocalteu 0.25 N y 90 μ L de Carbonato de Sodio 1 M. Después de la adición de los reactivos se incubó la mezcla durante 30 min y se leyó a una absorbancia de 725 nm. Los resultados fueron expresados en μ g de ácido clorogénico g^{-1} de peso fresco con base a una curva estándar de ácido clorogénico (Sigma-Aldrich Co[®]).

Cuantificación de flavonoides totales

Del extracto preparado para la determinación de fenoles solubles totales se tomó 1 mL para la cuantificación de flavonoides. El contenido de ellos se determinó en 400 μ L del extracto de hojas y en 600 μ L del extracto de tallos y raíces. El extracto se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 200 μ L de Acetato de Potasio 1M y 200 μ L de Cloruro de Aluminio al 10%. La mezcla se dejó reposar por 30 min. La absorbancia fue medida a 337 nm para apigenina (de Rijke *et al.*, 2006), los resultados fueron expresados en μ g de apigenina g^{-1} de peso fresco con base a la curva de apigenina (Aldrich Chem Co[®]).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las diferentes variables evaluadas por fechas y por estrato por separado (hojas, tallos, raíces) se sometieron a un análisis de varianza y cuando esté indicó diferencias significativas, se realizó la comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) usando el paquete SAS versión 9.2 (SAS Institute, 2008).

Infeción por *N. aberrans*

A los 30 días posteriores a la inoculación con el oomiceto se cuantificó el número de agallas por planta de tres plantas de los tratamientos previamente infectados con el nematodo.

RESULTADOS

Experimento 1. Inoculación por aspersión de zoosporas

En las plantas resistentes inoculadas con zoosporas (R+Na+Za, R+Za) no se observaron lesiones (Fig. 6); pero las plantas susceptibles (S+Za) que fueron asperjadas con las zoosporas de *P. capsici* mostraron los síntomas típicos de marchitamiento y necrosis. En las plantas susceptibles se observaron manchas acuosas aleatorias en las hojas que se tornaron necróticas y la necrosis se extendió a lo largo de los tallos provocando el 100% de severidad a los 25 días posteriores a la inoculación con el oomiceto (pio) y el oomiceto se aisló de todos los cortes de tallos estos resultados indicaron que la inoculación fue exitosa (Fig. 7, 8a). En las hojas de las plantas resistentes, independientemente de la presencia o ausencia de *N. aberrans*, no se observaron lesiones macroscópicas en las hojas (Fig. 7) y no se logró aislar al oomiceto del tejido foliar.

Sin embargo, aunque no se presentaron los síntomas macroscópicamente, se observó una reducción significativa en la actividad de PAL en plantas infectadas con *N. aberrans* e inoculadas con zoosporas asperjadas (R+Na+Za). La reducción se observó en en las hojas, tallos y raíces (17.7%, 77.9% y 30.2%, respectivamente) a las 12 hpio en hojas y raíces y 24 hpio en los tallos, en comparación con las plantas inoculadas solo con zoosporas (R+Za) (Fig. 8a). Asimismo, en comparación con las plantas asperjadas solo con zoosporas, el contenido de fenoles solubles disminuyó, en las hojas y tallos a las 12 hpio (9.11% y 16.9%, respectivamente), y en raíces (27.4%) a las 6 hpio (Fig. 8b). El contenido de flavonoides también disminuyó (16.9%) en las hojas a las 6 hpio y en los tallos (16%) a las 12 hpio; mientras que en las raíces ocurrió un incremento del 15.2% a las 24 hpio (Fig. 8c).



Fig. 6. Síntomas desarrollados en plantas no decapitadas de chile resistente (R) y susceptible (S), inoculadas con zoosporas asperjadas de *P. capsici* (Za) en presencia o ausencia de *N. aberrans* (Na), a los 35 días después de la inoculación con el oomiceto. R+Na+Za: Chile resistente (R) inoculado con el nematodo y con zoosporas del oomiceto asperjadas al follaje, nótese la ausencia de lesiones o de la respuesta de hipersensibilidad (RH). R+Za: Chile R inoculado con zoosporas asperjadas al follaje, nótese la ausencia de lesiones o de la respuesta de hipersensibilidad. S+Za: Chile S inoculado por aspersión de zoosporas del oomiceto al follaje, nótese la severa marchitez mostrada por la planta. R+a: Chile R asperjado con agua destilada estéril. S+a: Chile S asperjado con agua destilada estéril. R= Chile CM-334. S= variedad J. E. Parker.

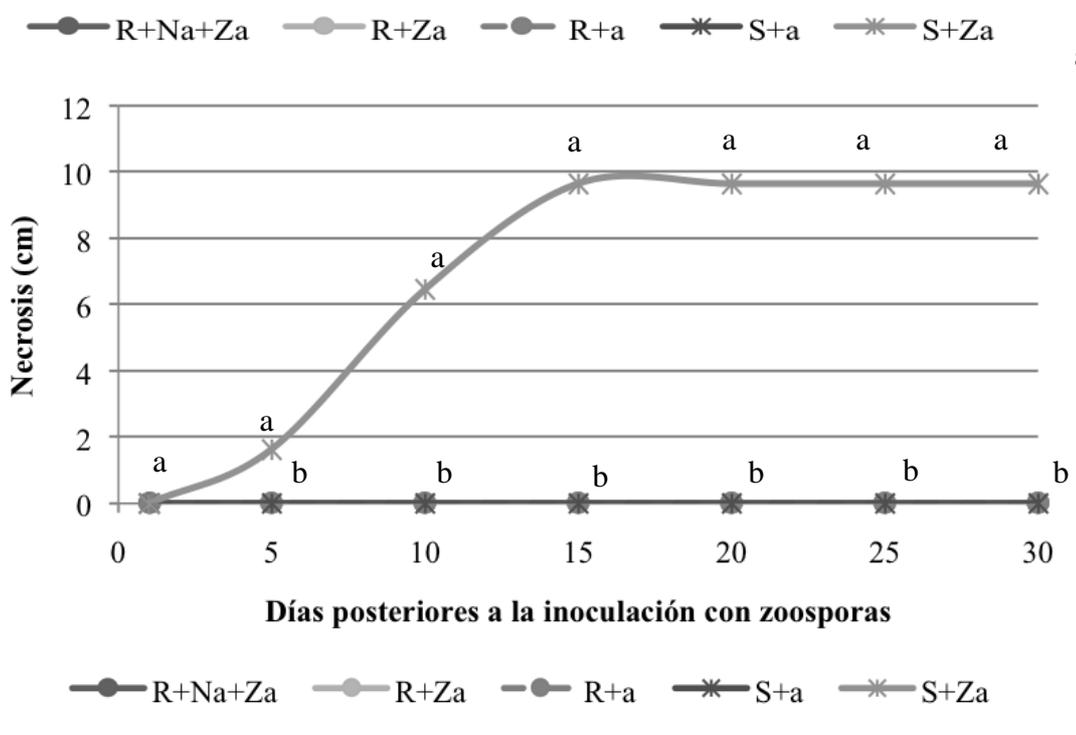
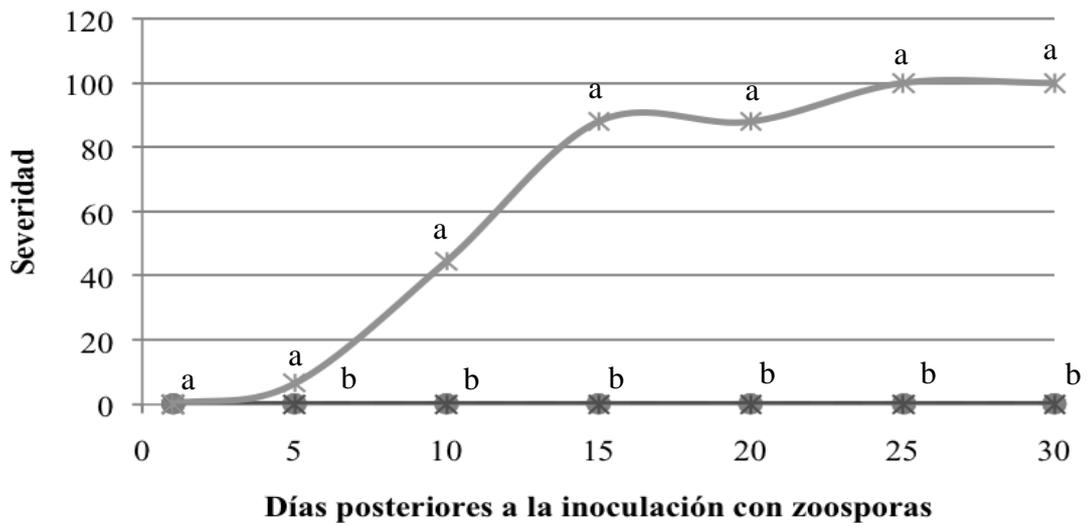


Fig. 7. Porcentaje de severidad (a) y necrosis (b) en plantas completas e inoculadas con zoosporas asperjadas (Za) al follaje en presencia y ausencia de *N. aberrans* (Na). R+Na+Za: Chile R inoculado con el nematodo y con zoosporas asperjadas. Za: plantas inoculadas con la aspersión con zoosporas. Na: plantas inoculadas con *N. aberrans*. a: aspersión con agua sin zoosporas. R= Chile CM-334, S=Chile var J. E. Parker. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

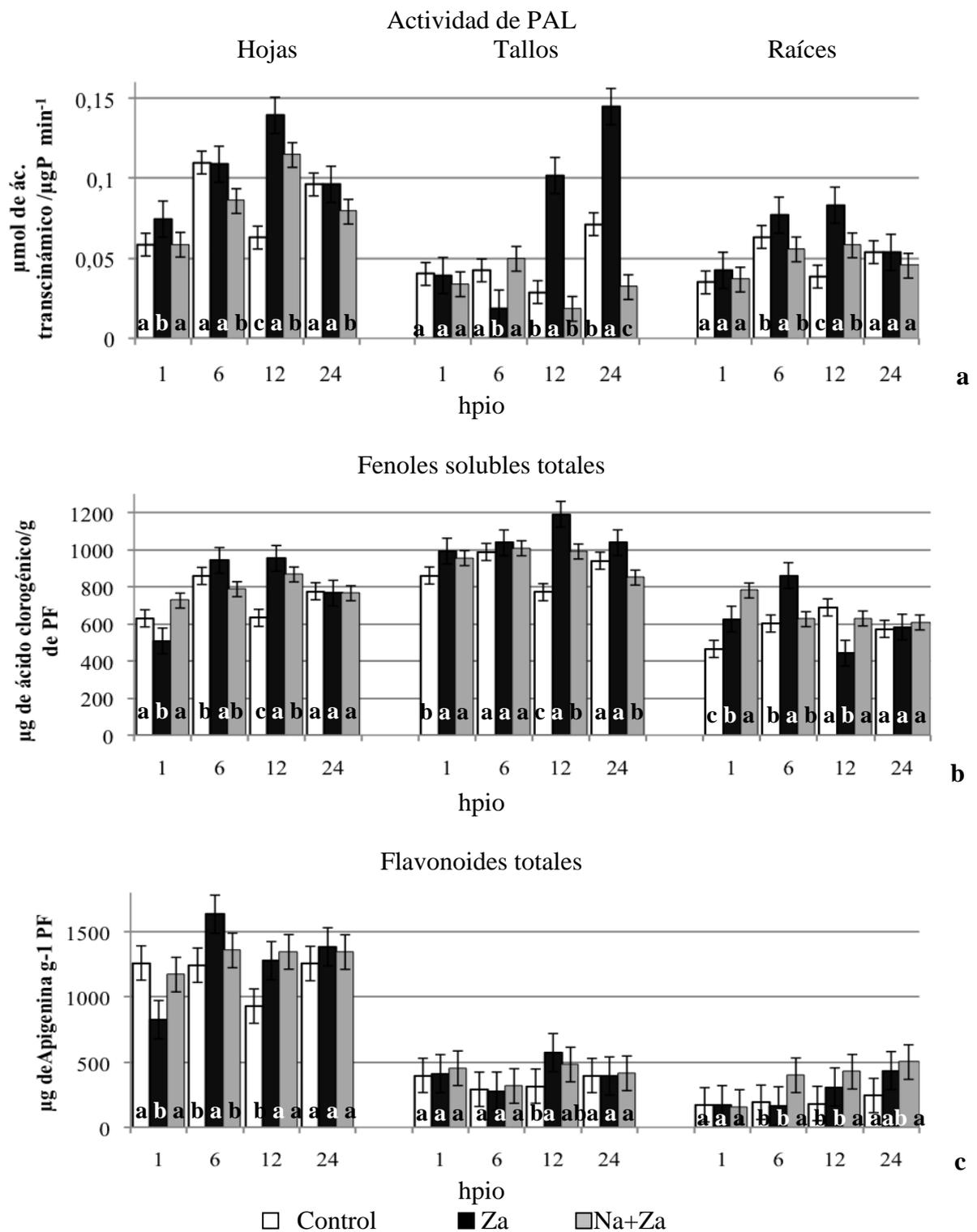


Fig. 8. Actividad de PAL (a), concentración de fenoles solubles (b) y flavonoides totales (c) en hojas, tallos y raíces del chile CM-334 no decapitado infectado con *Nacobbus aberrans* (Na) e inoculado por aspersion (a) de zoosporas (Z) de *Phytophthora capsici*. Valores

promedio de tres extracciones con seis lecturas cada una (n=18). Letras diferentes señalan para cada estrato y por tiempo la diferencia significativa entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

Experimento 2. Inoculación con micelio en plantas decapitadas

En plantas resistentes inoculadas con el micelio de *P. capsici* en presencia o ausencia de *N. aberrans* se observó una lesión necrótica a las 48 hpio (R+Na+Md, R+Md). Las plantas susceptibles infectadas con el micelio (S+Md) en los tallos decapitados, también presentaron síntomas de necrosis por abajo del sitio de inoculación; la necrosis afectó las hojas de forma descendente y a los 15 días pio las plantas murieron (Fig. 9, 10). En contraste, las plantas resistentes infectadas con micelio con o sin el nematodo (R+Na+Md y R+Md) no murieron a causa de la lesión (Fig. 9, 10), aunque el ápice del tallo presentó necrosis y en algunas plantas inoculadas sólo con el oomiceto (R+Md) el ápice se desprendió a los 15 días pio, mientras que en las plantas con ambos patógenos (R+Na+Md) la abscisión del ápice ocurrió hasta los 25 días pio, estos resultados sugieren que la respuesta de hipersensibilidad fue más rápida en ausencia del nematodo. En las plantas resistentes inoculadas con ambos patógenos (R+Na+Md), el avance de la lesión fue mayor pues alcanzó hasta las seis hojas verdaderas a los 20 días pio (cerca de 10 cm, Fig. 10b), en cambio en las plantas resistentes inoculadas sólo con el micelio la lesión sólo abarcó hasta las cuatro hojas verdaderas (8 cm aproximadamente, Fig. 10b). En plantas resistentes infectadas con *N. aberrans* e inoculadas con micelio (R+Na+Md) hubo un incremento en la longitud de la necrosis de 2 cm y un incremento en la severidad del 19% (Fig. 10). El oomiceto fue recuperado del tejido de plantas resistentes inoculadas con el micelio y el nematodo en el 75% de los cortes; en contraste en ausencia del nematodo (R+Md) el oomiceto no se recuperó.

En las plantas inoculadas con ambos patógenos (R+Na+Md), se observó una disminución significativa en la actividad de PAL a las 12 hpio en hojas y raíces del 39.1% y 55.7%; y en tallos en un 29.6% a las 24 hpio (Fig. 11a). Asimismo, en plantas decapitadas inoculadas con ambos patógenos, la concentración de fenoles también disminuyó significativamente a las 12 hpio en las hojas y tallos (31.5% y 19.7%, respectivamente), y en raíces a las 6 hpio en un 16% en comparación con las plantas inoculadas sólo con micelio del oomiceto (Fig. 11b). En cuanto a la concentración de flavonoides, se observó una disminución del 26.1% a las 12 hpio en las hojas, pero en los tallos la concentración de flavonoides disminuyó a las 6 hpio en un 2.2% en comparación con la plantas con micelio; en contraste en las raíces del mismo tratamiento (R+Na+Md), se encontró un incremento del 52.14% desde la 1 hpio (Fig. 11c).

Infección por N. aberrans. A los 50 días posteriores a la inoculación con el nematodo, se cuantificó un promedio de 23 agallas por raíz en plantas resistentes inoculadas con micelio y 25 agallas por raíz en plantas inoculadas con zoosporas.

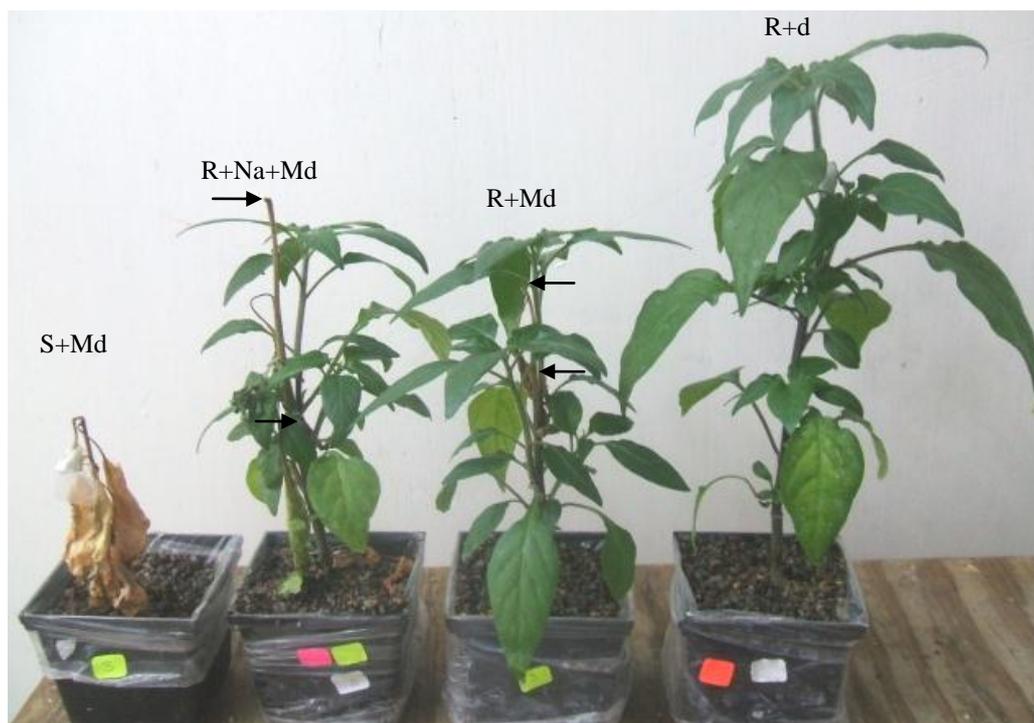


Fig. 9. Síntomas desarrollados en plantas de Chile resistente (R) y susceptible (S), decapitadas (d) e inoculadas con micelio de *P. capsici* (Md) en presencia o ausencia de *N. aberrans* (Na), a los 35 días posteriores a la inoculación con el oomiceto. R+Na+Md: Chile resistente (R) decapitado e inoculado con el nematodo y micelio del oomiceto sobre el área decapitada, nótese la magnitud del área necrosada (flechas negras) y la ausencia del ápice del tallo principal. R+Md: Chile R decapitado e inoculado sólo con micelio sobre el área decapitada, nótese la ausencia del ápice del tallo principal y el tamaño reducido del área necrosada (flechas negras). S+Md: Chile susceptible (S) decapitado e inoculado con micelio del oomiceto, nótese la magnitud del área muerta en el tallo y hojas. R+d: Chile R decapitado y con cilindro de medio V-8 sin micelio del oomiceto. R= Chile CM-334, S= variedad J. E. Parker.

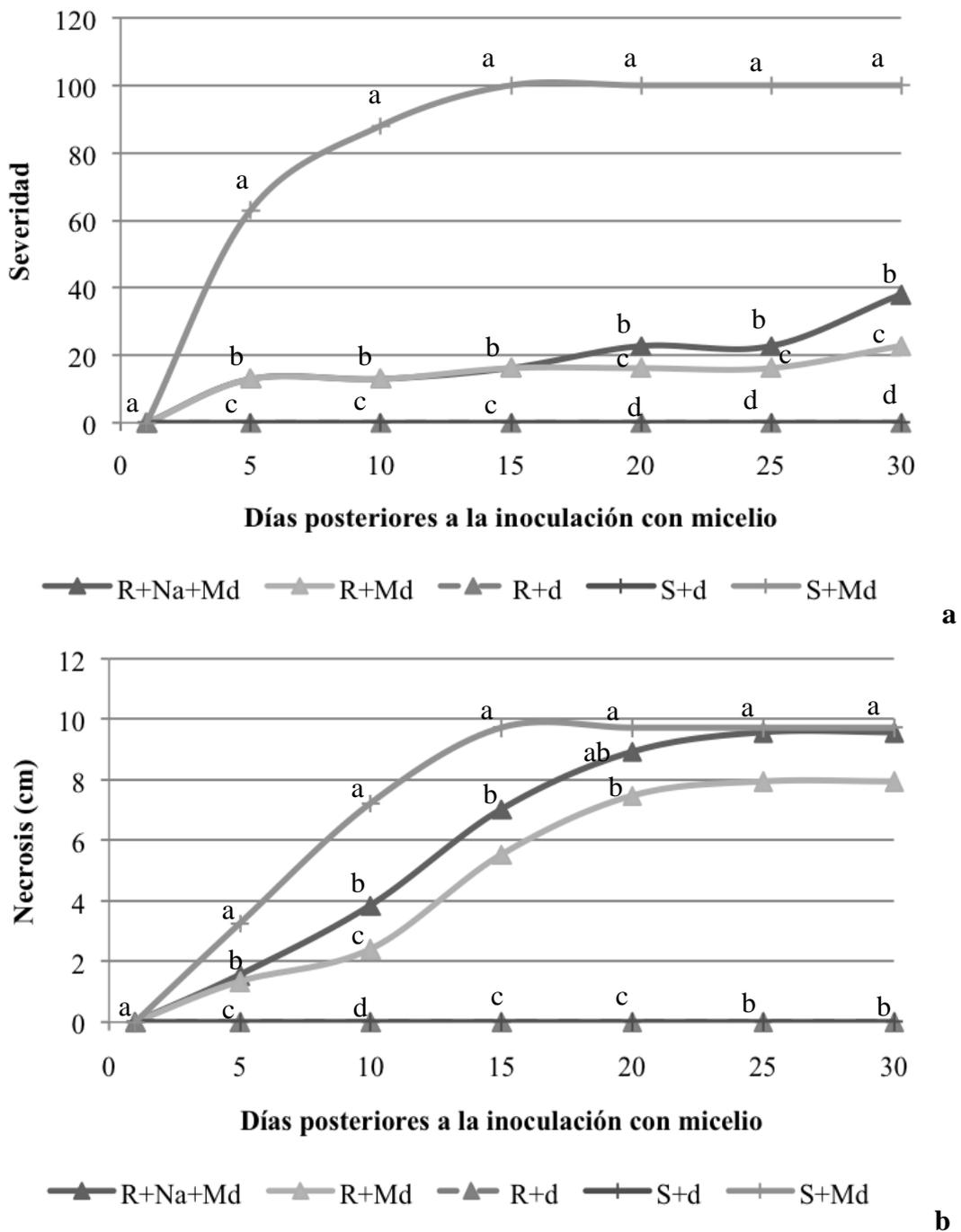


Fig. 10. Porcentaje de severidad (a) y necrosis (cm) (b) en plantas decapitadas (d), e inoculadas con micelio (M) en el tallo en presencia y ausencia de *N. aberrans* (Na). Na: plantas inoculadas con *N. aberrans*. Md=plantas decapitadas e inoculadas con micelio. d: plantas decapitadas, sin micelio. R=Chile CM-334, S=Chile var. J. E. Parker. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

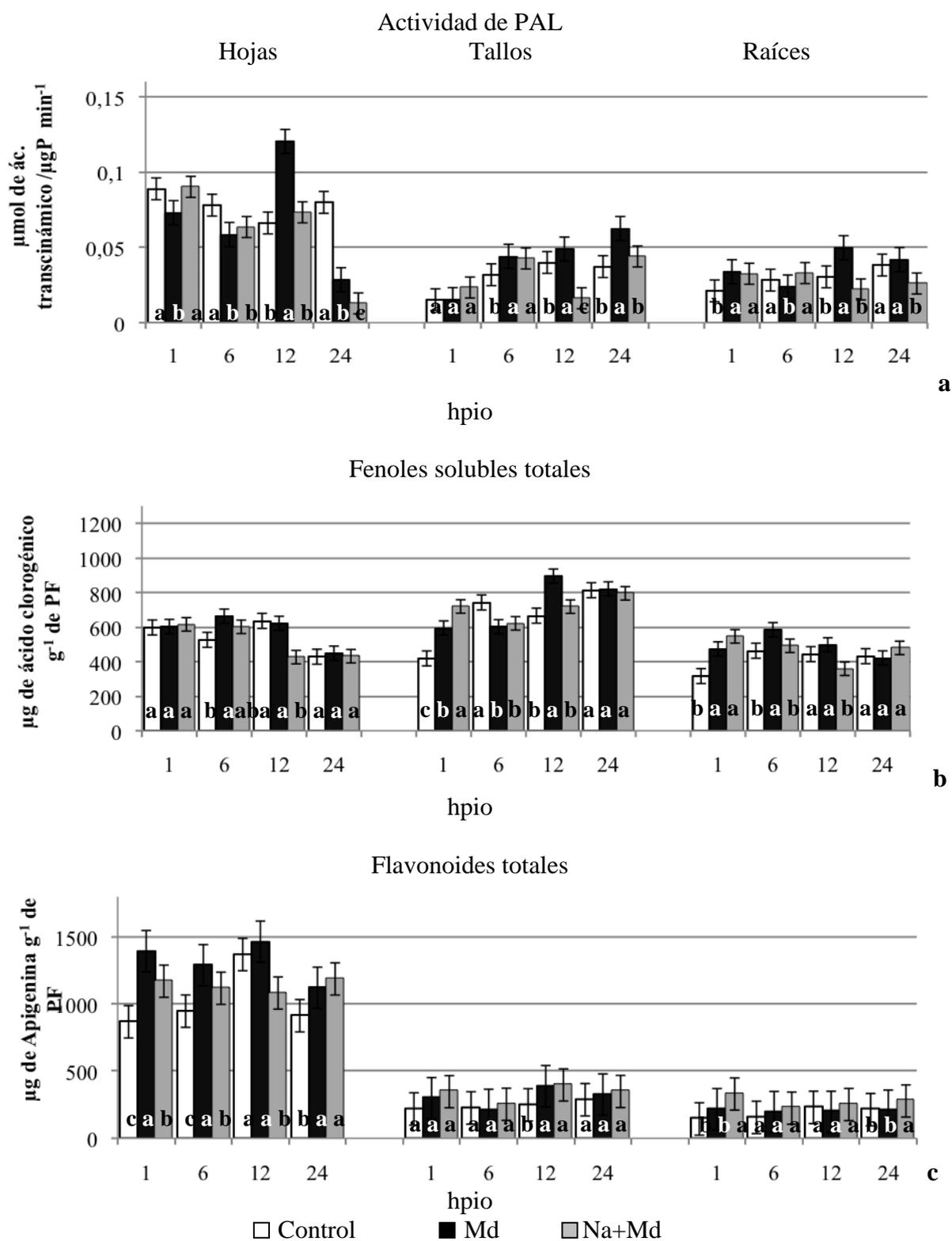


Fig. 11. Actividad de PAL (a), concentración de fenoles solubles (b) y flavonoides totales (c) en hojas, tallos y raíces del chile CM-334 decapitado infectado con *Nacobbus aberrans* (Na) e inoculado con micelio de *Phytophthora capsici*. hpio: horas posteriores a la inoculación del oomiceto. Valores promedio de tres extracciones con seis lecturas cada una (n=18). Letras

diferentes señalan para cada estrato y por tiempo, la diferencia significativa entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

El incremento en la necrosis y la severidad en plantas resistentes infectadas con el nematodo y el micelio (R+Na+Md) se asoció con reducciones en la actividad de PAL y la concentración de fenoles (Fig. 11 a y b). En el caso de las plantas de CM-334 inoculadas sólo con micelio (R+Md), la necrosis desarrollada muy probablemente fue producto de una respuesta de hipersensibilidad que logró confinar al patógeno, como lo sugiere el hecho de que en estas plantas se registró tanto una mayor actividad de PAL como contenido de fenoles (Fig. 8 a y b). En plantas inoculadas con el nematodo (R+Na+Md), la muerte del tejido probablemente no fue producto de una muerte celular programada, sino más bien el resultado de los mecanismos de ataque del oomiceto. Con anterioridad, Sanzón-Gómez (2010) encontró que en la interacción incompatible CM-334-*P. capsici* el avance de la necrosis y la colonización por el oomiceto se confinó al sitio de la inoculación en el tallo y en la interacción compatible CM-334-*Fusarium oxysporum*, el patógeno colonizó todo el tallo y en las células necrosadas la degradación de las paredes celulares fue evidente, en cambio en la interacción incompatible solamente hubo colapso de células sin evidencia de degradación de paredes celulares. En las plantas resistentes inoculadas por aspersión con zoosporas de *P. capsici*, no se observó el desarrollo de lesiones macroscópicas (Fig. 6); sin embargo, muy probablemente se expresó una RH a nivel microscópico como lo reportaron Ueeda *et al.*, 2006. Con esta forma de inoculación del oomiceto, aparentemente el nematodo no tuvo un efecto significativo en la expresión de la resistencia foliar. No obstante, se observó una disminución tanto en la actividad de PAL como en la concentración de fenoles (Fig. 9 a y b); tales resultados sugieren que la presencia del nematodo abatió de manera sistémica estos mecanismos de defensa en CM-334, sin embargo, tal abatimiento no fue de la magnitud suficiente para que las plantas mostraron susceptibilidad al oomiceto. Algo similar fue reportado por Villar-Luna y colaboradores (2009), quienes encontraron que en presencia del nematodo la reacción de hipersensibilidad foliar se retrasó de manera significativa en plantas CM-334 previamente infectadas con *N. aberrans*. La disminución en la actividad de PAL y fenoles solubles totales, entre ellos el ácido clorogénico, en las raíces del chile CM-334 infectadas con *N. aberrans* e inoculadas con zoosporas de *P. capsici* fue reportada con anterioridad por López-Martínez *et al.* (2011) y Godínez-Vidal *et al.* (2008). El menor contenido de ácidos fenólicos, como el vainílico, transcinámico y coumarico en las raíces del CM-334, muy probablemente beneficia

al nematodo, en virtud de que esos ácidos tienen un efecto nematicida contra *N. aberrans* (López-Martínez *et al.*, 2011). La relación entre los compuestos fenólicos y la resistencia de las plantas a nematodos (Baldrige *et al.*, 1998; Chiang-Ling y Rohde, 1973) y a *P. capsici* (Fernández-Pavía, 1997; Candela *et al.*, 1995) ha sido documentada. Los compuestos fenólicos además de tener un efecto tóxico sobre los patógenos (López-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Pavía, 1997; Candela *et al.*, 1995; Edens *et al.*, 1995; Graham y Graham, 1991) pueden contribuir con el engrosamiento de la pared celular y limitar el avance del patógeno (Koc *et al.*, 2011); la lignificación de las paredes celulares se ha considerado como un mecanismo de defensa de las plantas resistentes a la invasión por patógenos (Goodman *et al.*, 1986). Posiblemente la disminución de ácidos fenólicos en las plantas de CM-334 inoculadas con *N. aberrans*, favoreció el avance del micelio de *P. capsici* en sus tallos.

Contrario a lo observado con los fenoles, la acumulación de flavonoides fue mayor en las raíces y tallos de plantas infectadas con el nematodo e inoculadas con el micelio o zoosporas (R+Na+Md, R+Na+Za), en comparación con las plantas inoculadas sólo con el micelio o zoosporas (Fig. 8c y 11c). Este incremento en la concentración de los flavonoides totales resulta probablemente en el bloqueo del transporte de auxinas al inhibir a los transportadores de este regulador del crecimiento, favoreciendo la acumulación local de auxinas (Ithal *et al.*, 2007; Hutangura *et al.*, 1999). El papel de los flavonoides en la interacción planta-nematodo tiene relevancia, ya que en parte las secreciones esofágicas de los nematodos controlan la distribución de las auxinas en la raíz y los flavonoides pueden ser los responsables de controlar la acumulación de auxinas (Hutangura *et al.*, 1999). Las auxinas regulan la expresión de genes involucrados en el desarrollo de células gigantes y del sincitio (Mathesius, 2003). Govere y colaboradores (2000) demostraron que inhibiendo el transporte de auxinas, el sincitio no se desarrolla y por lo tanto los nematodos *Globodera rostochiensis* y *H. schachtii* no completan su ciclo de vida, por lo que concluyen que la acumulación local de las auxinas es inducida por los nematodos y tienen un papel crucial en la morfogénesis del sincitio.

En esta investigación, la disminución en la actividad de PAL y el contenido de fenoles, en los tres estratos de las plantas CM-334, se asoció con el establecimiento del micelio de *P. capsici* y con una mayor severidad y necrosis en plantas decapitadas infectadas con el nematodo e inoculadas con micelio de *P. capsici* (R+Na+Md). En contraste, en las plantas inoculadas con zoosporas aparentemente el nematodo no afectó la expresión de la resistencia, pero si redujo la actividad de PAL y la concentración de fenoles. Los resultados de la presente investigación

indican, que los cambios metabólicos inducidos por *N. aberrans* en las raíces de CM-334, se expresaron a nivel sistémico en plantas inoculadas en el follaje con zoosporas y micelio de *P. capsici*.

LITERATURA CITADA

- Baldrige, G., O'Neill, N., and Samac, D. 1998. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: defence-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. *Plant Molecular Biology* 38:999-1010.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Bell, J., Ryder, B. T., Wingate, M. P. V., Bailey, A. J., and Lamb, J. C. 1986. Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a compatible and incompatible plant pathogen interaction. *Molecular and Cellular Biology* 6:1615-1623.
- Bernards, A. M. and Ellis, E. B. 1991. Phenylalanine ammonia-lyase from tomato cell cultures inoculated with *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiology* 97:1494-1500.
- Bonnet, J., Danan, S., Boudet, C., Barchi, L. L., Sage-Palloiz, A. M., Caromel, B., Palloix, A., and Lefebvre, V. 2007. Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theoretical Applied Genetics* 115:253-264.
- Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B. W., Peer, A. W., Taiz, L., and Muday, G. K. 2001. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126:524-535.
- Butland, S., Chow, M., and Ellis, B. 1998. A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures. *Plant Molecular Biology* 37:15-24.
- Candela, M. E., Requena, M. E., and Egea-Gilabert, C. 2004. Análisis de rasgos cuantitativos de líneas de Pimiento (*Capsicum annuum* L.), mejoradas en relación con la resistencia a *Phytophthora capsici*. *Actas de Horticultura Número 41. II Congreso de Mejora Genética de Plantas*. 141-144 p.
- Candela, M. E., Egea, C., García-Pérez, D. M., Costa, J., and Candela, M. 2000. Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Horticulturae* 522:79-86.

- Candela, M. E., Alcazar, M. D., Espin, A., Egea, C., and Almela, L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* items infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44:116-123.
- Chiang-Ling, H., and Rohde, A. R. 1973. Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. *Journal of Nematology* 5:253-258.
- Crochrane, F. C., Davin, L. B., and Lewis, N. G. 2004. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65:1557-1564.
- Cramer, C. L., Edwards, K., Dron, M., Liang, X., Dildine, S. L., Bolwell, G. P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., Schuch, W. 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Molecular Biology* 12:367-383.
- de Rijke, E., P., Out, M., Wilfried, A., Niessen, F., Ariese, C., Gooijer, and U. A. Th., Brinkman. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. Review. *Journal of chromatografy* 1112:31-63.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7:1085-1097.
- Edens, M. R., Anand, C. S., and Bolla, I. R. 1995. Enzymes of the phenylpropanoid pathway in soybean infected with *Meloidogyne incognita* or *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 27:292-303.
- Edwards, K., Cramer, C. L., Bolwell, G. P., Dixon, R. A., Schuch, W., and Lamb, C. J. 1985. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proceedings of the National Academic Sciences. Biochemistry* 82:6731-6735.
- Egea-Gilabert, C., Bilotti, G., Requena, M. E., Ezziyyani, M., Vivo-Molina, J. M., and Candela, E. M. 2008. Pepper morphological traits related with resistance to *Phytophthora capsici*. *Biologia Plantarum* 52:105-109.
- Egea, C., Alcazar, M. D., and Candela, M. E. 1996. Capsidiol: its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 98:737-742.
- Fernández-Pavia, S. P. 1997. Host-pathogen interaction in the root rot resistant *Phytophthora capsici/Capsicum annuum* CM-334 pathosystem. Ph. D. Thesis. New México State University, Las Cruces, New Mexico, USA. 109 p.
- Fernández-Pavia, S., and Liddell, C. 1997. Resistance of *Capsicum annuum* CM-334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. *Phytopathology* 87:S29.

- Glosier, R. B., Ogundiwin, A. E., Sidhu, S. G., Sischo, R. D., and Prince, P. J. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica* 162:23-30.
- Godínez-Vidal, D., Soto-Hernández, M., Rocha-Sosa, M., Lozoya-Gloria, E., Rojas-Martínez, R. I., Guevara Olvera, L., y Zavaleta-Mejía, E. 2010. Contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por *Nacobbus aberrans* y su efecto en juveniles del segundo estadio. *Nematropica* 40:227-237.
- Godínez-Vidal, D., Rocha Sosa, M., Sepúlveda García, E. B., Lara Reyna, J. Rojas Martínez, R., Zavaleta-Mejía, E. 2008. Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology* 120:299-303.
- Goodman, R. N., Kiraly, Z., and Wood, R. K. 1986. *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. University of Missouri Press. USA. 433 p.
- Goverse, A., Overmars, H., Engelbertink, J., Schots, A., Bakker, J., and Helder, J. 2000. Both induction and morphogenesis of cyst nematode feeding cells are mediated by auxin. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:1121-1129.
- Hanawa, F. T., Yamada, T. and Nakashima, T. 2001. Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytochemistry* 57:223-228.
- Huang S. J., and Barker, R. K. 1991. Glyceollin I in soybean-cyst nematode interactions spatial and temporal distribution in roots of resistant and susceptible soybeans. *Plant Physiology* 96:1302-1307.
- Hutangura, P., Mathesius, U., Jones, M. G. K., and Rolfe, B. G. 1999. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. *Australian Journal of Plant Physiology* 26:221-231.
- Ithal, N., Recknor, J., Nettleton, D., Maier, R., Baum, T. J., and Mitchum, M. G. 2007. Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:510-525.
- Jacobs, M., and Rubery, P. H. 1988. Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* 241:346-349.

- Kaplan, D. T., Keen, N. T., and Thomason, I. J. 1980. Studies on the mode of action of glyceollin in soybean incompatibility to the root-knot nematode, *Meloidogyne* intracellular and intercellular trafficking in plants. *The Plant Cell* 11:535-548.
- Koç, E., Sülün Üstün, A., İşlek C., and Kaşko Arıc, Y. 2011. Defence responses in leaves of resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum* L.) cultivars infected with different inoculum concentrations of *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae* 128:434-442.
- Lawton, M. A., Dixon, R.A., Hahlbrock, K. and Lamb, C.J. 1983. Elicitor induction of mRNA activity: rapid effects of elicitor on phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA activities in bean cells. *European Journal of Biochemistry* 130:131-139.
- Lizzi, Y., Roggero, J. P. and Coulomb, P. 1995. Behaviour of the phenolic compounds on *Capsicum annuum* leaves infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Phytopathology* 143:619-627.
- Lefebvre, V., and Palloix, A. 1996. Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease: a case study, the interaction pepper-*Phytophthora capsici* Leonian. *Theoretical Applied Genetics* 93:503-551.
- López-Martínez, N., ColinasLeón, M. T., Peña-Valdivia, C. B., SalinasMoreno, Y., Fuentes-Montiel, P., Biesaga, M., and ZavaletaMejía, E. 2011. 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 and Soil* 338:399-409.
- Mathesius, U. 2003. Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soilmicrobes the *Rhizobium*-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. *Plant and Soil* 255:105-119.
- Marley, S. P., and Hillocks, J. R. 1994. Effect of root-knot nematodes on cajanol accumulation in the vascular tissues of pigeonpea after stem inoculation with *Fusarium udum*. *Plant Pathology* 43:172-174.
- Nagai, N., Kitauchi, F., Shimosaka, M. and Okazaki, M. 1994. Cloning and sequencing of a full-length cDNA coding for phenylalanine ammonia lyase from tobacco cell culture. *Plant Physiology* 104:1091-1092.

- Oelke, M. L., Bosland, W. P., and Steiner, P. 2003. Differentiation of races specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128:213-218.
- Ogundiwin, E. A., Berke T. F., Massoudi, M. A., Black, L. L., Huestis, G., Choi, D., Lee, S., Prince, J. P. 2005. Construction of 2 intraspecific linkage maps and identification of resistance QTLs for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar-blight diseases of pepper (*Capsicum annuum* L). *Genome* 48:698-711.
- Palloix, A., Daubeze, A. M., and Pochard, E. 1988. Time sequences of root infection and resistance expression in an artificial inoculation method of pepper with *Phytophthora capsici*. *Journal of Phytopathology* 123:12-24.
- 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 phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95:158-165.
- Pelligrini, L., Rohfritsch, O., Fritig, B., and Legrand, M. 1994. Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiology* 106:877-886.
- Reyes, L. F., and Cisneros-Zevallos, L. 2003. Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:5296-5300.
- Rich, J. R., Keen, T. N., and Thomason, J. 1977. Association of coumestans with the hypersensitivity of lima bean roots to *Pratylenchus scribneri*. *Physiological Plant Pathology* 10:105-116.
- Ride, J. P. 1985. Non-host resistance to fungi. *In*: Junk W (ed). *Mechanisms of resistance to plant disease*. RSS Fraser, Dordrecht, 29-36 p.
- Rookes, E. J., and Cahill, M. D. 2003. A *PAL1* Gene promoter-green fluorescent protein reporter system to analyse defence responses in live Cells of *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Plant Pathology* 109:83-94.
- Sanzón-Gómez, D. 2010. Comparación de los cambios estructurales en células de chile CM334 en una interacción compatible y una incompatible. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados Fitosanidad-Fitopatología. Montecillo, Edo. Mex. 51 p.
- SAS Institute. 1998. User's guide. The SAS system software for windows release 6.12. SAS Institute, Cary, N. C. USA.

- Shufflebottom, D., Edwards, K., Wolfgang, S., and Bevan, M. 1993. Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction patterns. *The Plant Journal* 3:835-845.
- Silvar, C., Diaz, J., and F. Merino. 2005. Real-time polymerase chain reaction quantification of *Phytophthora capsici* in different pepper genotypes. *Phytopathology* 95:1423-1429.
- Sy, O., Bosland, W. P. 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 for Horticultural Science* 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.
- Ueeda, 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.
- Veech, A. J. 1982. Phytoalexins and their role in the resistance of plants to nematodes. *Journal of Nematology* 14:2-9.
- Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R. I., Hernández-Anguiano, A. M., Gómez-Rodríguez, O., y Zavaleta-Mejía, E. 2009. Respuesta hipersensitiva en el follaje de Chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.
- Zavaleta-Mejía, E. 2002. Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparásitos, una hipótesis. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:118-122.

CAPITULO IV

ACTIVIDAD DE PAL EN EL CHILE CM-334 INFECTADO CON *Nacobbus aberrans* Y EL FOLLAJE INOCULADO POR INMERSIÓN EN ZOOSPORAS DE *Phytophthora capsici*

RESUMEN

Se evaluó el desarrollo de necrosis, severidad, la acumulación de transcritos y la actividad de PAL en el chile (*Capsicum annuum* L.) Criollo de Morelos 334 (CM-334) resistente a *Phytophthora capsici* (Pc) en presencia y ausencia del nematodo *Nacobbus aberrans* (Na). Pc se inoculó a los 21 días después de que se inoculó Na, sumergiendo a las plantas en una suspensión de zoosporas (Zi). A las 2, 6 y 12 horas posteriores a la inoculación (hpio) con el oomiceto, se tomaron 10 plantas por tiempo. La actividad de PAL se midió por espectrofotometría y la acumulación de transcritos se determinó en un Northern blot. Los datos obtenidos de todas las variables se sometieron a un análisis de varianza ($P \leq 0.05$) y prueba de Tukey. En la necrosis y el porcentaje de severidad no se observaron diferencias significativas en plantas inoculadas con ambos patógenos (R+Na+Zi) con respecto a las plantas inoculadas sólo con el oomiceto (R+Zi). La lesión en las hojas fue una respuesta de hipersensibilidad que se expresó en las plantas con o sin el nematodo. En plantas infectadas por Na e inoculadas con zoosporas, la actividad de PAL disminuyó en un 26.2% y en un 52.3% a las 6 y 12 hpio en hojas y raíces respectivamente, con relación a las plantas inoculadas solo con zoosporas. A las 12 hpio en las hojas y raíces de plantas del tratamiento R+Zi la acumulación de transcritos incrementó 1.5 veces y 1.9 veces, en comparación con las plantas inoculadas con ambos patógenos. La presencia de *N. aberrans* en las raíces redujo la acumulación de transcritos y la actividad de PAL en el follaje inoculado con zoosporas de *P. capsici*; sin embargo, la reacción de hipersensibilidad no fue inhibida por la presencia del nematodo.

Palabras clave: Chile CM-334, PAL, *Phytophthora capsici*, *Nacobbus aberrans*, zoosporas por inmersión.

ABSTRACT

Development of necrosis, severity, accumulation of transcripts and the activity of PAL were evaluated in the chile (*Capsicum annuum* L.) Criollo de Morelos 334 (CM-334) resistant to *Phytophthora capsici* (Pc) in the presence and absence of the nematode *Nacobbus aberrans* (Na). Pc was inoculated at 21 days after inoculation with Na, submerging the plants in a suspension of zoospores (Z). At 2, 6 and 12 hours post inoculation (hpio) with the oomycete, 10 plants were sampled at each time. PAL activity was measured by spectrophotometry and the accumulation of transcripts was determined by Northern blot analysis. Data from all variables evaluated were subjected to analysis of variance ($P \leq 0.05$) and Tukey's test. No significant differences were detected neither in necrosis or severity in plants inoculated with both pathogens (R+Na+Zi) as compared to plants inoculated only with the oomycete (R+Zi). The lesion in the leaves was a hypersensitive response expressed in plants with or without the nematode. In plants infected by the nematode and inoculated with zoospores, the activity of PAL decreased by 26.2% and 52.3% at 6 and 12 hpio in leaves and roots, respectively, as compared to plants inoculated with zoospores only. At 12 hpio in leaves and roots of plants from the R+Zi treatment the transcripts accumulation was 1.5 times and 1.9 times higher than plants inoculated with both pathogens. The presence of *N. aberrans* in the roots reduced the accumulation of transcripts and the activity of PAL in the leaves inoculated with zoospores of *P. capsici*; however, the hypersensitivity reaction was not inhibited by the presence of the nematode.

Keywords: pepper CM-334, PAL, *Phytophthora capsici*, *Nacobbus aberrans*, zoospores by immersion.

INTRODUCCIÓN

La resistencia en el chile (*Capsicum annuum* L.) se ha encontrado principalmente en materiales silvestres y actualmente el chile tipo serrano Criollo de Morelos 334 (CM-334), identificado por investigadores del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de México se ha clasificado como el resistente universal (Glosier *et al.*, 2008; Bonnet *et al.*, 2007). Guerrero y Laborde (1980) identificaron dos genes recesivos asociados con la resistencia de este genotipo al oomiceto; en cambio, Gil Ortega *et al.*, (1991) mencionan que son tres genes dominantes los involucrados. Por otro lado, Reifschneider y

colaboradores (1992), concluyen que existen dos genes y que la resistencia se manifiesta cuando un gen se comporta como dominante y otro como recesivo en epistasia. La resistencia del chile CM-334, se ha mantenido aún cuando se ha inoculado con las cepas más patogénicas del oomiceto (Glosier *et al.*, 2008; Alcántara y Bosland, 1994; Gil Ortega *et al.*, 1991; Guerrero-Moreno y Laborde, 1980). CM-334 es resistente a los tres síndromes causados por *P. capsici*: tizón de hojas y tallos, y pudrición de la raíz (Sy *et al.*, 2005; Redondo, 1985; Guerrero-Moreno y Laborde, 1980). Respecto a la herencia de la resistencia en el follaje, Walker y Bosland (1999) proponen que ésta, es conferida por dos genes diferentes dominantes independientes a los de la raíz. Por su parte, Sy y colaboradores (2005), indican que los genes que confieren la resistencia en los tres estratos (raíz, tallo, hojas) son diferentes. Sin embargo, el análisis por mapas del loci de caracteres cuantitativos (QTLs por sus siglas en inglés) en híbridos resultantes de cruza del resistente CM-334 y el susceptible Yolo Wonder, sugiere que la resistencia de CM-334 contra *P. capsici* es poligénica y parcial (Bonnet *et al.*, 2007).

La resistencia del chile CM-334 contra *P. capsici* se ha relacionado con incrementos en la acumulación de transcritos de la fenilalanina amonio liasa (PAL), la actividad de peroxidasas, un mayor contenido de fenoles y con la reacción de hipersensibilidad tanto en raíces (Fernández-Pavia, 1997) como en follaje (Ueeda *et al.*, 2006). La ruta de los fenilpropanoides en las plantas es responsable de la síntesis de una amplia variedad de metabolitos secundarios como ligninias, salicilatos, coumarinas, amidas hidroxicinámicas, flavonoides, pigmentos, protectores de luz UV y antioxidantes (Dixon y Paiva, 1995). El primer paso para la biosíntesis de estos compuestos es la conversión de la L-Fenilalanina (L-Phe) en ácido *trans*-cinámico, reacción llevada a cabo por la enzima PAL (EC 4.3.1.5). PAL es una enzima tetramérica que se acumula principalmente en células con reacción de hipersensibilidad (RH) y en algunos casos, determina si la interacción entre las plantas y el patógeno será compatible o incompatible (Hahlbrock y Scheel, 1989). Los genes PAL son activados transcripcionalmente después de una infección microbiológica o por los elicitores derivados de patógenos (Edwards *et al.*, 1985; Lawton *et al.*, 1983). La enzima PAL es codificada por una familia de genes y en tabaco (*Nicotina tabacum*), papa (*Solanum tuberosum* L.), jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y *Arabidopsis thaliana* se han identificado algunas isoformas. En tabaco y papa sobresalen dos isoformas de la enzima *PAL1* y *PAL2* (Nagai *et al.*, 1994; Pelligrini *et al.*, 1994). En frijol se reportan formas polimórficas de la enzima que

se diferencian entre sí por el marco de lectura abierto (ORF) mayor en dos aminoácidos en la isoforma gPAL2 (clase II) en comparación con la isoforma gPAL3 (clase III) (Cramer *et al.*, 1989). En *A. thaliana* se reportan cuatro isoformas que se expresan en diferentes condiciones y partes de la planta; las isoformas *Atpal* 1, 2 y 4 fueron inducidas en los tallos, mientras que *Atpal3* se encontró en todos los tejidos de la planta siendo más abundante en las hojas, y durante el desarrollo de la planta se observó un incremento de transcritos de las isoformas *Atpal* 1 y 2 (Cochrane *et al.*, 2004). En plantas transgénicas de tabaco, *Arabidopsis* y papa la isoforma *PAL3* se expresó en hojas inoculadas con *Erwinia carotovora* (Shufflebottom *et al.*, 1993). En la interacción *Verticillium albo-atrum*-jitomate se expresaron cinco isoformas de PAL, mientras que en el control solo se expresó una isoforma de la enzima (Bernards y Ellis, 1991).

La resistencia de CM-334 se rompe cuando las plantas son previamente infectadas por *Nacobbus aberrans* (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 1996). Este fenómeno es conocido como rompimiento de la resistencia y en un principio se explicó por el daño mecánico que el nematodo produce en las raíces de la planta durante la penetración; sin embargo, existe evidencia de que los cambios metabólicos y/o fisiológicos inducidos por el nematodo son los responsables del rompimiento de la resistencia (Vargas *et al.*, 1996; Bowman y Bloom, 1966). Los nematodos sedentarios formadores de agallas como *Meloidogyne* spp y *Nacobbus* spp son capaces de inducir la formación de sitios especializados de alimentación, células gigantes y sincitios, respectivamente (Atkinson, 1994; Opperman *et al.*, 1994; Niebel *et al.*, 1993; Sijmons, 1993) que involucran la reprogramación de la expresión génica de las células hospedantes. Al respecto se ha demostrado que *M. incognita* reprime la expresión del gen *Pal* (Godijn *et al.*, 1993) indispensable para la síntesis de fenoles, ligninas, coumarinas, flavonoides, compuestos fenólicos y fitoalexinas (Klessing y Malamy, 1994; Piñol y Palazón, 1996).

También se reporta que *Meloidogyne* modificó la expresión del gen *hmg* que codifica para la hidroximetil glutaril coenzima A reductasa (HMG-CoAR), enzima involucrada en la síntesis de esteroides; compuestos indispensables para el desarrollo del nematodo, el cual es totalmente dependiente de las plantas hospedantes para obtener estos compuestos (Cramer *et al.*, 1993; Chitwood y Lusby, 1991). El chile CM-334 tiene resistencia a *M. arenaria*, *M. incognita*, y *M. javanica* expresando dos tipos de resistencia, uno responsable de la supresión

de la penetración de los juveniles del segundo estadio (J2) y el otro del bloqueo del desarrollo post-penetración del nematodo. Este último se ha relacionado con la presencia del gen *Me7* (Pegard *et al.*, 2005) y con la acumulación del ácido clorogénico, metabolito sintetizado a través de la ruta de los fenilpropanoides y que tiene propiedades tóxicas contra especies de *Meloidogyne* (Djian-Caporalino *et al.*, 2001). En contraste con lo anterior, en la interacción compatible del chile CM-334 con *N. aberrans*, la acumulación de fenoles solubles y del ácido clorogénico fue disminuida (López-Martínez *et al.*, 2011). Los cambios bioquímicos inducidos por *N. aberrans* en las raíces de CM-334 incluyen la reducción en la actividad de PAL (López-Martínez *et al.*, 2011; Godínez-Vidal *et al.*, 2008) y peroxidasas; así como en el contenido de fenoles solubles totales, en particular del ácido clorogénico (López-Martínez *et al.*, 2011). De igual manera, el contenido de la fitoalexina sesquiterpenica capsidiol, reportada como inhibidora del crecimiento de *P. capsici* (Villar-Luna *et al.*, 2009; Egea *et al.*, 1996), disminuyó en las raíces y en las hojas del CM-334 (Godínez-Vidal *et al.*, 2010; Villar-Luna *et al.*, 2009) infectadas por *N. aberrans*. Todos estos cambios inducidos por el nematodo en las plantas CM-334, podrían ser en parte responsables de la susceptibilidad que muestran a *P. capsici* una vez que son infectadas por el nematodo. Con base en estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad y la acumulación de transcritos de PAL en el chile CM-334 infectado por *N. aberrans* y el follaje inoculado por inmersión en una suspensión de zoosporas de *P. capsici*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Las plantas resistentes a *P. capsici* Leo., del chile serrano Criollo de Morelos 334 (CM-334) y las plantas susceptibles variedad Joe E. Parker (JEP) se obtuvieron siguiendo la metodología descrita en el Capítulo II en la sección de Materiales y Métodos.

Obtención de inóculo de *Nacobbus aberrans*

El inóculo utilizado provino de masas de huevecillos colectadas de raíces agalladas de jitomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) infestadas naturalmente. El procedimiento para la eclosión de los huevecillos y la inoculación de las plantas fue igual al descrito en el Capítulo II en la sección de Materiales y Métodos.

Obtención de inóculo e inoculación con zoosporas por inmersión

La siembra del oomiceto y la obtención de zoosporas se hicieron como se indicó en el Capítulo II. El conteo del número de zoosporas en la suspensión se se hizo la ayuda de un hemacitometro (Marienfeld®) y se ajustó la suspensión a 100,000 zoosporas mL⁻¹. Enseguida las plantas se inocularon por inmersión de la parte aérea en la suspensión durante 20 segundos. La inoculación con el oomiceto se realizó 21 días después de la inoculación con *N. aberrans* (Trujillo–Viramontes *et al.*, 2005). El sustrato de las macetas previamente fue cubierto con un plástico para evitar el contacto del inóculo con las raíces y el sustrato de la planta. Se mantuvieron las plantas en las cámaras de crecimiento bajo las condiciones antes mencionadas en el Capítulo II (Materiales y Métodos).

Establecimiento del experimento

Se tuvieron cinco tratamietos: 1) plantas resistentes inoculadas con nematodo y zoosporas (R+Na+Zi), 2) plantas resistentes inoculadas con zoosporas (R+Zi), 3) testigo resistente sin nematodo con inmersión en agua destilada estéril (R+i), 4) plantas susceptibles inoculadas con zoosporas (S+Zi), y 5) plantas susceptibles con inmersión en agua destilada estéril (S+i). Los tratamientos 4) y 5) se establecieron con la finalidad de verificar la efectividad de la inoculación.

Avance de la necrosis

En 10 plantas de cada tratamiento se registró el número de hojas infectadas y el tamaño de las lesiones (largo y ancho en cm). La evaluación se hizo cada cinco días durante los siguientes 30 días posteriores a la inoculación con el oomiceto; para determinar si *P. capsici* había colonizado los tejidos a los 25 días se tomaron tres plantas por tratamiento con zoosporas con o sin el nematodo y se sembraron en cajas de petri con agua destilada estéril para determinar si *P. capsici* había colonizado los tejidos.

Cuantificación de la actividad de PAL

La cuantificación de PAL se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo III.

Acumulación de transcritos de PAL

Extracción de RNA total

La extracción de RNA total de hojas y raíces se realizó de muestras con 10 plantas por tratamiento, con base en la metodología de Longeman y colaboradores (1987) con modificaciones. El RNA total fue cuantificado con el espectrofotómetro Nanodrop 1000 versión 3.2.1 y su integridad y pureza se determinó por electroforesis (10µg/µL) en geles de agarosa (SIGMA) desnaturalizados con formaldehído al 1.2%. El RNA de los geles de agarosa se transfirió por capilaridad (Sambrook *et al.*, 1989) a membranas de Nylon Hybond N+ (Amersham Life Science) mediante la solución salina de Citrato SSC 10x. Después de 18 h la transferencia del RNA total del gel de agarosa a la membrana fue verificada bajo luz UV con un fotodocumentador (Gel Doc 2000, Bio-Rad). Posteriormente la membrana de nylon se fijó con UV en el equipo UV-Stratalinker 1800 (Stratgene) a 1200 µJoulesX100.

Generación de la Sonda Homóloga para PAL

Con los iniciadores previamente diseñados por Godínez-Vidal (2004) (GenBank:X63103) fueron generadas dos sondas homologas del chile CM-334 para PAL (Fig. 12), mediante la retrotranscripción y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir de RNA total obtenido de muestras de hojas y raíces del chile CM-334. Con la metodología descrita por Kotewicz y colaboradores (1985) se realizó la generación del cDNA utilizando el Oligo *dT*₁₂₋₁₈ (Invitrogen) para corroborar la presencia de mensajeros. Para la amplificación del cDNA obtenido, las condiciones de reacción fueron: 35 ciclos de 94°C por 15 seg, 55°C por 15 seg min y 72°C por 1.5 min. La integridad y pureza de los productos de la PCR se determinó en geles de agarosa (SIGMA) al 1%, utilizando como marcador de peso molecular a λPst I.

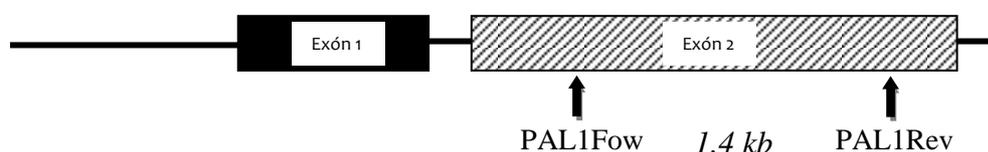


Fig. 12. Región de amplificación del exón 2 del gen *PAL* de *Solanum tuberosum*, las flechas indican la posición de los iniciadores o primers (PAL1Fow: Foward, PAL1Rev: Reverse) (Godínez-Vidal, 2004).

Hibridación

Las membranas de nylon con el RNA transferido se incubaron por 3 h a 65°C en un amortiguador de hibridación (Amortiguador de fosfatos pH 7.2 [1 M], SDS 10% y EDTA [0.5 M]) antes de adicionar la sonda marcada radiactivamente con α -³²P dCTP (Amersham Megaprime DNA Labeling Systems RPN1606/7). Después de adicionar la sonda, las membranas se incubaron a 65° C durante 18 horas, con la finalidad de remover la marca no incorporada y la sonda que no hibridó al término de este tiempo se realizó un primer lavado con la solución SSC 4X y SDS 0.1% durante 20 min a 65° C y un segundo lavado con SSC 0.4X y SDS 0.1% durante 30 min a 65° C. Finalmente las membranas fueron expuestas durante 18 horas en películas X OMAT (Kodak) a -70°C el tiempo necesario hasta detectar señal. Las imágenes fueron analizadas con el procesador de imágenes IMAGEJ.

Toma de muestras

Para el análisis de la actividad enzimática y la acumulación de transcritos se muestrearon 10 plantas resistentes por tratamiento a las 2, 6 y 12 horas después de la inoculación con el oomiceto y fueron almacenadas por estrato (hojas y raíces) a -80° C hasta su utilización.

Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de las diferentes variables evaluadas por fechas y por estrato por separado (hojas y raíces) se sometieron a un análisis de varianza y cuando indicó diferencias significativas entre tratamientos se realizó la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), usando el paquete SAS versión 9.2 (SAS Institute, 2008).

Infeción por *N. aberrans*

A los 30 días posteriores a la inoculación con el oomiceto se cuantificó el número de agallas por planta de tres plantas de los tratamientos previamente infectados con el nematodo.

RESULTADOS

Las plantas susceptibles mostraron los síntomas típicos de tizón desde el primer día posterior a la inoculación y a los 5 días murieron (Fig. 13a y b; Fig. 14); en cambio, las plantas resistentes presentaron menor severidad y necrosis y ninguna murió a causa de las lesiones (Fig. 13 a y b). Las lesiones en las hojas de plantas resistentes (CM-334) se observaron a las 6 h en plantas resistentes infectadas por inmersión en la suspensión de zoosporas; tal

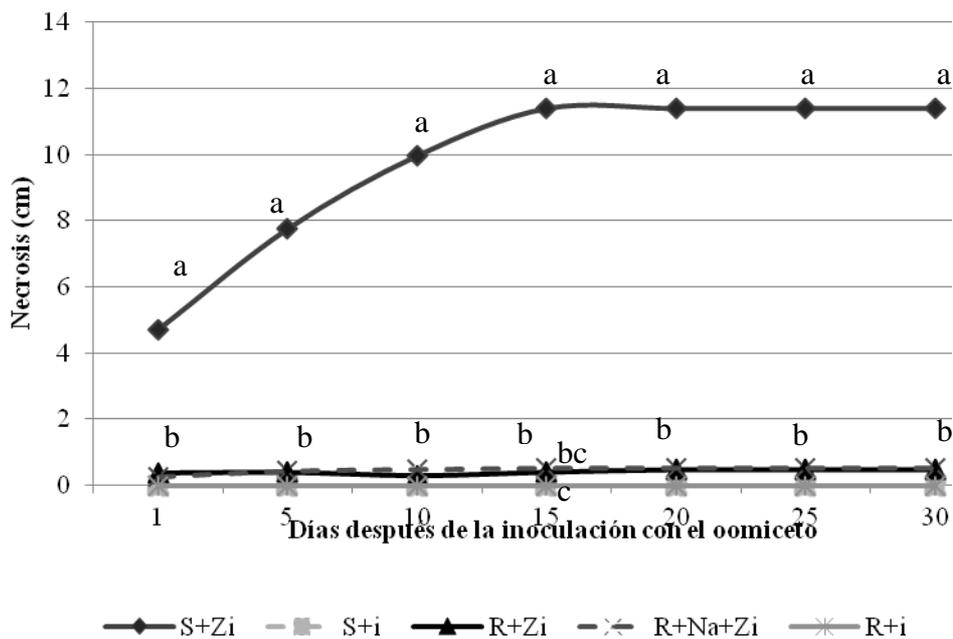
respuesta se observó tanto en presencia como en ausencia de *N. aberrans* (Fig. 14 a y b). La lesión en plantas resistentes (R+Na+Zi, R+Zi) fue irregular y de crecimiento limitado, inicialmente con una coloración verde olivo en el centro (Fig. 14 a y b) y al final con borde necrótico y centro blanco de aspecto quebradizo (Fig. 14d y e); la apariencia de la lesión fue similar a la que se observa durante la respuesta de hipersensibilidad. En las plantas resistentes CM-334 inoculadas solo con el oomiceto (R+Zi) en ninguno de los cortes de hoja se desarrolló *P. capsici*; mientras que en aquellas inoculadas con *N. aberrans* (R+Na+Zi) y el oomiceto, este se detectó en un 73% del total de cortes de hojas a los 25 días pio. En las plantas susceptibles el oomiceto se recuperó en el 99% de los segmentos de hoja.

Actividad y acumulación de transcritos de PAL en las hojas del CM-334

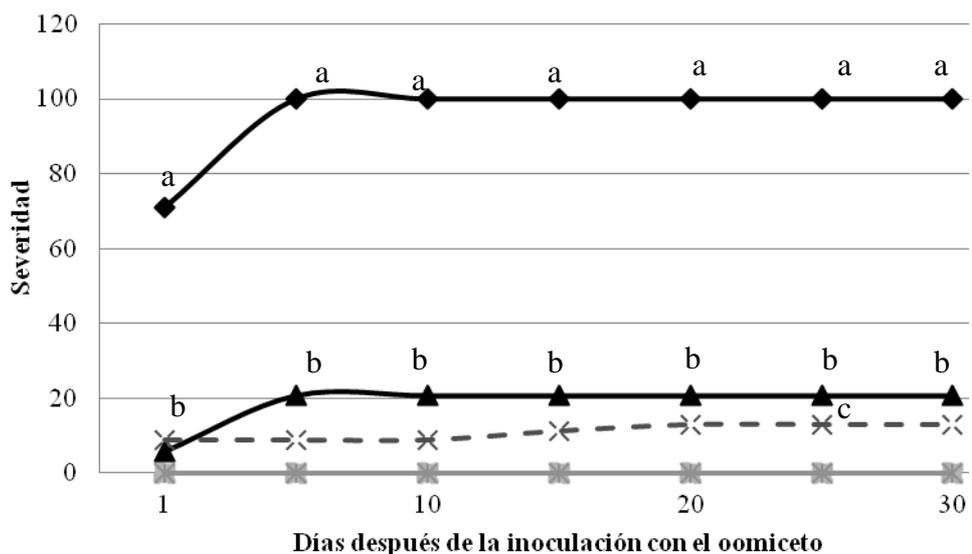
La acumulación de transcritos de PAL en las hojas del CM-334 sumergidas en la suspensión de zoosporas fue inducida a partir de las 2 hpio. En los tratamientos con zoosporas con o sin el nematodo (R+Na+Zi, R+Zi) la acumulación de transcritos fue mantenida hasta las 12 hpio (Fig. 15a). A las 6 hpio se observó un incremento de 1.5 veces en las hojas de plantas inoculadas con las zoosporas (R+Zi) con relación a las hojas de plantas infectadas con ambos patógenos (R+Na+Zi) (Fig. 15a). La acumulación de transcritos tuvo relación con la actividad de PAL, ya que se observó un incremento del 26.2% a las 6 hpio en las hojas de plantas resistentes inoculadas con zoosporas sin el nematodo (R+Zi) (Fig. 16a).

Actividad y acumulación de transcritos de PAL en las raíces del CM-334

En las raíces de plantas infectadas solo con zoosporas (R+Zi) el incremento en la acumulación de transcritos y en la actividad de PAL se observó a las 12 hpio (Fig. 15b y 16b). La acumulación de transcritos incrementó en un 1.9 veces a las 12 hpio con relación a las raíces de plantas infectadas con ambos patógenos (R+Na+Zi) (Fig. 16b). Asimismo, la actividad de PAL incrementó en un 52.3% a las 12 hpio en las raíces de plantas con zoosporas en comparación con las que estaban infectadas con el nematodo.



a



b

Fig. 13. Necrosis (cm) (a) y porcentaje de severidad (b) de las plantas del chile CM-334 infectadas con *Nacobbus aberrans* y el follaje inoculado por inmersión con una suspensión de zoosporas de *P. capsici*. S+Zi: Plantas susceptibles (var. Joe E. Parker) inmersas en la suspensión de zoosporas de *P. capsici*. S+i: plantas susceptibles inmersas en agua destilada estéril. R+Na+Zi: plantas resistentes (CM-334) inoculadas con *Nacobbus aberrans* (Na) e inmersas en la suspensión de zoosporas de *P. capsici*. R+Zi: plantas resistentes sin Na, inmersas en la suspensión de zoosporas de *P. capsici*. R+i: plantas resistentes inmersas en agua destilada estéril. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos por fechas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

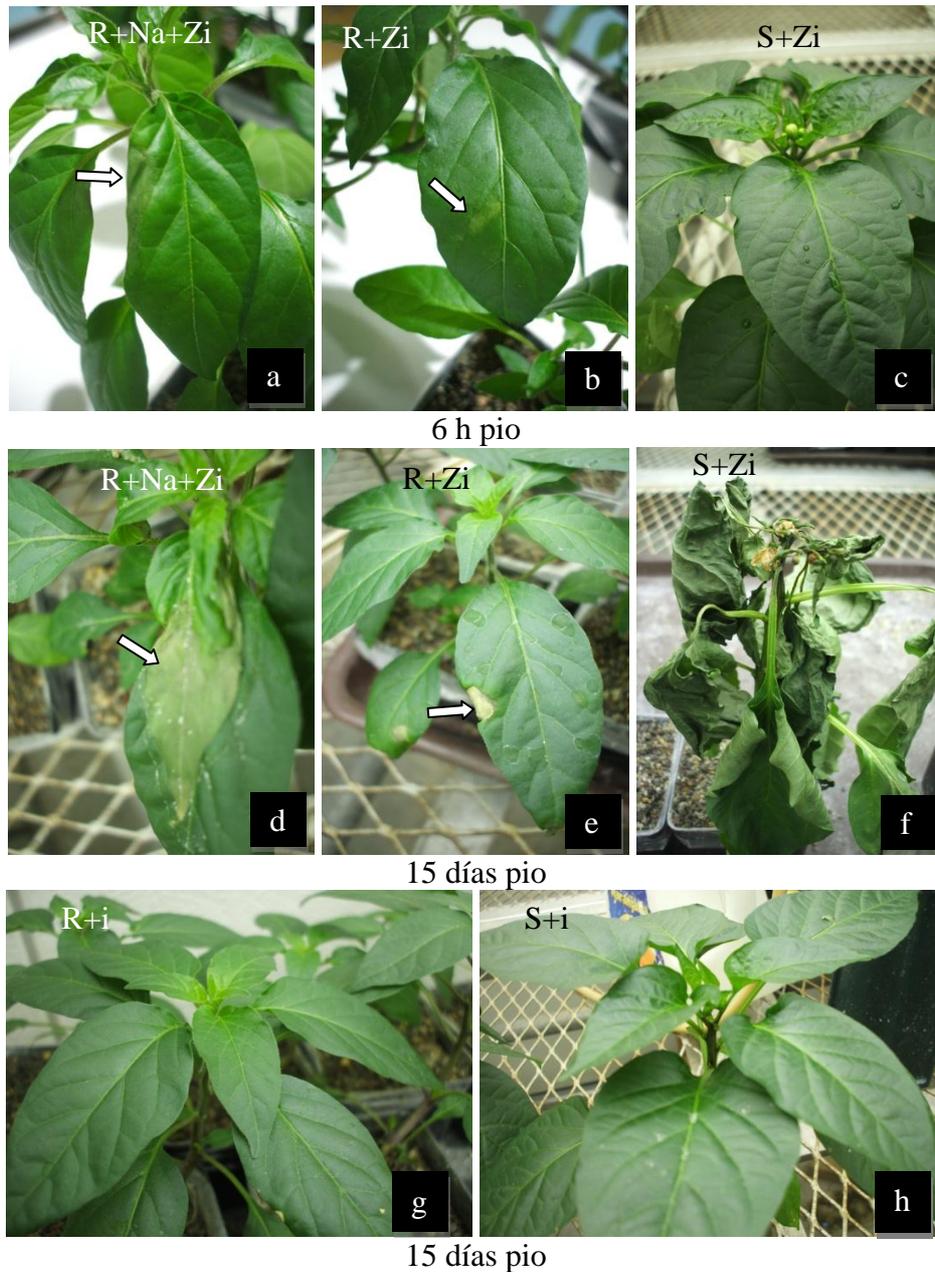


Fig. 14. Síntomas de las plantas del chile CM-334 infectadas con *Nacobbus aberrans* e inoculadas por inmersión en una suspensión de zoosporas de *P. capsici* a las 6 h y a los 15 días pio. Nótese la respuesta de hipersensibilidad a las 6 h pio y a los 15 días pio (flecha blanca) en las plantas infectadas con *P. capsici*. R+Na+Zi: plantas resistentes (CM-334) inoculadas con *Nacobbus aberrans* (Na) e inmersas en la suspensión de zoosporas de *P. capsici*. R+Zi: plantas resistentes sin Na, inmersas en la suspensión de zoosporas de *P. capsici*. R+i: plantas resistentes inmersas en agua destilada estéril. S+Zi: plantas susceptibles (var. Joe E. Parker) inmersas en la suspensión de zoosporas de *P. capsici*. S+i: plantas susceptibles inmersas en agua destilada estéril.

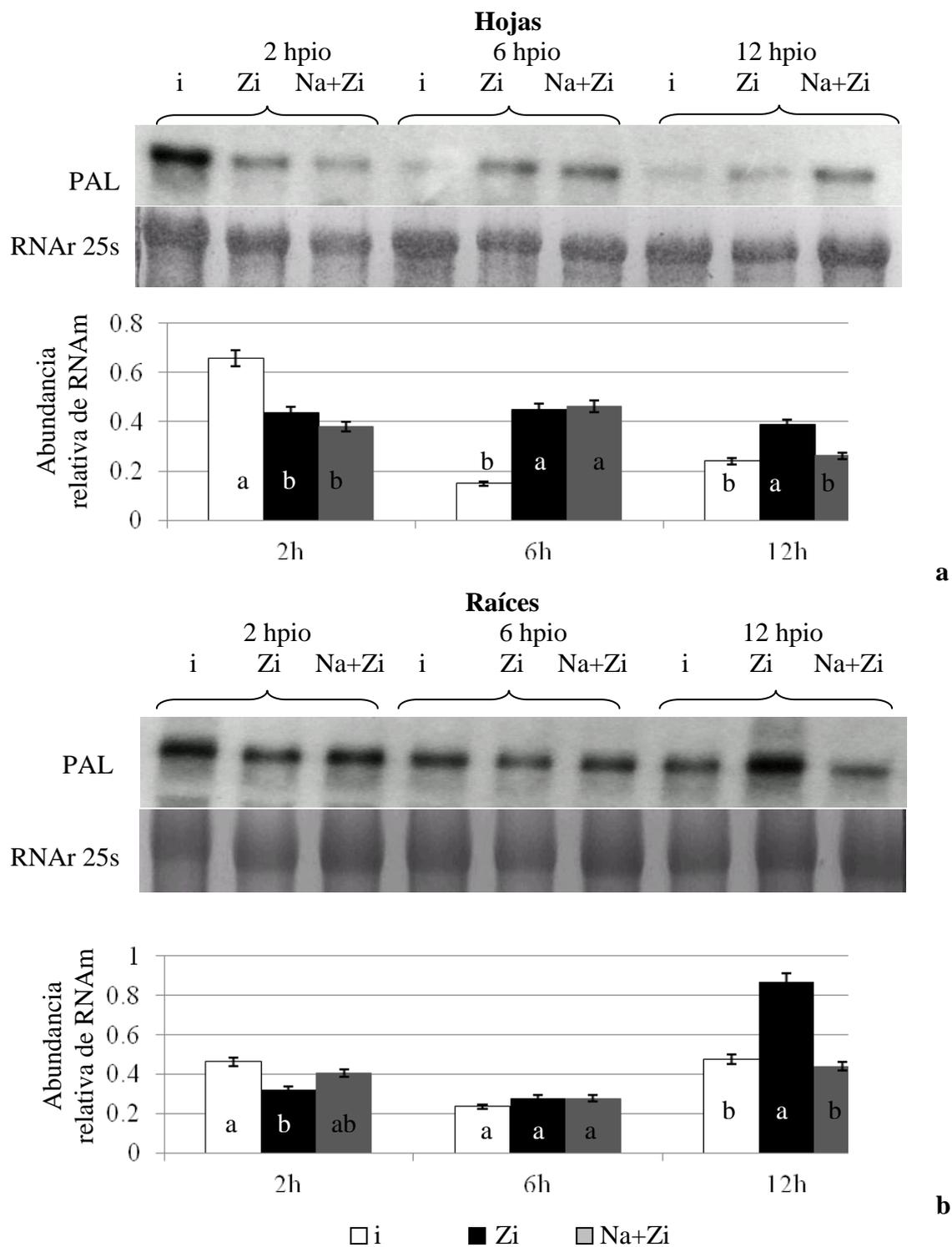


Fig. 15. Acumulación de transcritos de PAL en hojas (a) y raíces (b) del chile CM-334 infectado con *N. aberrans* (Na) y el follaje inoculado por inmersión con zoosporas de *P. capsici* (Zi), en presencia o ausencia de a las 2, 6 y 12 horas posteriores a la inoculación con el oomiceto (hpio). i: Plantas inmersas en agua, Zi: plantas resistentes inmersas e una

suspensión de zoosporas, Na+Zi: plantas resistentes infectadas con Na e inmersas en zoosporas. Resultado de tres extracciones diferentes analizadas con dos sondas diferentes de PAL. Letras diferentes muestran la diferencia significativa entre tratamientos por tiempo y estrato con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

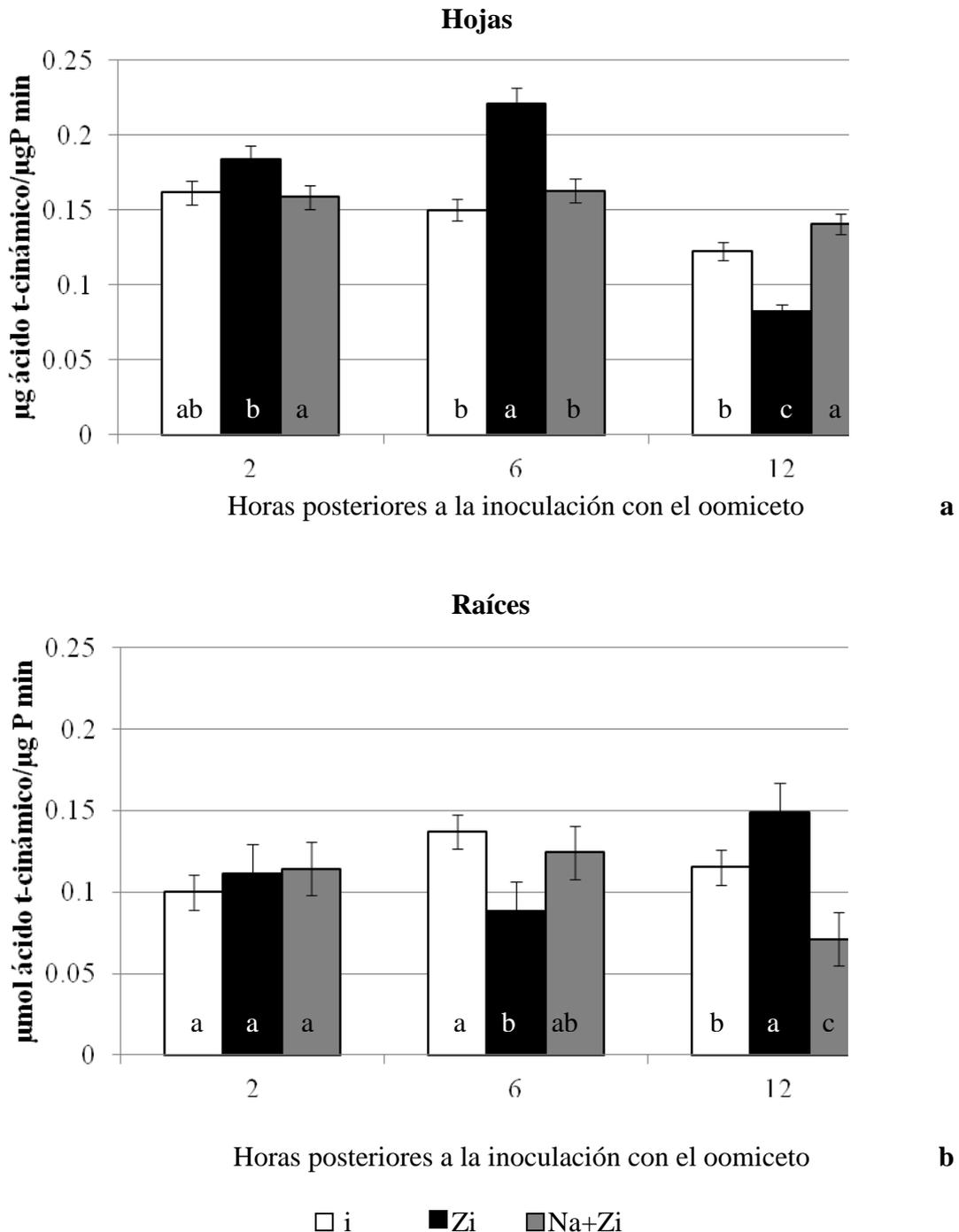


Fig. 16. Actividad de PAL en las hojas (a) y raíces (b) del chile CM-334 infectado con *N. aberrans* (Na) y el follaje inoculado por inmersión con una suspensión de zoosporas de *P. capsici* (Zi). La toma de muestra fue realizada a las 2, 6 y 12 horas posteriores a la inoculación con el oomiceto. i: Plantas resistentes inmersas en agua destilada estéril, Zi: plantas resistentes inmersas en una suspensión de zoosporas, Na+Zi: Plantas resistentes

infectadas con Na e inmersas en la suspensión de zoosporas. Valores promedio de tres extracciones con seis lecturas cada una (n=18). Letras diferentes muestran la diferencia significativa entre tratamientos por tiempo y estrato con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

Las lesiones en las plantas resistentes (Fig. 14) causadas por las zoosporas de *P. capsici* fueron de menor tamaño en comparación con las lesiones de las susceptibles (Fig. 14f). Las lesiones desarrolladas en las hojas del chile CM-334 podrían considerarse producto de una respuesta de hipersensibilidad microscópica, como lo reportan Ueeda y colaboradores (2006). En hojas de CM-334 se demostró que la aspersión con zoosporas produce una respuesta de hipersensibilidad a nivel microscópico acompañada de incrementos en los ácidos jasmónico y salicílico (Ueeda *et al.*, 2006). En hojas de CM-334 asperjadas con zoosporas, se observó a nivel microscópico una respuesta de hipersensibilidad que estuvo asociada con incrementos en el contenido de ácido jasmónico y salicílico (Ueeda *et al.*, 2006). En contraste, con la inoculación por inmersión en la suspensión de zoosporas, la reacción de hipersensibilidad (RH) fue macroscópica y ocurrió a las 6 hpio tanto en presencia como en ausencia del nematodo (Fig. 14 b y c).

La resistencia a *P. capsici* en CM-334 se ha relacionada con la acumulación de transcritos de *PAL* (Fernández-Pavia, 1997) y con una mayor actividad de la enzima (López-Martínez *et al.*, 2011); los resultados obtenidos en plantas del tratamiento R+Zi en el presente estudio, son congruentes con este reporte. En contraste, en las plantas inoculadas con ambos patógenos (R+Na+Zi) la acumulación fue menor (Fig. 15a y 15b). La disminución en la acumulación de transcritos y en actividad de *PAL* en el follaje de plantas inoculadas con ambos patógenos (R+Na+Zi), podría en parte explicar la presencia del oomiceto en las hojas hasta los 25 días posteriores a la inoculación con el oomiceto. Estos resultados sugieren que la presencia del nematodo abatió de manera sistémica la actividad de *PAL* en las plantas CM-334, sin embargo, tal abatimiento no fue de la magnitud suficiente para que las plantas mostraron susceptibilidad al oomiceto. Algo similar fue reportado por Villar-Luna y colaboradores (2009), quienes encontraron que en presencia del nematodo la reacción de hipersensibilidad foliar se retrasó de manera significativa en plantas CM-334 previamente infectadas con *N. aberrans*.

En las plantas las isoformas de PAL varían dependiendo de la especie (Butland *et al.*, 1998), por ejemplo *Arabidopsis* contiene cuatro isoformas de PAL (Rohde *et al.*, 2004; Ohl *et al.*, 1990,) y tres isoformas de 4-coumarato:CoA cuyos patrones de expresión varían (Ehlting *et al.*, 1999), estas isoformas de las enzimas funcionan en distintos metabolones, cada uno responsable de la producción de una clase de fenilpropanoides (Shirley 1996; Koes *et al.*, 1994; Stafford, 1990). Rhode *et al.*, (2004) y Raes *et al.*, (2003) mencionan que PAL1, PAL2 y PAL4 son importantes para la síntesis de lignina, mientras que PAL3 generalmente se relaciona con la síntesis de flavonoides (Ehlting *et al.*, 1999). En tabaco existen caracterizadas dos isoformas de PAL y solo la isoforma 1 es localizada en el retículo endoplasmático, PAL1 se asoció fuertemente con la enzima Coumarato 4-hidroxilasa (C4H) (Achnine *et al.*, 2002); metabolon relacionado con la síntesis de fenoles, los cuáles son tóxicos para *P. capsici* (Fernández-Pavía, 1997; Candela *et al.*, 1995).

La disminución en la actividad de PAL y fenoles solubles totales, entre ellos el ácido clorogénico, en las raíces del chile CM-334 infectadas con *N. aberrans* e inoculadas con zoosporas de *P. capsici* fue reportada con anterioridad por López-Martínez *et al.* (2011) y Godínez-Vidal *et al.* (2008). Probablemente al disminuir la actividad de PAL el contenido de ácidos fenólicos, que son tóxicos tanto para el nematodo (López-Martínez *et al.*, 2011) como para el oomiceto (Fernández-Pavía, 1997; Candela *et al.*, 1995), también disminuyó.

En esta investigación la infección de raíces de CM-334 por *N. aberrans*, se asoció con una reducción tanto en la acumulación de transcritos como de la actividad de PAL en plantas inoculadas foliarmente con *P. capsici*. Sin embargo, la reacción de hipersensibilidad no fue inhibida por la presencia del nematodo.

LITERATURA CITADA

- Achnine, L., Rasmussen, S., Blancaflor, E., and Dixon R. A. 2002. Metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway: physical associations between L-phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase. *In: Polyphenols Communications*. H Hadrami, ed. Imprimerie Papeteri el Watanya, 7–8 pp.
- Atkinson, J. 1994. Plant nematode interactions: Molecular and genetic basis. *In: pathogenesis and host-parasite specificity in plant disease: histological, biochemical, genetic and*

- molecular bases. Kohmoto, K., Singh, U., and Singh, R. Eds. Oxford, U. K. Pergamon Press. 355-369 p.
- Bernards, A. M. and Ellis, E. B. 1991. Phenylalanine ammonia-lyase from tomato cell cultures inoculated with *Verticillium albo-atrum*. *Plant Physiology* 97:1494-1500.
- Bonnet, J., Danan, S., Boudet, C., Barchi, L., Sage-Palloix, A. M., Caromel, B., Palloix, A., and Lefebvre, V. 2007. Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper? *Theoretical Applied Genetics* 115:253-264.
- Bowman, P., and Bloom, J. R. 1966. Breaking the resistance of tomato varieties of Fusarium wilt by *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology* 74:207-209.
- Butland, S., Chow, M., and Ellis, B. 1998. A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes expressed in pine trees and cell cultures. *Plant Molecular Biology* 37:15-24.
- Candela, M. E., Alcazar, M. D., Espin, A., Egea, C., and Almela, L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* items infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44:116-123.
- Chitwood, D. J., and Lusby, R. W. 1991. Metabolism of plant sterols by nematodes. *Lipids* 26:619-627.
- Cramer, C. L., Edwards, K., Dron, M., Liang, X., Dildine, S. L., Bolwell, G. P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., and Schuch, W. 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Molecular Biology* 12:367-383.
- Cramer, C. L., Weissenborn, D., Cottingham, K. C., Denbow, J. C., Eisenback, D. J., D., Radin, N., and Yu, X. 1993. Regulation of defense-related gene expression during plant pathogen interactions. *Journal of Nematology* 25:507-518.
- Crochrane, F. C., Davin, L. B., and Lewis, N. G. 2004. The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65:1557-1564.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.
- Djian-Caporalino, C., Pijarowski, L., Fazari, A., Samson, M., Gaveau, L., O'Byrne, C., Lefebvre, V., Caranta, C., Palloix, A., and Abad, P. 2001. High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci *Me3* and *Me4* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theoretical Applied Genetics* 103:592-600.

- Edwards, K., Cramer, C. L., Bolwell, G. P., Dixon, R.A., Schuch, W., and Lamb, C.J. 1985. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Biochemistry* 82:6731-6735.
- Ehltling, J., Buttner, D., Wang, Q., Douglas, C. J., Somssich, I. E., and Kombrink, E. 1999. Three 4-coumarate:coenzyme a ligase in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily distinct classes in angiosperms. *Plant Journal* 19:9–20.
- Egea, C., Alcazar, M. D., and Candela, M. E. 1996. Capsidiol: its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 98:737-742.
- Fernández-Pavia, S. P. 1997. Host-pathogen interaction in the root rot resistant *Phytophthora capsici*/*Capsicum annuum* CM-334 pathosystem. Ph. D. Thesis. New México State University, Las Cruces, New Mexico, USA. 109 p.
- Gil Ortega, R., Español P. C., and Zueco J. C. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line ‘SCM-334’. *Plant Breeding* 107:50-55.
- Glosier, R. B., Ogundiwin, A. E., Sidhu, S. G., Sischo, R. D., and Prince, P. J. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica* 162:23-30.
- Goddijn, M., Lindsey, K., Van der Lee, F., Klap, J., and Sijmons, P. 1993. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harboring promoter-gusA fusion constructs. *The Plant Journal* 4:863-873.
- Godínez-Vidal, D. 2010. Cambios en la ruta mevalónica como respuesta a la infección por *Nacobbus aberrans* en chile CM-334. Tesis de Doctorado. Posgrado en Fitosanidad. Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. México, México. 104 p.
- Godínez-Vidal, D., Rocha-Sosa, M., Sepúlveda-García B. E., Lara-Reyna J., Rojas-Martínez R., Zavaleta-Mejía E. 2008. Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology* 120:299-303.
- Godínez-Vidal, D. 2004. Relación de la enzima PAL con el rompimiento de Resistencia a *Phytophthora capsici* por *Nacobbus aberrans* en chile CM-334. Tesis de Maestría. Instituto de Fitosanidad. Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. México. 88 p.
- Guerrero-Moreno A., and Laborde J. A. 1980. Current status of pepper breeding for resistance to *Phytophthora capsici* in Mexico. Synopses of the IVth meeting of the *Capsicum* working group of Eucarpia I. V. T., Wageningen. The Netherlands. 52-56 p.

- Hahlbrock, K., and Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:347-369.
- Klessing, D., and Malamy, J. 1994. The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* 26:1439-1458.
- Koes, R. E., Quattrocchio, R., and Mol, J. N. M. 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *BioEssays* 16:123-132.
- Kotewicz, M., D'Alessio, J., Driftmier, K., Blodgett, K., and Gerard, G. 1985. Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* 35:249-258.
- Lawton, M. A., Dixon, R. A., Hahlbrock, K. and Lamb, C. J. 1983. Elicitor induction of mRNA activity: rapid effects of elicitor on phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA activities in bean cells. *European Journal of Biochemistry* 130:131-139.
- Longeman, J., Shell, J., and Willmitzer, L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plants tissues. *Analytical Biochemistry* 163:16-20.
- López-Martínez, N., Colinas-León, M. T., Peña-Valdivia, C. B., Salinas-Moreno, Y., Fuentes-Montiel, P., Biesaga, M., and Zavaleta-Mejía, E. 2011. 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 and Soil* 338:399-409.
- Nagai, N., Kitauchi, F., Shimosaka, M. and Okazaki, M. 1994. Cloning and sequencing of a full-length cDNA coding for phenylalanine ammonia lyase from tobacco cell culture. *Plant Physiology* 104:1091-1092.
- Niebel, A., Almeida, J., Tiré, C., Engler, G., Van Montagu, M., and Gheysen, G. 1993. Induction patterns of an extensin gene in tobacco upon nematode infection. *The Plant Cell* 5:1697-1710.
- Opperman, H., Taylor, G., and Conkling, M. 1994. Root-knot nematode-directed expression of a plant root specific gene. *Science* 263:221-223.
- 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 phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95:158-165.
- Pelligrini, L., Rohfritsch, O., Fritig, B., and Legrand, M. 1994. Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. Molecular cloning and gene expression during the hypersensitive reaction to

- tobacco mosaic virus and the response to a fungal elicitor. *Plant Physiology* 106:877-886.
- Piñol, M. T., y Palazon, J. 1996. Metabolismo Secundario. *En: Fisiología y Bioquímica Vegetal*. Azcon-Bieto, J., y Talon, M. Eds. McGraw Hill Interamericana de España, Madrid. 237-283 p.
- Raes, J., Rohde, A., Christensen, J. H., Van de Peer, Y., and Boerjan, W. 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133:1051-71.
- Redondo, J. E. 1985. Mecanismo de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici* Leo. Tesis de doctorado. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. Méx. 182 p.
- Reifschneider, F. J. B., Boiteux, S. L., Della Vecchia, T. P., Poulos, M. J., and Kuroda, N. 1992. Inheritance of adult-plant resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. *Euphytica* 62:45-49.
- Rohde, A., Morreel, K., Ralph, J., Goeminne, G., Hostyn, V., De Rycke, R., *et al.* 2004. Molecular phenotyping of the *Pall* and *Pal2* mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism. *The Plant Cell* 16:2749-71.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, second edition. Cold Spring Harbor, Laboratory Press. USA. Vol. 1, 2 y 3.
- Shufflebottom, D., Edwards, K., Wolfgang, S., and Bevan, M. 1993. Transcription of two members of a gene family encoding phenylalanine ammonia-lyase leads to remarkably different cell specificities and induction patterns. *The Plant Journal* 3: 835-845.
- Shirley, B. W. 1996. Flavonoid biosynthesis: “New” functions for an “old” pathway. *Trends Plant Science* 1:377–382.
- Sijmons, C. 1993. Plant nematode interactions. *Plant Molecular Biology* 23:917-931.
- Stafford, H. A. 1990. *Flavonoid Metabolism*. CRC Press, Boca Raton, FL. 269 p.
- Sy, O., Bosland, W. P., 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 for Horticultural Science* 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.
- Ueeda, 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.
- Vargas, E. Ma. T., Zavaleta-Mejía, E., y Hernández, A. A. M. 1996. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo., en Chile (*Capsicum annuum* L.) Serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26:159-166.
- Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R. I., Hernández-Anguiano, A. M., Gómez-Rodríguez, O., y Zavaleta-Mejía, E. 2009. Respuesta hipersensitiva en el follaje de Chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.
- Walker, J. S., and Bosland, W. P. 1999. Inheritance of *Phytophthora* root rot and foliar blight resistance in pepper. *Journal of American Society Horticultural Science* 124:14-18.
- Zavaleta-Mejía, E. 2002. Rompimiento de Resistencia a Hongos Fitopatógenos por Nematodos Fitoparásitos, una Hipótesis. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:118-122.