



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
FISIOLOGÍA VEGETAL

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y FENOLES SOLUBLES EN CHILE
(*Capsicum annum* L.) 'CM-334' DURANTE LA PÉRDIDA DE
RESISTENCIA A *Phytophthora capsici* INDUCIDA POR *Nacobbus
aberrans***

NOÉ LÓPEZ MARTÍNEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2007

**ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y FENOLES SOLUBLES EN CHILE (*Capsicum annum*
L.) 'CM-334' DURANTE LA PÉRDIDA DE RESISTENCIA A *Phytophthora capsici*
INDUCIDA POR *Nacobbus aberrans***

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y FENOLES SOLUBLES EN CHILE (*Capsicum annum* L.)
'CM-334' DURANTE LA PÉRDIDA DE RESISTENCIA A *Phytophthora capsici*
INDUCIDA POR *Nacobbus aberrans*

Noé López Martínez, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2007

El genotipo de chile CM-334 es resistente al oomiceto *Phytophthora capsici* (*Pc*), pero *N. aberrans* (*Na*) si esta presente inhibe su resistencia. Conocer los cambios metabólicos inducidos por *Na*, puede ayudar a entender el fenómeno de pérdida o inhibición de la resistencia. Así, se comparó la actividad enzimática de peroxidasas, fenilalanina amonio liasa (PAL), el contenido de fenoles solubles totales (FST) en plantas CM-334 inoculadas con cada patógeno y con la combinación de ambos; así como el contenido de ácido clorogénico en plantas de chile resistente (CM-334) y susceptible (J.E. Parker) al oomiceto inoculadas solamente con *Na*. En los muestreos realizados durante las 96 h posteriores a la inoculación con el oomiceto, generalmente en las plantas inoculadas con el oomiceto, la mayor actividad de peroxidasas, PAL y FST se registró en las plantas inoculadas únicamente con *Pc*; en cambio la mínima actividad correspondió a plantas inoculadas sólo con *Na* ($P \leq 0.05$). Las plantas inoculadas con ambos patógenos (*Na-Pc*) y las del testigo sin inocular (PSI) tuvieron un comportamiento similar ($P \leq 0.05$). Por otro lado, el contenido de ácido clorogénico en las plantas tanto de CM-334 como de J.E. Parker inoculadas con *Na*, fue significativamente menor que el de las plantas de ambos materiales de chile sin inocular. Los resultados obtenidos sugieren que la infección por *Na* reduce las respuestas de defensa a *P. c* en plantas de chile CM-334 y que por lo tanto la pérdida o inhibición de la resistencia a *P. capsici* inducida por *N. aberrans* puede en parte asociarse con una reducción en la actividad enzimática de las peroxidasas, la PAL, el contenido de fenoles solubles totales y de ácido clorogénico.

Palabras clave: Pérdida de resistencia, Peroxidasas, PAL, compuestos fenólicos, ácido clorogénico.

ENZYMATIC ACTIVITY AND TOTAL SOLUBLE PHENOLS IN CHILLI (*Capsicum annum* L.) 'CM-334' DURING THE RESISTENCE BREAKDOWN TO *Phytophthora capsici* INDUCED BY *Nacobbus aberrans*

Noé López Martínez, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2007

The genotype CM-334 of Chili (*Capsicum annuum*) is resistant to *Phytophthora capsici* (*Pc*), but *Nacobbus aberrans* (*Na*) if is present breaks down its resistance. To know the metabolic changes induced by *Na* can help to understand the phenomenon of break down to resistance. Therefore, it was compared peroxidase and L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activities and total soluble phenols (TSP) in chilli plants CM-334 inoculated with *N. aberrans*, alone or in combination with *P. capsici*, and chlorogenic acid concentration in resistant (CM-334) and susceptible (J.E. Parker) plants to *Pc* inoculated only with *Na*. At different evaluation times during 96 h after the inoculation with the oomycete, generally the highest POD and PAL activities, and the content TSP were registered in plants inoculated only with *Pc*, while the minimal activity corresponded to plants inoculated only with *Na* ($P < 0.05$). The non-inoculated plants and those with both pathogens had similar, intermediate behavior. Chlorogenic acid concentrations in CM-334 and J.E. Parker plants inoculated with *Na* were significantly lower than in non-inoculated. These results suggest that the infection by *N. aberrans* decreased defence to *P. capsici* in CM-334 chilli plants and therefore, resistance break down to *P. capsici* induced by *Na* can be associated with a reduction in peroxidase and PAL activities, the TSP and chlorogenic acid concentration.

Keywords: Resistance breakdown, Peroxidase, PAL, Phenol compounds, Chlorogenic acid.

Dedico esta tesis a:

Todas las personas que de una u otra manera han contribuido en mi formación, especialmente a mis padres.

Mi sobrina Alejandra por ser un ejemplo de superación.

Agradezco al pueblo de México que con sus impuestos, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

Mi más sincero agradecimiento a:

La Dra. Emma Zavaleta-Mejía, sin su calidad humana y brillante actitud científica no hubiera sido posible esta investigación. Su actitud profesional y sensibilidad siempre será un ejemplo para quienes hemos tenido el honor de ser sus estudiantes.

La Dra. Cecilia Peña Valdivia, por su siempre amable disposición y valiosas recomendaciones que sin duda fueron de gran apoyo durante el transcurso de mi investigación.

La Dra. Yolanda Salinas Moreno por su apoyo incondicional en la última fase de investigación.

Agradezco profundamente al Dr. Benito Reyes Trejo y la Dra. Teresa Colinas León por ser las primeras personas que me involucraron en el área de la investigación, y por contribuir en mi formación desde la licenciatura.

Al Dr. José Alfredo Carrillo Salazar por su orientación y valiosos consejos durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo y al INIFAP, por permitirme realizar en sus instalaciones parte de esta investigación.

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

CONTENIDO

| | Página |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 5 |
| <i>Phytophthora capsici</i> | 5 |
| Mecanismos de resistencia a <i>Phytophthora capsici</i> en el genotipo de chile CM-334..... | 6 |
| Resistencia de CM-334 a nemátodos..... | 8 |
| Nemátodos fitoparásitos involucrados en la inhibición o pérdida de la resistencia..... | 9 |
| Respuestas moleculares del hospedante a la invasión por nemátodos fitoparásitos..... | 10 |
| Mecanismos de protección bioquímica en las plantas | 13 |
| Ruta de los fenilpropanoides..... | 13 |
| Peroxidasas..... | 18 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| Establecimiento de las plantas de chile..... | 21 |
| Preparación del inóculo e inoculación con <i>N. aberrans</i> | 21 |
| Preparación del inóculo e inoculación con <i>P. capsici</i> | 22 |
| Establecimiento de los ensayos..... | 23 |
| Ensayo 1: Actividad enzimática y contenido de fenoles solubles totales durante las 96 h posteriores a la inoculación con <i>P. capsici</i> | 23 |
| Ensayo 2: Actividad enzimática y contenido de fenoles solubles totales en diferentes estratos de plantas de chile seis horas después de la inoculación | 24 |
| Ensayo 3: Cuantificación de ácido clorogénico en plántulas de chile resistente y susceptible a <i>P. capsici</i> inoculadas con <i>N. aberrans</i> | 24 |
| Extracción de proteínas y cuantificación de la actividad enzimática de las peroxidasas..... | 25 |
| Extracción de proteínas y cuantificación de la actividad enzimática de PAL... | 26 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Cuantificación de fenoles solubles totales..... | 27 |
| Identificación y cuantificación de ácido clorogénico..... | 27 |
| Análisis estadístico..... | 28 |
| IV. RESULTADOS..... | 29 |
| Actividad de peroxidasas..... | 29 |
| <i>Ensayo 1</i> | 29 |
| <i>Ensayo 2</i> | 34 |
| Actividad de la fenilalanina amonioliasa (PAL)..... | 35 |
| <i>Ensayo 1</i> | 35 |
| <i>Ensayo 2</i> | 37 |
| Contenido de fenoles solubles totales | 39 |
| <i>Ensayo 1</i> | 39 |
| <i>Ensayo 2</i> | 43 |
| Contenido de ácido clorogénico en plantas de chile resistente y susceptible a <i>P. capsici</i> inoculadas con <i>N. aberrans</i> | 43 |
| V. DISCUSIÓN..... | 45 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 51 |
| VII. LITERATURA CITADA..... | 52 |
| APÉNCIDE..... | 63 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1. Ruta de biosíntesis de productos fenilpropanoides derivados de fenilalanina..... | 15 |

LISTA DE CUADROS

| | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Cuadro 1. Actividad de peroxidasas (μMoles de tetraguaiacol mg^{-1} de proteína min^{-1}) en plantas de chile (<i>Capsicum annum</i>) sin inocular (Control) e inoculadas con <i>N. aberrans</i> (<i>Na</i>), <i>P. capsici</i> (<i>Pc</i>) y ambos patógenos (<i>Na-Pc</i>). Las determinaciones se realizaron durante las primeras 96 h posteriores a la inoculación con <i>P. capsici</i> . La inoculación con el oomiceto se realizó 21 días después de la inoculación con <i>N. aberrans</i> | 31 |
| Cuadro 2. Actividad de PAL (nMoles de ácido <i>trans</i> -cinámico μg^{-1} de proteína min^{-1}) en plantas de chile (<i>Capsicum annum</i>) sin inocular (Control) e inoculadas con <i>N. aberrans</i> (<i>Na</i>), <i>P. capsici</i> (<i>Pc</i>) y ambos patógenos (<i>Na-Pc</i>). Las determinaciones se realizaron durante las primeras 96 h posteriores a la inoculación con <i>P. capsici</i> . La inoculación con el oomiceto se realizó 21 días después de la inoculación con <i>N. aberrans</i> | 38 |
| Cuadro 3. Contenido de fenoles solubles totales en plantas de chile (mg^{-1} de ácido tánico g^{-1} de residuo seco) inoculadas con <i>N. aberrans</i> (<i>Na</i>), <i>P. capsici</i> (<i>Pc</i>), con ambos patógenos (<i>Na-Pc</i>) y en plantas sin inocular (Control). Las determinaciones se realizaron a diferentes tiempos después de la inoculación con <i>P. capsici</i> . La inoculación con el oomiceto se realizó 21 días después de la inoculación con <i>N. aberrans</i> | 42 |
| Cuadro 4. Contenido de ácido clorogénico (μg de ácido clorogénico g^{-1} de materia fresca) en raíz, tallo y hojas de plantas de chile CM-334 y J.E. Parker, resistente (R) y susceptible (S) a <i>P. capsici</i> , respectivamente, e inoculadas (I) y sin inocular (SI) con <i>N. aberrans</i> | 44 |

I. INTRODUCCIÓN

Como otros cultivos, el chile (*Capsicum annum* L.) es susceptible a diversos patógenos que causan pérdidas en la producción, siendo la pudrición radical y el marchitamiento provocado por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leonina es una de las enfermedades más destructivas (Black *et al.*, 1991; Mozzeti *et al.*, 1995). El genotipo de chile, “tipo serrano”, llamado Criollo de Morelos (CM-334) ha mostrado resistencia a todas las cepas patogénicas de *P. capsici* probadas (Alcantara y Bosland, 1994). Sin embargo, se ha consignado que las plantas de chile CM-334 resistentes se comportan como susceptibles a *P. capsici* cuando previamente han sido infectadas por el nemátodo agallador de raíces *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, esta respuesta es conocida como rompimiento (o inhibición o pérdida) de la resistencia (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo *et al.*, 2005).

En algunas variedades de chile, la resistencia a *P. capsici* está asociada a la actividad de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL, por sus siglas en inglés phenylalanine ammonia-lyase), y a mayor actividad de PAL mayor resistencia al oomiceto (Mozzeti *et al.*, 1995; Fernández-Pavía, 1997). La PAL es una enzima clave en la síntesis de los fenilpropanoides. En esta ruta se sintetizan metabolitos secundarios, con diversas funciones en las plantas, como la protección mediante la síntesis de lignina, que participa en el fortalecimiento de la pared celular, compuestos con actividad antimicrobiana (ácidos fenólicos, coumarinas y fitoalexinas isoflavonoides), y mensajeros secundarios, como el ácido salicílico (Anterola y Lewis, 2002; Shadle *et al.*, 2003; Gómez-Vásquez *et al.*, 2004; Nugroho *et al.* 2002). Los compuestos fenólicos que se forman a través de esta ruta metabólica se convierten en formas más reactivas por la oxidación que sufren a causa de la actividad de las enzimas peroxidasa y polifenol oxidasa (Gómez-Vásquez *et al.*, 2004).

Se tiene evidencia experimental de la represión de la expresión del gen *PAL*, que codifica para la síntesis de PAL, por el nemátodo agallador *Meloidogyne incognita* (Goddijn *et al.*, 1993). En contraste con lo anterior, el mismo nemátodo agallador

estimula la expresión del gen *hmg 2*, responsable de codificar una de las enzimas, la hidroximetil-glutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa), clave para la síntesis de esteroides (Cramer *et al.*, 1993). La importancia de esta estimulación, radica en el hecho de que el nemátodo es incapaz de sintetizar sus propios esteroides y por lo tanto, es totalmente dependiente de su hospedante para obtenerlos (Chitwood y Lusby, 1991). En relación con esto, se ha señalado que también los esteroides ejercen un profundo efecto en el ciclo de vida de *Phytophthora* spp., incluyendo a *Phytophthora capsici*. Los esteroides estimulan su crecimiento y su reproducción sexual y asexual (Elliot, 1983).

Se han realizado algunas investigaciones tendientes a explicar la resistencia de CM-334 a *P. capsici*. Así, Fernández-Pavía (1997), al inocular con *P. capsici* plantas de CM-334 y una susceptible a la marchitez, determinó que la expresión del gen *PAL* en CM-334 fue más rápida que en el cultivar de Chile susceptible y que la actividad de HMGCoA reductasa fue mayor en las plantas susceptibles. Con base en estos antecedentes Zavaleta-Mejía (2002) planteó la hipótesis de que el rompimiento de la resistencia a *P. capsici* en CM-334 por *N. aberrans* se debe, en parte, a un incremento de la actividad de la HMGCoA reductasa y a una reducción de la actividad de la *PAL*, debidos a la estimulación y represión respectivas de los genes que las codifican.

Para dar sustento a esta hipótesis, Godínez-Vidal *et al.* (2007) compararon la actividad de la *PAL* del genotipo de Chile CM-334, sin inocular e inoculadas con cada uno de los patógenos por separado y con la combinación *N. aberrans*-*P. capsici*, y encontraron que la actividad de la *PAL* fue menor en las plantas inoculadas solo con el nemátodo, en comparación con el testigo no inoculado, y que la máxima reducción (48%), con respecto al testigo, se alcanzó después de 21 días de la inoculación. En las plantas inoculadas únicamente con *P. capsici* hubo mayor actividad de la *PAL* que en aquellas inoculadas solo con el nemátodo o con ambos patógenos y las no inoculadas (testigos). Lo anterior sustenta la idea de que la inhibición de la

resistencia a *P. capsici* por *N. aberrans* en CM-334, puede deberse en parte a una reducción de la actividad enzimática de la PAL inducida por *N. aberrans*.

Diferencias en la actividad de las peroxidasas acídicas también han sido asociadas con la resistencia a *P. capsici* (Fernández-Pavia, 1997). Al respecto se conoce que las peroxidasas forman parte de los mecanismos de resistencia al ataque de patógenos, por un lado participando en el fortalecimiento de la pared celular al catalizar el último paso de la biosíntesis de lignina, y por otro generando especies activas de oxígeno como parte del estrés oxidativo en interacciones incompatibles planta-patógeno (Anterola y Lewis, 2002; Boudet, 2000; Hiraga *et al.*, 2001.) Además, también participan en la oxidación de compuestos fenólicos que generalmente resulta en la producción de quinonas (Thipyapong *et al.*, 1995), compuestos altamente tóxicos generadores de especies activas de oxígeno. En el caso particular de la interacción *Meloidogyne* spp.-*Capsicum annum* CM334 se sugiere que los compuestos fenólicos, particularmente el ácido clorogénico, pueden estar relacionados con la resistencia de CM334 a *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* (Pegard *et al.*, 2005). En relación con esto, se ha señalado que el ácido clorogénico en su forma oxidada puede inhibir la actividad de *M. incognita* y probablemente afecta su respiración (Huang y Rhode, 1973).

La información concerniente a la actividad de la PAL y su relación probable con la inhibición de la resistencia a *P. capsici* por *N. aberrans* en el chile CM-334 es escasa; se desconoce la dinámica tanto de la actividad de las enzimas peroxidasas y PAL, como de la acumulación de fenoles solubles totales posteriores a la inoculación de plantas CM-334 con el nemátodo y/o el oomiceto. Además es necesario generar evidencia experimental que indique si el contenido de ácido clorogénico podría estar involucrado en la pérdida de la resistencia debido a la presencia del nemátodo. El conocimiento de los cambios metabólicos inducidos por el nemátodo en el hospedante, mismos que le permiten al oomiceto desarrollarse exitosamente en la planta resistente, es relevante, ya que puede ayudar a entender el fenómeno de inhibición o pérdida de la resistencia.

Con base en estos antecedentes y con la finalidad de contribuir al esclarecimiento del fenómeno de rompimiento o pérdida de la resistencia a *P. capsici* inducida por *N. aberrans*, la presente investigación tuvo por objetivos:

1. Conocer si en presencia del nemátodo, *N. aberrans*, la actividad enzimática de las peroxidasas y la PAL, y el contenido de fenoles solubles totales se altera en plantas de chile CM-334 inoculadas con *P. capsici*.
2. Comparar el contenido de ácido clorogénico en plantas de chile resistente y susceptible a *P. capsici* inoculadas con *N. aberrans*.

En el presente trabajo se probó la siguiente hipótesis: la pérdida o inhibición de la resistencia a *P. capsici* en plantas de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans* esta relacionada con la alteración del metabolismo de los compuestos fenólicos

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Phytophthora capsici

Phytophthora capsici pertenece a la familia Pythiaceae, orden Peronosporales, y clase Oomycetes. Los Oomycetos han sido colocados dentro del reino Stramenopila (Chromista). Están más relacionados con las algas que con los hongos verdaderos. *Phytophthora capsici* produce esporangios asexuales, zoosporas biflageladas, oosporas sexuales y su micelio carece de septas, es decir es cenocítico; además se distingue de otras especies de *Phytophthora* por presentar esporangio ancho, pedicelo largo, esférico y con una base delgada (Aragaki y Uchida, 2001).

Phytophthora capsici tiene una distribución geográfica amplia, es el agente causal de la marchitez del chile (*Capsicum* spp.) y puede infectar cualquier estructura en cualquier fase del desarrollo de la planta. Las plantas infectadas comúnmente muestran pudrición en la base del tallo, acompañada con una mancha color castaño oscuro y el follaje se torna amarillo hasta llegar al marchitamiento (Gayoso *et al.*, 2004). El marchitamiento avanza por el tallo principal y finalmente las plantas susceptibles mueren (Egea *et al.*, 1996).

El oomiceto *P. capsici* crece en un intervalo de temperatura de 10 a 36°C y su rango de temperaturas óptimas es de 24 a 33°C (Aragaki y Uchida, 2001). En México su importancia es mayor en las zonas donde se presenta temporal con lluvias intensas. En Delicias, Chihuahua y la Huasteca, *P. capsici* es un factor que limita la producción del cultivo de chile; también, se ha registrado en la comarca Lagunera, donde los daños causados no han sido documentados (Sandoval, 1993; Ramírez, 1998) y en Papantla, Veracruz, los daños alcanzaron hasta el 80% en los cultivares de chile tipo jalapeño (Hernández *et al.*, 1991). Los estudios realizados por Cardona (1985), sobre siniestros de plagas y enfermedades en la producción de chile del estado de Zacatecas, demostraron que la incidencia, localización y nivel de afección por *P. capsici* provoca los daños más cuantiosos a la economía de los productores de chile.

Mecanismos de resistencia a *P. capsici* en el genotipo de chile CM-334

Los mecanismos que pueden estar involucrados en la resistencia a *P. capsici* han sido estudiados en varios cultivares de chile resistentes (Kim y Kook, 1994; Mozzeti *et al.*, 1995; Fernández-Pavía, 1997; Gayoso *et al.*, 2004). En la interacción de *C. annuum* con *P. capsici* la resistencia probablemente se debe a la reacción de hipersensibilidad que ocurre a nivel del tallo, donde la infección parece ser detenida debido a la inhibición del crecimiento del oomiceto (Alcázar *et al.*, 1993; Candela *et al.*, 1995). Sin embargo, de acuerdo con Fernández-Pavía (1997), en el caso del cultivar de chile CM-334 la resistencia a *P. capsici* se presentó en la raíz y aún cuando el oomiceto penetró y fue reaislado del primer centímetro apical de la raíz, el desarrollo de la lesión en las raíces laterales se detuvo en los primeros 5 cm, a partir del ápice, 72 horas después de la inoculación. En la raíz de CM-334 se registraron cambios cuantitativos y cualitativos en el contenido de fenoles (Fernández-Pavía, 1997).

Esos resultados proveen alguna evidencia que soporta a la hipótesis de que la resistencia a *P. capsici* en CM-334 se localiza en la raíz, es de naturaleza bioquímica y expresada durante la colonización; descartándose la posibilidad de que la resistencia se deba a barreras físicas. Resultados similares a los de Fernández-Pavía (1997) fueron obtenidos por Candela *et al.* (1995), y Egea *et al.* (1996), con el cultivar de chile Smith-5, resistente a *P. capsici*, la inhibición del crecimiento del oomiceto en este cultivar se asoció con la acumulación de ácidos fenólicos y capsidiol (Candela *et al.*, 1995; Egea *et al.*, 1996).

Por otro lado, se tiene el reporte de que el follaje de plantas CM-334 es susceptible *P. capsici* y que la resistencia al oomiceto solamente se expresa en la raíz (Fernández-Pavía, 1997; Walker, 1997). Así en CM-334 la resistencia a *P. capsici* en el follaje y la raíz parecen estar controlada por diferentes genes (Walker, 1997); aparentemente dos mecanismos diferentes están confiriendo la resistencia, uno a la raíz y el otro al follaje (Walker, 1997). Sin embargo, en un estudio reciente, al comparar la respuesta del material susceptible California Wonder (CW) con la

presentada por CM-334 a la inoculación con *P. capsici* en el follaje, se observó que la invasión de las hifas en la hoja fue más lenta en el material resistente, el micelio fue identificado en la cutícula de la hoja a las 48 horas después de la inoculación, mientras que en el material susceptible la germinación de zoosporas e invasión posterior del micelio en la hojas ocurrió entre las 8 y 12 horas después de la inoculación (Ueeda *et al.*, 2006). Los autores proponen que este comportamiento probablemente se deba a diferencias en la morfología de la planta, pues CM-334 presenta tricomas pubescentes en toda la planta que pueden restringir la habilidad del patógeno a adherirse fácilmente al tejido del hospedante. Además, en las plantas susceptibles hubo muerte celular a las 24 horas después de la inoculación con el oomiceto, manifestándose una mancha de color café oscuro, mientras que en las hojas de CM-334 solamente se observaron algunas células con la coloración oscura, 48 horas después de la inoculación con *P. capsici*, y finalmente se detuvo la invasión celular por el micelio. El cambio de coloración en CM-334 estuvo acompañado de un incremento en el contenido de ácido jasmónico, inmediatamente después de la inoculación con el oomiceto, y cuando disminuyó su contenido, se incrementó el nivel de ácido salicílico e inmediatamente hubo respuesta hipersensitiva (Ueeda *et al.*, 2006). Esta discrepancia podría resolverse con estudios en los que se evalúe el comportamiento del follaje del material resistente CM-334, inoculado con *P. capsici*, y que permitan conocer con mayor profundidad cuáles son los mecanismos involucrados en la respuesta y contrastarlos con los de la raíz.

Fernández-Pavía (1997) encontró que una vez que el oomiceto penetró las raíces de CM-334, el nivel de mRNA que codifica para la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL) se incrementó en comparación con el cultivar susceptible. Tal incremento en el nivel de mRNA se asoció con cambios cuantitativos y cualitativos de los fenoles en el chile resistente y algunos compuestos fenólicos que estuvieron presentes en las raíces del material resistente inhibieron el crecimiento *in vitro* de *P. capsici*. En el mismo estudio, Fernández-Pavía (1997) evaluó el efecto de diferentes ácidos fenólicos comerciales en el crecimiento *in vitro* de *P. capsici* encontrando que el mayor y menor porcentaje de inhibición se obtuvo con el ácido t-cinámico y p-

coumarico, respectivamente. Lo anterior sugiere que el ácido t-cinámico podría encontrarse en mayor cantidad en las raíces del cultivar resistente, ser más tóxico para el patógeno o ambas posibilidades. Fernández-Pavía (1997) también encontró que la actividad de las peroxidasas acídicas fue mayor en las plantas de CM-334 que en las susceptibles.

Resistencia de CM-334 a nemátodos

Las plantas de Chile CM-334 son susceptibles al nemátodo *Nacobbus aberrans* (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes, 2005) pero resistentes a *Meloidogyne* spp (Pegard *et al.*, 2005). Pegard *et al.* (2005) encontraron que CM-334 es resistente a *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*, aunque el nivel de resistencia varió en dependencia de la especie de *Meloidogyne*. Con base en los resultados de su estudio, estos autores concluyen que CM-334 tiene por lo menos dos tipos de resistencia a *Meloidogyne* spp., uno que reprime la penetración de las larvas en su segundo estadio (J₂) al sistema radical y otro que bloquea el desarrollo después de la penetración. En el primer caso las larvas de *M. arenaria* fueron reconocidas rápidamente y la penetración se detuvo en la epidermis; esto podría ser evidencia de la presencia de barreras físicas. Por otro lado los estadios J₂ de *M. javanica* y *M. incognita* que lograron penetrar no llegaron al cilindro vascular de la raíz, fueron confinadas en la corteza, no se desarrollaron, murieron y no formaron células gigantes; esto indica que en esas regiones anatómicas del sistema radical del genotipo de Chile CM-334, existe un mecanismo bioquímico de protección capaz de bloquear la migración, desarrollo y reproducción del nemátodo. Aun más, los J₂ fueron rodeadas por células necróticas, lo que se considera una respuesta clásica de hipersensibilidad (Pegard *et al.*, 2005). Los mismos autores también, sugieren que los compuestos fenólicos, especialmente el ácido clorogénico podría estar involucrado en la resistencia del material de Chile CM-334 a *Meloidogyne* spp., debido a que las raíces inoculadas con diferentes especies de *Meloidogyne* contenían 59 veces más ácido clorogénico por gramo de tejido que el tejido no inoculado y siete veces más que el tejido del cultivar susceptible inoculado.

La información que se tiene actualmente sobre la interacción entre el cultivar de chile CM-334 y el nemátodo agallador de raíces *Nacobbus aberrans* señala que la actividad de la enzima PAL, de plantas del CM-334 inoculadas con *N. aberrans*, permaneció baja durante casi todo el periodo de evaluación de 21 días, en comparación con las no inoculadas (Godínez-Vidal *et al.*, 2007). Por lo anterior se ha sugerido que el nemátodo podría ser responsable de la inhibición de la expresión del gen correspondiente y por lo tanto de la reducción de la actividad de la enzima (Godínez-Vidal *et al.*, 2007).

Nemátodos fitoparásitos involucrados en la inhibición o pérdida de la resistencia

Los nemátodos que frecuentemente se han asociado con el fenómeno de pérdida de la resistencia, como los agalladores de las raíces (*Meloidogyne* spp. y *Nacobbus* spp.) y los formadores de quistes (*Globodera* spp. y *Heterodera* spp.), se caracterizan por inducir en sus hospedantes la formación de estructuras especializadas para su alimentación (células gigantes o sincitios) (Jones, 1981; Goddijn *et al.*, 1993; Sijmons, 1993; Williamson y Hussey, 1996). La formación de estas estructuras resulta de la interacción compleja entre el patógeno y la planta hospedante, en la cual el nemátodo altera los patrones de expresión génica de las células vegetales destinadas a la alimentación del nemátodo (Sijmons, 1993; Zavaleta-Mejía, 2002).

Los juveniles de segundo estadio (J_2) de los nemátodos formadores de agallas son atraídas a la zona de elongación, donde penetran la raíz, y entonces migran intercelularmente, mientras separan la lámina media entre las células del tejido cortical. Este proceso parece requerir fuerza mecánica y secreciones enzimáticas del nemátodo. En *Arabidopsis*, los J_2 migran del ápice de la raíz, de alrededor de la región del meristemo apical, hacia la zona de diferenciación, ahí en respuesta a las señales del nemátodo, las células procambiales adyacentes a la cabeza del

nemátodo son transformadas a células gigantes, y obtienen nutrientes del floema vía simplasto (Williamson y Hussey, 1996).

Nacobbus aberrans se distingue por su marcado dimorfismo sexual y por las hembras obesas. Las hembras en su ciclo de vida presentan cuatro estadios juveniles y uno adulto migratorio. Los juveniles del tercero y cuarto estadio (J_3 y J_4) se encuentran enrollados en el interior de las raíces y son relativamente inactivos, a diferencia de los juveniles del segundo estadio (J_2) que son migratorios activos. La hembra se convierte en sedentaria una vez que ha inducido un sitio especializado de alimentación, produce una matriz gelatinosa que es atrayente de los machos y en la cual deposita sus huevos después de la fertilización (Inserra *et al.*, 1983; Del Prado-Vera, 1985).

Respuestas moleculares del hospedante a la invasión por nemátodos fitoparásitos

Los complejos cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren durante el desarrollo de los sitios de alimentación por los nemátodos, son el reflejo de la alteración de la expresión génica en el hospedante (Sijmons, 1993; Atkinson, 1994; Niebel *et al.*, 1994). Las respuestas moleculares del hospedante incluyen las inducidas por el daño mecánico o estrés provocado por la infección por el nemátodo, así como las dirigidas a la iniciación y mantenimiento de los sitios de alimentación. Muchos de los genes involucrados en las respuestas son miembros de familias de genes con regulación compleja, por lo que, es difícil de interpretar su regulación (Williamson y Hussey, 1996). También, los niveles de algunas hormonas vegetales son alterados en raíces infectadas por nemátodos agalladores, tales como auxinas, etileno y citocininas. Muchos de los cambios que ocurren en las raíces cuando son infectadas por nemátodos como *Meloidogyne* también son inducidos con la aplicación de auxinas en la raíz, esos cambios incluyen la endoduplicación, alargamiento celular, rompimiento de la pared celular y formación de raíces laterales (Godelieve y Fenoll, 2002). Las auxinas inducen la síntesis de la enzima 1-amino ciclopropano-1-

carboxílico sintasa (ACC), clave en la biosíntesis del etileno (Goverse *et al.*, 2000). El etileno juega un papel importante en la formación de quistes e induce la degradación de pared celular (Goverse *et al.*, 2000). El etileno también puede modificar la forma de la célula, como resultado de cambios en el citoesqueleto (Shibaoka, 1994). En el caso de las citocininas el mecanismo de acción en la formación de los sitios de alimentación para los nemátodos, ha sido poco estudiado, y lo que se conoce al respecto es que altos niveles de citocininas se correlacionan con la susceptibilidad de la planta a nemátodos agalladores, además se sabe que *Meloidogyne* spp. es capaz de producir citocininas (Kochba y Samish, 1972; Bird y Loveys 1980).

En cuanto a la alteración de la expresión génica del hospedante, se tiene evidencia que en raíces de jitomate en las que se estimuló la expresión de genes relacionados con el sistema de protección de la planta, 12 horas después de la inoculación con nemátodos agalladores, los genes activados involucrados en la "protección", fueron los que codifican para las peroxidasas, quitinasas, lipogenasas, extensina e inhibidores de proteasas (Williamson y Hussey, 1996; Godelieve y Fenoll, 2002). También, en jitomate, después de inocular el sistema radical con *Meloidogyne incognita* y *M. hapla*, se indujo la expresión del gen *hmg2* que codifica para la enzima hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCóA reductasa); esta enzima cataliza la biosíntesis de fitoesteroles y fitoalexinas sesquiterpenoides, (Cramer *et al.*, 1993). Al respecto, se conoce la existencia de familias de genes que codifican para la síntesis de HMGCóA reductasa, la expresión de ellos depende de los factores ambientales, entre otros, del estrés causado por patógenos; en jitomate la expresión del gen *HMG 1* llevó a la síntesis de esteroles, mientras que la expresión del *HMG 2* a la síntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas y se activa cuando la planta está herida o infectada (Weissenborn, *et al.*, 1995). La importancia de esta estimulación, radica en el hecho de que el nemátodo es incapaz de sintetizar sus propios esteroles y por lo tanto, es totalmente dependiente de su hospedante para obtenerlos (Chitwood y Lusby, 1991). En relación con esto, se ha señalado que también los esteroles ejercen un profundo efecto en el ciclo de vida de *Phytophthora* spp. que incluye a

Phytophthora capsici; además, los esteroides son necesarios para su crecimiento y reproducción, sexual y asexual (Elliot, 1983).

Por otro lado, en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con *M. incognita* y *Heterodera schachtii*, hubo un decremento en la expresión del gen que codifica la enzima PAL (Godijn *et al.*, 1993). Así, la disminución de la actividad de la PAL podría representar una respuesta de susceptibilidad del hospedante.

Otros cambios de la expresión génica han sido observados en plantas de tabaco inoculadas con *M. incognita* ; entre ellos, está el incremento, respecto al testigo no inoculado, de la expresión del gen *TobRB7*, que codifica para una proteína (Prb7) membranal intrínseca específica aparentemente de raíces, la que se cree es una acuaporina (Opperman *et al.*, 1994). Lo anterior sugiere que la sobre expresión del gen es requerida para el desarrollo exitoso o mantenimiento del sitio de alimentación.

Actualmente, no existe información respecto al efecto de *N. aberrans* en la expresión génica de sus células hospedantes; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que tenga un efecto similar al ejercido por *Meloidogyne* spp., debido a que también induce la formación de un sitio especializado de alimentación acompañado de hipertrofia e hiperplasia y formación de agallas en el tejido radical (Del Prado-Vera, 1985). Estos cambios en la raíz probablemente involucran también una reprogramación de la expresión génica de las células afectadas. Al respecto, la actividad de la enzima PAL en la raíz de plantas del chile CM-334, fue menor que la del testigo, 21 días después de la inoculación; lo cual podría estar asociado con la represión de la expresión del gen que codifica la síntesis de PAL por el nemátodo (Godínez-Vidal, 2007).

No todos los genes que participan en una determinada ruta metabólica, son inducidos durante la formación de los sitios de alimentación del nemátodo, este parece afectar puntos intermedios de las rutas metabólicas y no el punto inicial en el que la ruta es normalmente controlada por la planta; así utilizan la mayor parte de las

rutas metabólicas propias de la planta y las modifican, para su beneficio (Godelieve y Fenoll, 2002). Por ejemplo, los nemátodos pueden alterar localmente los niveles de auxinas al cambiar el transporte polar de las mismas a través de la inducción de la ruta de los flavonoides, como se ha descrito para *Rhizobium leguminosarum* (Mathesius *et al.*, 1988; Hutangura *et al.*, 1999). Esto, cobra sentido si se considera que en las secreciones del nemátodo se ha detectado las enzimas corismato mutasa y chalcona sintetasa, involucradas en la síntesis de flavonoides (Hutangura *et al.*, 1999).

Mecanismos de protección bioquímica en las plantas

Con la evolución, las plantas han desarrollado mecanismos para sobrevivir a condiciones adversas; entre ellos están los mecanismos de resistencia a enfermedades, con los que se protegen de algunos de los agentes infectivos de su ambiente. Al respecto, se ha propuesto que todas las plantas poseen el potencial genético para defenderse del ataque de patógenos bióticos y que la resistencia o la susceptibilidad está determinada por la velocidad y la magnitud con que ese potencial se expresa, así como la actividad de los productos de los genes (Egea *et al.*, 1996). Una manera en que las plantas reaccionan ante la invasión de los patógenos es el incremento de la actividad de varias enzimas que llevan a la síntesis de diversos compuestos. Algunos de esos compuestos sintetizados son fitoalexinas, fenoles y lignina (Fernández-Pavía, 1997).

Ruta de los fenilpropanoides

La ruta de los compuestos fenilpropanoides está considerada como una de las más importantes de las plantas, debido a que, a lo largo de ella se sintetizan una amplia variedad de productos que intervienen en las respuestas contra los patógenos. Entre esos compuestos están los flavonoides, isoflavonoides, monolignoles y lignina (Dixon, 2001). La lignina es un polímero que puede funcionar como una barrera física contra el ingreso de patógenos (Mitchell *et al.*, 1999).

El primer paso de la biosíntesis de los fenilpropanoides es catalizado por la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL, EC 4.3.1.5), que transforma la L-fenilalanina a ácido *trans*-cinámico. La L-fenilalanina deriva del corismato, de una reacción catalizada por la corismato mutasa (CM, EC 5.4.99.5) y el pefanato como intermediario (Figura 1.) (Nugroho *et al.*, 2002). Estudios de compartimentalización demostraron que la PAL está localizada principalmente en el citoplasma y también puede estar asociada a la membrana de algunos organelos. Además, un estudio desarrollado para determinar la localización de la PAL demostró que la síntesis de antocianinas y flavonoides se lleva a cabo en la epidermis, mientras que la síntesis de la lignina se lleva a cabo en otros tejidos (Jones, 1984).

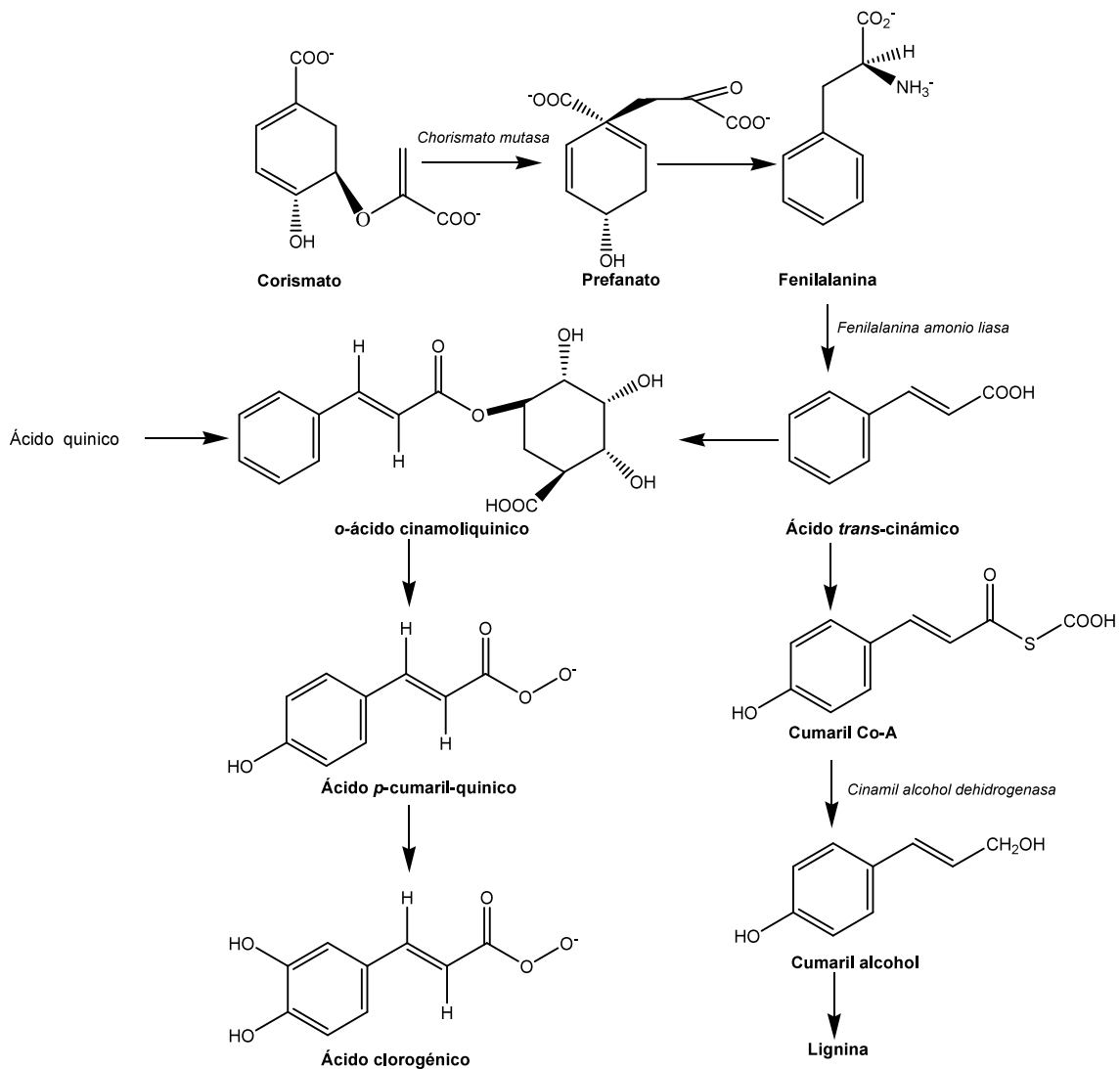


Figura 1. Ruta de biosíntesis de productos fenilpropanoides derivados de fenilalanina. Tomado de Nugroho *et al.*, 2002.

La actividad de la fenilalanina amonioliasa parece modificarse notablemente en respuesta a los estados fisiológicos de la planta y durante los eventos patológicos. Al respecto, los tratamientos con inductores (“elicitors”) y heridas en papa incrementaron la actividad de la PAL. En leguminosas, el virus del mosaico del tabaco (TMV) indujo la actividad de la PAL seguida por la inducción de fitoalexinas antimicrobianas (Jones, 1984). En papa la síntesis de compuestos relacionados con los mecanismos de protección al ataque de patógenos está acompañada de síntesis

nueva de proteínas o enzimas involucradas con su producción; la PAL es una de esas enzimas (Yoshioka y Doke, 1994). En hojas de papa inoculadas con razas compatibles e incompatibles de *P. infestans* la activación transcripcional del gen *pal* ocurrió 30 minutos después de la inoculación (Fritzemeier *et al.*, 1987).

Además, se ha inducido la acumulación de mRNA de PAL en tubérculos de papa al ser inoculados con razas incompatibles de *P. infestans*, mientras que solamente se detectó una pequeña acumulación de mRNA cuando se inoculó con una raza compatible (Yoshioka y Doke, 1994). Se han obtenido resultados similares en tubérculos de papa elicitados con glucanos provenientes de la pared celular de las hifas del oomiceto (Yoshioka y Doke, 1994).

Por otro lado se ha demostrado la correlación directa entre la actividad de la PAL y el nivel de resistencia del hospedante a los patógenos, así como los incrementos en otros patosistemas después de la inoculación con diferentes especies de *Phytophthora* (Friend *et al.*, 1973). Mozzetti *et al.* (1995), demostraron que la actividad de la PAL no incrementó en las hojas de líneas isogénicas del cultivar de chile Quadrato, susceptibles y resistentes, después de la inoculación con *P. capsici*. En contraste, los mismos autores observaron el incremento de la actividad de la PAL en los extracto de células, de isolíneas emparentadas, cultivadas en suspensión 6 horas después de la inoculación con *P. capsici*. La explicación que dan los autores a este comportamiento es que las células cultivadas en suspensión, estuvieron expuestas de manera más homogénea al contacto con el patógeno; mientras que en las hojas, el ataque del patógeno y la respuesta de resistencia expresada como actividad de PAL quizás solo sucedió en algunas células.

La participación de la enzima PAL en el desarrollo de la resistencia, es un paso preeliminar para la biosíntesis y acumulación de compuestos aromáticos con propiedades antimicrobiales y lignificación. Algunos de los compuestos con propiedades tóxicas a *P. capsici* que se forman en esta ruta de biosíntesis son los compuestos fenólicos, y se ha demostrado la correlación del contenido de fenoles

con la acumulación de mRNA que codifica para la síntesis de PAL (Fernández-Pavía, 1997). En plantas de Chile del cultivar resistente Smith-5 hubo una relación entre el incremento del contenido de fenoles y la inhibición de la infección provocada por *P. capsici* (Candela *et al.*, 1995).

Algunos compuestos fenólicos que se incrementaron durante la infección del oomiceto se detectaron solamente en el espacio intercelular de las hojas, especialmente en el cultivar de Chile resistente Phoyo 636 (Lizzi *et al.*, 1995). De los ácidos fenólicos que inhiben el crecimiento micelial de *P. capsici* destaca el ácido transcinámico, seguido de los ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico y salicílico (Candela *et al.*, 1995). Sollars *et al.* (1993), reportan que los ácidos caféico, coumarico, ferúlico e hidroxibenzóico, e hidroxiquinona fueron tóxicos para *P. capsici*.

También algunos compuestos fenólicos son tóxicos a nemátodos, entre ellos destaca el ácido transcinámico, seguido por el pirogalol, el ácido 2-OH naftoico y el etilgalato. Después de la auto-oxidación, los compuestos como el ácido α -resorcilico, 3,4 hidroxibenzóico, ácido ferúlico y ácido caféico presentaron alta actividad tóxica contra *M. incognita*; sin embargo, éstos ácidos presentaron actividad nematicida limitada antes de la auto-oxidación (Mahajan *et al.*, 1985). Lo anterior sugiere que la actividad de los compuestos fenólicos se debe a su estado de oxido-reducción, y que ciertas enzimas deben intervenir para oxidarlos. Las oxidaciones son reacciones que ocurren durante la invasión de las plantas por patógenos, y es un mecanismo común de resistencia (Gómez-Vásquez *et al.*, 2004). La oxidación de ciertos compuestos fenólicos ha sido asociada a los mecanismos de reacción del hospedante en la interacción planta-nemátodo. Huang y Rhode (1973) realizaron pruebas histoquímicas en la raíz del cultivar de jitomate Nemared, resistente a *M. incognita*, e identificaron una gran cantidad de compuestos fenólicos, acumulados en el tejido dañado, principalmente ácido clorogénico en su forma oxidada. La resistencia del genotipo CM-334 a *Meloidogyne* spp es explicada, en parte, por la presencia de ácido clorogénico (Pegard *et al.*, 2005).

Peroxidasas

Una de las proteínas inducidas en las plantas durante la patogénesis es la peroxidasa (EC 1.11.1.7 donador: hidrógeno-peróxido oxidoreductasa, POX). Las peroxidasas han sido detectadas en todas las plantas vasculares estudiadas hasta ahora, y pueden ser acídicas o de tipo básico dependiendo de su punto isoeléctrico. Típicamente hay entre 10 y 20 isoformas que pueden diferir en más del 50% por su secuencia peptídica, algunas otras se originan por modificaciones post transcripcionales (Lagrimini *et al.*, 1997). Las peroxidasas básicas se encuentran tanto en las vacuolas como en la pared celular, las peroxidasas acídicas están normalmente restringidas a la pared celular y su actividad es mayor que las peroxidasas básicas; además, están más relacionadas con la polimerización de la lignina, debido a su afinidad con el alcohol coniferil, su localización en la pared celular y su expresión en la lignificación del tejido (Boudet, 2000). De estos estudios surge la idea que más de un tipo de isoenzimas de peroxidasas puede participar en la lignificación. Esta observación podría explicar porque en la interacción *P. capsici* – *C. annuum* son inducidas diferentes isoenzimas, tanto en la fracción extracelular como en la correspondiente a la pared celular (Egea *et al.*, 2001). Lo anterior soporta la teoría que las peroxidasas tienen una función relevante en la biosíntesis de la pared celular secundaria, ya que polimerizan los alcoholes hidroxil y metoxicinámicos, con la consecuente formación de lignina y puentes con la celulosa, pectina e hidroxiprolina (Boudet, 2000).

En lo que concierne a las respuestas de resistencia de las plantas a algunos patógenos, la actividad de las peroxidasas se correlaciona directamente con la oxidación de los compuestos fenólicos que genera quinonas, y con la síntesis de lignina (Pollock y Drysdale, 1976; Boudet, 2000). En la interacción entre *C. annuum* y *P. capsici*, el incremento de la actividad de las peroxidasas estuvo acompañado con el aumento de compuestos fenólicos, y estos eventos se relacionaron con la resistencia de la planta al oomiceto (Fernández-Pavía, 1997; Gayoso *et al.*, 2004) Por otro lado, Lizzi *et al.* (1995) señalaron que las peroxidasas intercelulares no

parecieron estar involucradas en el proceso de lignificación, durante la respuesta hipersensitiva, inducida por *P. capsici* en un cultivar de chile resistente. En contraste, Egea *et al.* (2001) reportaron que la síntesis o acumulación de ésta enzima se llevó a cabo en células en suspensión “elicitadas” con micelio de *P. capsici*; las peroxidasas estuvieron presentes tanto en el medio extracelular como en la fracción de la pared celular. En el estudio los autores usaron tres cultivares de chile con diferente nivel de resistencia a *P. capsici* y encontraron diferentes isoenzimas con distintos puntos isoeléctricos y variación en la actividad de las peroxidasas extracelulares en los tres cultivares evaluados después de la inoculación con el elicitor. Los resultados apoyan la idea de que las peroxidasas pueden utilizarse como marcadores de la resistencia a *P. capsici*. También se ha reportado la inactivación de peroxidasas en la fracción de la pared celular en materiales susceptibles al oomiceto (Egea *et al.*, 2001).

Cuando se comparó la actividad de las peroxidasas del material NM6-4 susceptible a *P. capsici*, con el genotipo resistente CM-334, se observó incremento en ambos; sin embargo, en el material resistente fue significativamente mayor, y la máxima actividad se presentó a los 4, 7 y 9 días después de la inoculación con el patógeno (Fernández-Pavía, 1997). Además, el mismo autor encontró tres isoenzimas acídicas con diferente punto isoeléctrico y una de tipo básico en las raíces de ambos materiales. La mayor actividad de peroxidasas en el material CM-334 se relacionó con el incremento de peroxidasas acídicas. Estos resultados sugieren que este tipo de isoenzimas pueden desempeñar un papel importante en la respuesta de protección de la planta en presencia del patógeno. En cuanto a la isoenzima de tipo básico detectada en ambos materiales, 48 horas después de la inoculación con el oomiceto, parece estar relacionada con la infección más que con la respuesta de defensa (Fernández-Pavía, 1997).

En la interacción *C. annuum* L. var *annuum* – *P. capsici*, el incremento de la actividad de las peroxidasas en la raíz lo presentaron las plantas inoculadas con el oomiceto y las no inoculadas, pero fue significativamente mayor en las plantas inoculadas, después de 12 y 48 horas de la inoculación (Gayoso *et al.*, 2004). En el tallo y las

hojas el patrón de la actividad enzimática de peroxidasa se mantuvo constante desde las 12 horas posteriores a la inoculación hasta el quinto día, y presentaron un incremento del 54 y 90% respectivamente al séptimo día después de la inoculación. El contenido de H₂O₂ en la raíz de las plantas inoculadas se mantuvo constante durante los primeros tres días y su contenido incremento 87%, respecto a las plantas no inoculadas, 7 días posteriores a la inoculación con *P. capsici*. Estos resultados indican que la actividad de las peroxidosas no es la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (por sus siglas en inglés AOS) durante la respuesta de hipersensibilidad. Esta idea es reforzada con los resultados obtenidos por Ueeda *et al.*, (2006); quienes encontraron que en el material susceptible California Wonder la acumulación de RNAm que codifica para la síntesis de peroxidosas ocurrió en los primeros 30 minutos posteriores a la inoculación con *P. capsici*, se mantuvo por 18 horas y a partir de este tiempo disminuyó. En cambio, los autores citados no detectaron esa acumulación en el material resistente CM-334. Ellos concluyeron que la síntesis de nuevas peroxidosas disminuiría la concentración de H₂O₂ e inhibiría la respuesta de hipersensibilidad.

Otra función de las peroxidosas es la oxidación de diferentes compuestos fenólicos. Al respecto, el incremento de la actividad de las peroxidosas en tallo y hojas del material de Chile var. *Annuum* al parecer resistente, 7 días después de la inoculación con *P. capsici*, se asoció con un incremento en el contenido de fenoles; lo anterior fortalece la idea de que las peroxidosas pueden estar involucradas en la reacción de protección de las plantas a los patógenos (Gayoso *et al.*, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de las plantas de chile

Semillas de chile CM-334 resistentes a *P. capsici*, se enjuagaron con agua destilada estéril y se desinfectaron sumergiéndolas en hipoclorito de sodio al 1 % por 1 minuto, posteriormente se lavaron varias veces con agua destilada estéril para retirar el cloro. Las semillas se germinaron a 28 °C en cajas germinadoras sobre papel secante esterilizado y humedecido. Las semillas germinadas se transplantaron a macetas que contenían arena estéril como sustrato. Diariamente se regaron con agua estéril, y fertilizaron con una solución nutritiva (solución madre preparada con 620 g de Nitrofoska[®] (12-12-12-2) en 20L de agua y, diluida en 10 partes de agua) tres veces por semana. La fertilización inicio 8 días posteriores al trasplante. Las macetas se mantuvieron a 28 °C, con un fotoperiodo de 14 horas con luz y 10 de oscuridad y una intensidad luminosa de 6768 lux, en cámaras de crecimiento

Preparación del inóculo e inoculación con *N. aberrans*

Las masas de huevos se extrajeron raíces de jitomate agalladas, éstas se incubaron a 28 °C en cajas Petri con una solución de fungicida Captan[®] y antibiótico Cloranfenicol[®], ambos al 0.1 % en agua destilada estéril. Una vez que la mayor parte de los huevos eclosionaron, se cuantificó el número de individuos juveniles (J₂) por mL de suspensión y se inocularon 2000 J₂ por planta en la base del tallo cuando las plantas tenían de 4 a 5 hojas verdaderas.

Preparación del inóculo e inoculación con *P. capsici*

La producción e inoculación del inóculo se realizó de acuerdo a Pérez (1985). El aislamiento 6143 de *P. capsici* fue proporcionado por la Dra. Fernández-Pavía. En cajas Petri con medio V8 (355 mL de jugo V8; 4 g de CaCO₃; 16 g de agar, en un volumen final de 1 L) se colocó en el centro un disco de 0.5 cm de diámetro con medio de cultivo con crecimiento micelial de *P. capsici*. Las cajas se mantuvieron a 28 °C, en la oscuridad, y 20 días después el contenido de las cajas se fragmentó en cuatro porciones, cada una se colocó en una caja Petri con agua destilada estéril y se mantuvieron a 28 °C durante 10 días. Al término de ese tiempo las cajas se expusieron a 4 °C durante 2 horas, para estimular la liberación de zoosporas, y una vez liberadas se cuantificaron en un hematocitómetro (Marienfeld®). Se inocularon 3 x10⁵ zoosporas por planta, aplicadas en la base del tallo. Para favorecer la infección por el oomiceto, previo a la inoculación, las macetas se saturaron con agua estéril por 24 horas. La inoculación con *P. capsici* se realizó 21 días después de haber inoculado al nemátodo (Trujillo *et al.*, 2005).

En los experimentos realizados, a menos que se especifique de otra manera, las plantas se inocularon con *P. capsici*, *N. aberrans* o ambos patógenos y los testigos consistieron en plantas no inoculadas. Así, se generaron cuatro tratamientos en cada experimento, y en cada uno de ellos la toma de muestras de tejido radical y de vástago se realizó a diferentes tiempos después de la inoculación (piPc) con el oomiceto.

Establecimiento de los ensayos

Ensayo 1: Actividad enzimática y contenido de fenoles solubles totales durante las 96 h posteriores a la inoculación con *P. capsici*

El propósito de este primer ensayo fue conocer la actividad de las enzimas peroxidadas y PAL y los cambios del contenido de fenoles solubles totales durante las primeras 96 horas posteriores a la inoculación, individual y combinada, con *N. aberrans* y *P. capsici* en la raíz y el vástago de las plantas de Chile. Para ello se establecieron cuatro tratamientos (plantas sin inocular: Control, inoculadas con el nemátodo: *Na*, inoculadas con el oomiceto: *Pc* e inoculadas con ambos patógenos *N-Pc*). En este experimento las plantas fueron muestreadas a las 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas posteriores a la inoculación con *P. capsici* (*piPc*) y para cada tiempo de cada tratamiento se tuvo un número variable de plantas, entre 12 y 20. Se separaron la raíz y el vástago de cada planta y los estratos de cada tiempo de cada tratamiento se mezclaron para preparar una muestra compuesta, y posteriormente se congelaron con nitrógeno líquido, se trituraron y almacenaron a -50 °C hasta su utilización. El tejido de cada muestra compuesta se licuó con 10 mL de acetona por gramo de tejido para remover pigmentos, la mezcla fue filtrada y la extracción del residuo con acetona fue repetida cinco veces, hasta que las muestras perdieron su coloración. Durante la extracción las muestras se mantuvieron en hielo. El residuo del extracto acetónico (esto es el polvo, llamado polvo de acetona) se dejó secar a temperatura ambiente y se almacenó a -25 °C hasta su utilización. El extracto acetónico fue utilizado para la determinación de fenoles solubles totales.

Ensayo 2: Actividad enzimática y contenido de fenoles solubles totales en diferentes estratos de plantas de Chile seis horas después de la inoculación

Este segundo ensayo fue realizado para determinar si existen diferencias en la actividad de las enzimas peroxidasas y PAL y en el contenido de fenoles solubles totales en dos estratos de la raíz (ápices y el resto del sistema radical) y en el vástago de la planta a las 6 horas piPc. Para esto, se establecieron los mismos tratamientos que en el Ensayo 1, y cada uno estuvo representado por seis plantas. Seis horas después de haber inoculado con *P. capsici*, las plantas fueron cosechadas, se lavaron las raíces y se separaron del vástago. La raíz se dividió en dos estratos: uno incluyó los primeros 3 cm desde el ápice (zona de diferenciación celular) y el otro contenía el resto de la raíz (sistema radical sin ápices). El vástago incluyó tallo y follaje. Cada sección de las plantas, que conformaron un tratamiento, se mezcló para preparar una muestra compuesta. El procesamiento, almacenamiento y obtención del polvo del extracto con acetona se realizó en la forma descrita en el Ensayo 1. El extracto acetónico fue utilizado para cuantificar los fenoles solubles totales.

Ensayo 3: Cuantificación de ácido clorogénico en plántulas de Chile resistente y susceptible a *P. capsici* inoculadas con *N. aberrans*

La finalidad de este tercer ensayo fue identificar y cuantificar el contenido de ácido clorogénico en plántulas de Chile resistente (CM-334) y susceptible (J. E. Parker) a *P. capsici* inoculadas únicamente con *N. aberrans*, para ello se establecieron cuatro tratamientos: 1) plantas resistentes con nemátodo (R Na), 2) resistentes sin nemátodo (R control), 3) susceptibles con nemátodo (S Na) y 4) susceptibles sin nemátodo (S control); cada tratamiento consistió de cinco plántulas. La inoculación con *N. aberrans* se realizó cuando las plántulas de Chile presentaban cuatro o cinco hojas verdaderas, con una suspensión de 2000 J₂ en la base del tallo de las plantas. Cinco días después de haber realizado la inoculación con el nemátodo, las plantas

fueron extraídas de la cámara de crecimiento, removidas de las macetas, se lavaron las raíces y se separaron del vástago. De cada planta (sin inocular e inoculadas, susceptible y resistente), muestras con segmentos de tejido de raíz, tallo y hojas (0.4 g) seleccionados al azar, se colocaron separadamente en 10 mL de metanol al 100 % durante 24 horas. Los extractos obtenidos fueron usados para la identificación y cuantificación de ácido clorogénico.

Extracción de proteína y cuantificación de la actividad enzimática de las peroxidasas

Todos los pasos se realizaron manteniendo las muestras en hielo. La extracción de la proteína se hizo a partir de 25 mg del polvo extraído con acetona, el polvo fue homogenizado en 5 mL de amortiguador de pH Tris-HCl [Tris-HCl pH 7.1, PVP al 1 % (p/v)] en un ultrahomogenizador a 20000 rpm, durante 1 min. El homogenizado fue filtrado y centrifugado a 13000 g por 20 min. La concentración de proteínas se determinó por el método descrito por Bradford (1976), para lo que se utilizó albúmina sérico-bovina (BSA), fracción V (Sigma), como estándar (Apéndice 1).

La actividad de las peroxidasas se determinó con el incremento de la absorbancia ($\Delta A \text{ min}^{-1}$, 470 nm; 25 °C) debido a la formación de tetraguaiacol. De acuerdo con Chance y Maehly (1955), se utilizó como coeficiente de extinción del tetraguaiacol $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en una solución que contenía 150 μL de extracto crudo, 2.5 mL de amortiguador de pH Tris-HCl (Tris-HCl pH 7.1), 100 μL de H_2O_2 al 0.25 % y 50 μL de guaiacol 0.1 M. Los resultados se expresaron como μMoles de tetraguaiacol por mg de proteína min^{-1} . De cada muestra compuesta se tomaron cinco submuestras, cada una de 25 mg y fue considerada como una repetición, de esta manera se realizaron cinco repeticiones por tratamiento.

Extracción de proteína y cuantificación de la actividad enzimática de PAL

Para la extracción de la proteína se utilizaron 25 mg del polvo extraído con acetona, homogenizados en 5 mL de amortiguador de pH, preparado con borato de sodio [borato de sodio 0.1M, pH 8.8, PVP al 1% (p/v) y 0.02 M β -mercaptoetanol] en un ultrahomogenizador a 20000 rpm, durante 1 min. El homogenizado fue filtrado y centrifugado a 13800 g por 20 min. La enzima fue semipurificada a partir del sobrenadante, para esto, primero fue precipitada con sulfato de amonio, a una saturación final de 46 %; la mezcla fue centrifugada nuevamente a 13800 g por 20 min. El precipitado se disolvió con amortiguador de acetato de amonio [acetato de amonio 0.1 M, pH 7.7 y β -mercaptoetanol 0.02 M]. La concentración de proteínas se determinó de la manera arriba indicada

La actividad de PAL (E.C. 4.3.1.5; PAL) se determinó de acuerdo a Martínez-Téllez y Lafuente (1997), y se midió con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 290 nm, por la producción de ácido *trans*-cinámico a partir de L-fenilalanina. La mezcla de reacción contuvo 2 mL del extracto de proteína y 0.6 mL de una solución con L-fenil alanina 100 mM en un volumen total de 6 mL. La mezcla se incubó a 40 °C por 2 h. Para determinar la cantidad de ácido *trans*-cinámico producido en esas condiciones, se preparó una curva estándar con ácido *trans*-cinámico (Sigma) disuelto en amortiguador de borato de sodio (borato de sodio 0.1 M, pH 8.8) (Apéndice 2). La actividad de la enzima se expresó en nanomoles de ácido *trans*-cinámico por μ g de proteína producidos en 2 h de reacción. De cada muestra compuesta se tomaron cinco alícuotas de 25 mg, de esta manera se cuantificaron cinco repeticiones por tratamiento.

Cuantificación de fenoles solubles totales

La cuantificación de los fenoles solubles totales se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994) con las siguientes modificaciones: de los extractos acetónicos, de las muestras compuestas, se tomaron cinco alícuotas de 250 y 600 μL de los extractos del vástago y la raíz, respectivamente, cada alícuota fue considerada como una repetición, por tanto se tuvieron cinco repeticiones por tratamiento; se agregó agua desionizada para completar un volumen de 17 mL. A esta solución se agregó 1 mL del reactivo Folin Ciocalteu (Sigma), se homogenizó y adicionaron 2 mL de Na_2CO_3 al 10 %. La cantidad de fenoles solubles totales se determinó en un espectrofotómetro, a 760 nm, después de generar el color azul correspondiente a la concentración de compuestos fenólicos, mediante la permanencia de las muestras en oscuridad durante 2 h. Se utilizó ácido tánico (Sigma) como estándar (Apéndice 3).

Identificación y cuantificación de ácido clorogénico

La identificación y cuantificación de ácido clorogénico se realizó con el método descrito por Pegard y colaboradores (2005). Veinticuatro horas después de colocar las muestras de tejido en metanol, el tejido fue removido del extracto mediante filtración a través de papel Whatman No. 4, y llevado a sequedad en un evaporador rotatorio con vacío y temperatura de 38 °C. El extracto concentrado fue resuspendido en 1 mL de la fase móvil, que consistió en una solución de metanol:ácido acético:agua (25:1:75 v/v). La muestra se filtró a través de acrodiscos de diámetro de poro de 0.45 μm antes de inyectarse al HPLC (Perkin-Elmer, Serie 200, controlado por una computadora personal mediante el software TotalChrom 2002. Se usó una columna analítica "Hypersil ODS.2" (250x 46 mm) con tamaño de partícula de 5 μm y como eluyente la mezcla de metanol: ácido acético: agua anteriormente indicada, bajo un sistema isocrático con un flujo de 1 mL min^{-1} . El volumen de muestra inyectado fue 20 μL y el tiempo de análisis de 20 min. La detección del compuesto

fenólico fue monitoreada utilizando un detector de luz UV de de 254 nm de longitud de onda y temperatura constante de la columna a 30 °C. Para identificar y cuantificar el contenido de ácido clorogénico, los cromatogramas fueron comparados con curvas estándar preparadas con ácido clorogénico (Sigma Aldrich). Todos los disolventes tuvieron pureza “grado cromatográfico” (Sigma Aldrich).

Análisis estadístico

El experimento fue analizado con un diseño completamente al azar. Los datos obtenidos en todos los ensayos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), para lo cual se utilizó el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999-2000, versión 8.1), para computadora personal.

IV RESULTADOS

Actividad enzimática de las peroxidasas

Ensayo 1

La actividad de las peroxidasas en el sistema radical completo de las plantas testigo (sin ningún inóculo) se mantuvo constante durante las 96 horas ($P \leq 0.05$), excepto en el muestreo realizado a las 48 horas, en el que hubo un 46 % de incremento de la actividad (Cuadro 1, primer ensayo, tratamiento Control).

En contraste, en el sistema radical completo de las plantas inoculadas únicamente con *P. capsici* la actividad de las peroxidasas fue incrementando a lo largo de las primeras 24 horas, momento en el que alcanzó una actividad mayor al 55 %, respecto a la determinada 6 horas después de la inoculación con el oomiceto ($P \leq 0.05$) y a partir de las 48 horas la activación se revertió al nivel de las primeras horas. En las siguientes horas se recuperó la actividad, pero los valores registrados a las 72 y 96 horas fueron estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$) (Cuadro 1, primer ensayo, tratamiento *Pc*).

La actividad de las peroxidasas en el sistema radical completo de las plantas inoculadas sólo con el nemátodo mostró fluctuación durante el período de las 96 horas evaluadas; pues, a las 12 horas incrementó significativamente (22 %) respecto a la actividad inicial (6 horas) del mismo tratamiento, pero a las 24 horas disminuyó drásticamente y significativamente (47 %) respecto a la actividad inicial (6 horas). Además, entre las 48 y 96 horas se recuperó la actividad de las peroxidasas a valores estadísticamente similares a los iniciales (6 horas) (Cuadro 1, primer ensayo, tratamiento *Na*).

La inoculación con el oomiceto no alteró la actividad de las peroxidasas del sistema radical completo de las plantas inoculadas previamente (21 días antes) con el nemátodo (tratamiento *Na-Pc*) durante las primeras 24 horas, posteriores a la

inoculación del oomiceto. Sin embargo, entre las 48 y 96 horas posteriores a su inoculación, el oomiceto generó un incremento estadísticamente significativo de la actividad media de las peroxidasa del sistema radical completo, que varió entre 36 y 91 % respecto a la actividad media de las primeras 24 h (Cuadro 1, primer ensayo, tratamiento N-O).

Cuadro 1. Actividad de peroxidases (μMoles de tetraaguaiacol $\text{mg}^{-1}\text{de proteína min}^{-1}$) en plantas de chile (*Capsicum annuum*) sin inocular (Control) e inoculadas con *N. aberrans* (Na), *P. capsici* (Pc) y ambos patógenos (Na-Pc). Las determinaciones se realizaron durante las primeras 96 h posteriores a la inoculación con *P. capsici*. La inoculación con el oomiceto se realizó 21 días después de la inoculación con *N. aberrans*.

| Región anatómica | Tratamiento | Tiempo posterior a la inoculación con <i>P. capsici</i> (horas) | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 96 |
| Ensayo 1 | | | | | | | |
| Sistema radical completo | Control | 4.074 ^{Bb} | 4.612 ^{Bb} | 4.735 ^{Bb} | 6.448 ^{Aa} | 4.209 ^{Bb} | 4.395 ^{Bb} |
| | Pc | 4.758 ^{A^d} | 5.924 ^{A^{bc}} | 7.385 ^{A^a} | 4.788 ^{B^d} | 6.183 ^{A^b} | 5.112 ^{A^{cd}} |
| | Na | 3.642 ^{B^{bc}} | 4.433 ^{B^a} | 2.289 ^{D^d} | 3.827 ^{C^{ab}} | 2.995 ^{C^{cd}} | 3.732 ^{B^{abc}} |
| | Na-Pc | 3.807 ^{B^{cd}} | 4.463 ^{B^{bc}} | 3.095 ^{C^d} | 7.237 ^{A^a} | 6.279 ^{A^a} | 5.155 ^{A^b} |
| | C.V. | 8.701 | 9.936 | 9.836 | 9.917 | 8.374 | 9.816 |
| | Control | 0.537 ^{A^b} | 0.362 ^{A^c} | 0.379 ^{B^c} | 0.389 ^{A^c} | 1.192 ^{A^a} | 0.475 ^{B^{bc}} |
| Pc | 0.476 ^{A^c} | 0.336 ^{A^d} | 0.407 ^{A^{cd}} | 0.397 ^{A^d} | 1.227 ^{A^a} | 0.642 ^{B^b} | |
| Na | 0.517 ^{A^a} | 0.295 ^{B^b} | 0.317 ^{C^b} | 0.286 ^{B^b} | 0.439 ^{B^a} | 0.276 ^{C^b} | |
| Na-Pc | 0.517 ^{A^b} | 0.282 ^{B^b} | 0.371 ^{B^b} | 0.360 ^{A^b} | 0.414 ^{B^b} | 1.507 ^{A^a} | |
| C.V. | 17.318 | 9.911 | 10.253 | 7.238 | 6.756 | 27.495 | |
| Ensayo 2 | | | | | | | |
| Ápices de la raíz | Control | 3.862 ^C | - | - | - | - | - |
| | Pc | 4.480 ^B | - | - | - | - | - |
| | Na | 4.795 ^B | - | - | - | - | - |
| | Na-Pc | 5.802 ^A | - | - | - | - | - |
| | C.V. | 2.931 | - | - | - | - | - |
| | Control | 11.499 ^B | - | - | - | - | - |
| Pc | 13.733 ^A | - | - | - | - | - | |
| Na | 11.664 ^{AB} | - | - | - | - | - | |
| Na-Pc | 12.144 ^{AB} | - | - | - | - | - | |
| C.V. | 9.497 | - | - | - | - | - | |
| Sistema radical sin ápices | | | | | | | |
| Vástago | Control | 5.791 ^B | - | - | - | - | - |
| | Pc | 6.551 ^A | - | - | - | - | - |
| | Na | 5.734 ^B | - | - | - | - | - |
| | Na-Pc | 4.404 ^C | - | - | - | - | - |
| C.V. | 6.824 | - | - | - | - | - | |

Cada valor representa la media de cinco repeticiones. Valores seguidos con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). Las letras mayúsculas corresponden a la prueba de comparación de medias de cada tiempo de muestreo en cada zona de la planta. Las letras minúsculas corresponden a la prueba de comparación de medias de un tratamiento en los diferentes tiempos de muestreo. (-) Tiempo no evaluado.

La actividad de las peroxidasas en el sistema radical completo fue significativamente mayor en las plantas inoculadas únicamente con el oomiceto, respecto a los otros tres tratamientos, durante las 96 horas posteriores a la inoculación del oomiceto, excepto en el tiempo de muestreo realizado 48 horas después de dicha inoculación; es conveniente destacar que el valor medio, durante las 96 horas, de la actividad de las peroxidasas de este tratamiento, se mantuvo en los $5.69 \mu\text{Moles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, mientras que la actividad media en los otros tres tratamientos, durante las 96 horas permaneció entre 3.48 y $5.00 \mu\text{Moles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. En contraste con la actividad media elevada de las peroxidasas del sistema radical completo del tratamiento inoculado únicamente con el oomiceto, las actividades significativamente menores ($P \leq 0.05$) se presentaron en las plantas inoculadas únicamente con *N. aberrans*; particularmente en las evaluaciones de las 24, 48 y 72 horas, en las que la actividad de las peroxidasas se cuantificó entre los 2.28 y $3.82 \mu\text{Moles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Ensayo 1; Cuadro 1).

Es conveniente destacar que las plantas inoculadas con ambos patógenos presentaron actividades de peroxidasas estadísticamente similares a aquellas sin inocular (Control) entre las 6 y 12 horas, y aunque en ambos tratamientos fue notorio el incremento de la actividad de las peroxidasas en el sistema radical completo a las 48 horas, la actividad elevada continuó hasta las 96 horas únicamente en la raíz del tratamiento inoculado con ambos patógenos

La actividad de las peroxidasas en el vástago del tratamiento sin inocular fue poco estable durante las 96 horas de evaluación, pues disminuyó significativamente entre las 12 y 48 horas, respecto a la actividad inicial de las 6 horas e incrementó significativamente a las 72 horas, y finalmente, la actividad original se recuperó a las 96 horas. A pesar de la variabilidad de la actividad de las peroxidasas en el vástago, a lo largo de las 96 horas de evaluación, la actividad fue una de las más altas en cada tiempo evaluado (Cuadro 1, primer ensayo).

La actividad de las peroxidasas en el vástago de las plantas inoculadas únicamente con el oomiceto, como el tratamiento sin inocular, también se mantuvo significativamente elevada, en la mayoría de los muestreos realizados durante las 96 horas, respecto a los demás tratamientos. El comportamiento de la actividad de las peroxidasas de estos dos tratamientos fue similar, excepto a las 24 horas posteriores a la inoculación con el oomiceto, momento en el que las diferencias entre ambos tratamientos fueron estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) (Cuadro 1).

En general, la menor actividad de las peroxidasas de los vástagos correspondió a las plantas inoculadas únicamente con *N. aberrans*, excepto a las 6 y 12 horas, cuando la actividad de las peroxidasas fue igual que en las plantas inoculadas con ambos patógenos.

También, debe destacarse el incremento estadísticamente significativo de la actividad de las peroxidasas de las plantas inoculadas con ambos patógenos al final del experimento, respecto al tiempo previo. Durante las primeras 72 horas este tratamiento, con la inoculación doble, mantuvo en el vástago la actividad de las peroxidasas estadísticamente constante, entre 0.28 y 0.51 $\mu\text{Moles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y 24 horas después, es decir en el tiempo total de 96 horas, incrementó (a 1.50 $\mu\text{Moles mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$), en promedio, 3.88 veces su actividad. Además, al final de experimento las diferencias de la actividad de las peroxidasas de los vástagos entre los diferentes tratamientos fueron notablemente conspicuas (Cuadro 1).

Otro aspecto igualmente sobresaliente es que en este ensayo, la actividad de la peroxidasa del sistema radical completo alcanzó valores al menos 10 veces mayores a los del vástago (Cuadro 1).

Ensayo 2

Cuando se comparó la actividad de peroxidasas en diferentes estratos de las plantas de Chile (Ensayo 2), se encontró que el sistema radical sin ápice presentó actividades que fueron el doble de las correspondientes a los ápices de la raíz y vástago (Cuadro 1). También, sobresalió el hecho de que la actividad de las peroxidasas del vástago en el segundo ensayo alcanzaran valores 10 veces mayores a los obtenidos en el primer ensayo (Cuadro 1; segundo ensayo).

La respuesta de la actividad de las peroxidasas en el sistema radical sin ápices fue similar al vástago. En ambas regiones anatómicas la actividad fue significativamente mayor en las plantas inoculadas únicamente con el oomiceto. En contraste, la actividad de las peroxidasas en el ápice de la raíz fue significativamente mayor en el tratamiento generado por la inoculación con ambos patógenos (Cuadro 1; segundo ensayo).

La actividad de las peroxidasas del sistema radical sin ápices de las plantas inoculadas solamente con *N. aberrans* fue estadísticamente igual a las no inoculadas; un comportamiento similar se observó en el vástago. En cambio, en el ápice radical de las plantas inoculadas con ambos patógenos la actividad de las peroxidasas fue significativamente mayor respecto a las plantas no inoculadas. En el estrato correspondiente a los ápices de las raíces, la actividad de las peroxidasas de las plantas inoculadas únicamente con el oomiceto, así como el de aquellas inoculadas sólo con el nemátodo fue estadísticamente similar entre sí y ambas fueron estadísticamente superiores a la actividad de la misma zona radical de las plantas sin inocular, pero inferior al de las plantas inoculadas con ambos patógenos (Cuadro 1; segundo ensayo).

Actividad enzimática de la fenilalanina amonioliasa (PAL)

Ensayo 1

La actividad de la PAL en el sistema radical completo de las plantas testigo (sin inóculo) se mantuvo constante durante las primeras 48 horas ($P \leq 0.05$) de evaluación; pero, a partir de las 72 horas disminuyó significativamente, en promedio 50 % (Cuadro 2, primer ensayo, tratamiento SI).

La actividad de la PAL en el sistema radical completo de las plantas inoculadas solamente con el oomiceto en las primeras 6 horas posteriores a la inoculación fue 2.7 veces mayor a la actividad de las plantas sin inocular y disminuyó significativamente, en el tiempo posterior a la inoculación con este patógeno, entre las 12 y 96 horas. La máxima reducción de la actividad de la PAL se alcanzó 48 horas después de la inoculación y aunque hubo una recuperación parcial en las horas posteriores, la actividad permaneció significativamente baja, respecto a la observada a las 6 horas (Cuadro 2, primer ensayo). Sin embargo, la actividad de la PAL en el sistema radical completo, en general, fue estimulada por la inoculación del oomiceto únicamente, respecto a los otros tres tratamientos en cada tiempo evaluado.

Por otro lado, la actividad de la PAL en la raíz de las plantas sin inocular, las inoculadas solamente con el nemátodo y con ambos patógenos fue estadísticamente igual durante las primeras 48 horas y después, aunque la actividad se mantuvo sin cambios significativos en el tiempo dentro de cada tratamiento, entre los tratamientos se presentaron algunas diferencias (Cuadro 2, primer ensayo).

Sobresalió la estabilidad de la actividad de la PAL en el sistema radical completo de las plantas inoculadas con ambos patógenos, ya que, aunque fluctuó entre los 14.15 y 22.78 nMoles $\mu\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$, entre las 6 y 96 horas posteriores a la inoculación del oomiceto, los cambios no fueron estadísticamente significativos (Cuadro 2, primer ensayo).

La actividad de la PAL en el vástago varió significativamente, sin que se apreciara un patrón definido. Sin embargo, en las plantas sin inocular, osciló significativamente desde los 13.51 nMoles $\mu\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ hasta los 39.59 nMoles $\mu\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$, en las evaluaciones de las 24 y 72 horas, respectivamente. En el caso de las plantas inoculadas sólo con el oomiceto la actividad de la PAL alcanzó el valor significativamente menor a las 48 horas, mientras que la máxima actividad se registró a las 96 horas. El tratamiento generado por la inoculación con el nemátodo únicamente, mostró cierta estabilidad de la actividad de la PAL, pues permaneció estadísticamente constante las primeras 24 horas, pero después decayó a menos de un tercio (desde 32.46 hasta 9.55 nMoles $\mu\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$) y nuevamente fluctuó. Quizá la única excepción de esa amplia variabilidad de la actividad de la PAL del vástago en el tiempo fue el tratamiento generado con la inoculación con ambos patógenos; ya que, dicha actividad permaneció baja, estadísticamente constante desde las 6 hasta las 48 horas y luego incrementó significativa y drásticamente a las 72 y 96 horas (Cuadro 2, primer ensayo).

La actividad de la PAL en el vástago de las plantas inoculadas únicamente con *P. capsici* fue estadísticamente similar a las inoculadas solo con *N. aberrans* en cada tiempo muestreado, y la única diferencia entre ambos tratamientos se presentó a las 96 horas (Cuadro 2; primer ensayo). También, la actividad de la PAL del vástago de las plantas inoculadas solamente con el oomiceto tendió a igualar la actividad de los vástagos de las no inoculadas (Control), pues fueron estadísticamente similares en varios muestreos (Cuadro 2, primer ensayo).

Por otro lado, entre los niveles menores de actividad de la PAL en el vástago estuvieron los correspondientes a las plantas inoculadas con ambos patógenos después de las 24 y 48 horas de la inoculación con el oomiceto.

Ensayo 2

Al comparar la actividad de la PAL entre los dos estratos de raíz analizados, es evidente la mayor actividad de los ápices, con respecto al sistema radical desprovisto de los ápices. En promedio la actividad de la PAL fue parecida entre los ápices de la raíz y el vástago.

En ambos estratos de la raíz (ápices y sistema radical sin ápices) la mayor actividad de la PAL, evaluada a las 6 horas, se registró en las plantas inoculadas sólo con *P. capsici*, mientras que, en los tratamientos que involucraron al nemátodo (*Na* y *Na-Pc*) se presentaron niveles menores y similares al testigo; sin embargo, las diferencias fueron significativas ($P \leq 0.05$) solamente en el ápice de la raíz (Cuadro 2, Ensayo 2).

En el vástago el patrón de respuesta de cada tratamiento fue diferente al presentado por los dos estratos radicales de este mismo ensayo, así la mayor actividad se registró en las plantas inoculadas únicamente con el nemátodo (*Na*), seguido de los tratamientos generados por la inoculación solamente con el oomiceto (*Pc*), con ambos patógenos (*Na-Pc*) y el testigo (Control).

En promedio, los ápices de la raíz desarrollaron actividades 2.57 y 1.43 veces mayores que el sistema radical sin ápices y el vástago, respectivamente (Cuadro 2, ensayo 2). Aunque la actividad de la PAL en cada estrato de las plantas fue diferente entre los tratamientos, en ambos estratos de la raíz (ápices y sistema radical sin ápices) la mayor actividad enzimática se registró en las plantas inoculadas únicamente con el oomiceto. En contraste, la actividad de la PAL en el vástago fue significativamente mayor en el tratamiento generado por la inoculación solamente con el nemátodo ($P \leq 0.05$) (Cuadro 2, Ensayo 2).

Cuadro 2. Actividad de PAL (nMoles de ácido *trans*-cinámico $\mu\text{g}^{-1}\text{de proteína min}^{-1}$) en plantas de chile (*Capsicum annuum*) sin inocular (Control) e inoculadas con *N. aberrans* (Na), *P. capsici* (Pc) y ambos patógenos (Na-Pc). Las determinaciones se realizaron durante las primeras 96 h posteriores a la inoculación con *P. capsici*. La inoculación con el oomiceto se realizó 21 días después de la inoculación con *N. aberrans*.

| Región anatómica | Tratamiento | Tiempo posterior a la inoculación con <i>P. capsici</i> (horas) | | | | | | |
|-------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| Ensayo 1 | Sistema radical completo | Control | 21.285 ^{Ba} | 21.864 ^{Aa} | 21.586 ^{Aa} | 17.549 ^{Aa} | 13.653 ^{Cb} | 7.759 ^{Cb} |
| | | Pc | 56.560 ^{Aa} | 24.103 ^{Ab} | 23.547 ^{Ab} | 8.420 ^{Cc} | 24.365 ^{Ab} | 21.087 ^{Ab} |
| | | Na | 17.164 ^{Bbc} | 23.679 ^{Aa} | 21.431 ^{Ab} | 16.761 ^{Bbc} | 14.559 ^{Cc} | 18.531 ^{Aabc} |
| | Vástago | Na-Pc | 18.205 ^{Ba} | 20.588 ^{Aa} | 22.789 ^{Aa} | 19.053 ^{Aa} | 17.384 ^{Ba} | 14.156 ^{Ba} |
| | | C.V. | 32.448 | 43.452 | 8.217 | 30.499 | 7.852 | 15.701 |
| | | Control | 24.657 ^{Aab} | 24.192 ^{Abc} | 13.510 ^{Bc} | 16.690 ^{Ac} | 39.593 ^{Aa} | 23.899 ^{Cbc} |
| | Ensayo 2 | Pc | 20.087 ^{Ac} | 25.014 ^{Abc} | 31.942 ^{Ab} | 12.421 ^{Bd} | 32.514 ^{Ab} | 34.119 ^{Ba} |
| | | Na | 21.684 ^{Aab} | 23.472 ^{Ab} | 32.466 ^{Aa} | 9.551 ^{Bc} | 21.867 ^{Bab} | 13.687 ^{Dc} |
| | | Na-Pc | 20.282 ^{Abc} | 15.306 ^{Bbc} | 13.510 ^{Cc} | 12.203 ^{Bc} | 26.671 ^{Bb} | 68.588 ^{Aa} |
| | C.V. | 44.528 | 18.044 | 11.307 | 18.683 | 21.449 | 20.315 | |
| Ápices de la raíz | Control | Control | 12.876 ^B | - | - | - | - | - |
| | | Pc | 38.702 ^A | - | - | - | - | - |
| | | Na | 13.568 ^B | - | - | - | - | - |
| | Sistema radical sin ápices | Na-Pc | 12.477 ^B | - | - | - | - | - |
| | | C.V. | 18.719 | - | - | - | - | - |
| | | Control | 8.413 ^A | - | - | - | - | - |
| | Vástago | Pc | 8.654 ^A | - | - | - | - | - |
| | | Na | 7.106 ^A | - | - | - | - | - |
| | | Na-Pc | 5.985 ^A | - | - | - | - | - |
| | C.V. | 18.917 | - | - | - | - | - | |
| Vástago | Control | 9.259 ^C | - | - | - | - | - | |
| | Pc | 14.723 ^{AB} | - | - | - | - | - | |
| | Na | 18.530 ^A | - | - | - | - | - | |
| Na-Pc | 11.822 ^{Bc} | - | - | - | - | - | | |
| C.V. | 13.924 | - | - | - | - | - | | |

Cada valor representa la media de cinco repeticiones. Valores seguidos con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). Las letras mayúsculas corresponden a la prueba de comparación de medias de cada tiempo de muestreo realizado en cada región anatómica. Las letras minúsculas corresponden a la prueba de comparación de medias de un tratamiento en los diferentes tiempos de muestreo (-) Tiempo no evaluado.

La actividad de la PAL de los tratamientos en ambos estratos de la raíz donde se involucró la presencia de *N. aberrans* (*Na* y *Na-Pc*), presentaron los niveles menores y estadísticamente similares al de las plantas no inoculadas (Control); pero, las diferencias fueron significativas ($P \leq 0.05$) solamente en el ápices de la raíz (Cuadro 2, Ensayo 2). En el vástago el patrón de respuesta entre los tratamientos fue diferente al de los dos estratos radicales de este mismo ensayo, así, la menor actividad se registró en el tratamiento correspondiente a las plantas sin inocular (SI).

Contenido de fenoles solubles totales

Ensayo 1

El contenido de fenoles solubles totales en el sistema radical completo de las plantas sin inocular (Control) mostró variación durante el período de evaluación. A las 12 horas se incrementó significativamente (18 %) respecto a la actividad inicial (6 horas) y en el siguiente tiempo de muestreo (24 horas), disminuyó a niveles similares al de las 6 horas. A las 48 y 96 horas, la cantidad de compuestos fenólicos disminuyó alrededor del 50% respecto al nivel inicial, y aunque, a las 72 horas hubo cierta recuperación, al final del periodo de evaluación los valores observados significativamente menores que al inicio (Cuadro 3, primer ensayo).

De manera similar, en el sistema radical completo de las plantas inoculadas únicamente con *P. capsici* los niveles mayores de fenoles solubles totales se presentaron en los tres muestreos realizados durante las primeras 24 horas. Pero en las siguientes horas, el comportamiento fue similar al de las plantas sin inocular (Control); no obstante, las diferencias entre ambos tratamientos fueron significativas, y las plantas inoculadas únicamente con el oomiceto acumularon la mayor cantidad de fenoles libres ($P \leq 0.05$).

El contenido de fenoles solubles totales en las plantas inoculadas solamente con *N. aberrans* y con ambos patógenos fue incrementando a lo largo de las primeras 24 horas, momento en que alcanzó un contenido mayor al 48 y 47 % respectivamente, respecto al determinado en el muestreo realizado 6 horas posteriores a la inoculación con el oomiceto. Sin embargo, a las 48 horas disminuyó drásticamente y significativamente (50 %) respecto al contenido inicial (6 horas). En el siguiente muestreo (72 horas) el contenido de compuestos fenólicos se recuperó en ambos tratamientos, sin embargo al final del experimento (96 horas) volvió a disminuir.

En general, el mayor contenido de fenoles solubles totales del sistema radical completo se registró en las plantas que se inocularon únicamente con *P. capsici* y las diferencias con los demás tratamientos fueron significativas ($P \leq 0.05$), excepto a las 12 horas, posteriores a la inoculación con el oomiceto (Cuadro 3; Ensayo 1). En contraste, en las plantas inoculadas con el nemátodo, sólo o en combinación con el oomiceto, presentaron contenidos significativamente ($P \leq 0.05$) menores de fenoles respecto al testigo, en todos los tiempos evaluados, excepto a las 96 horas posteriores a la inoculación con *P. capsici*.

El contenido de fenoles fue mayor en el vástago con relación a la raíz. En las plantas sin inocular (Control) el contenido de fenoles fue poco estable durante el periodo de evaluación; pues incrementó significativamente entre las 24 y 72 horas, respecto al contenido inicial de las 6 horas, y finalmente (96 horas), disminuyó significativamente (40 %). A pesar de que este tratamiento presentó variabilidad en el contenido de fenoles solubles totales, a lo largo de las 96 horas de evaluación, fue junto con el correspondiente a inoculación solo con el oomiceto, los que presentaron los contenidos más altos de fenoles, aunque entre ellos sus contenidos fueron significativamente diferentes (Cuadro 3, primer ensayo).

En el vástago en el vástago de las plantas inoculadas únicamente con el oomiceto el contenido de fenoles mostró variación, durante las 96 horas de evaluación, pues disminuyó significativamente (15 %) a las 12 horas, posteriores a la inoculación con

P. capsici, respecto al contenido inicial de las 6 horas. Entre las 24 y 48 horas se recuperó e incrementó respectivamente el contenido inicial. En los siguientes muestreos el contenido de fenoles disminuyó, y al final del experimento se encontró la menor concentración (58 %) respecto al inicial.

En las plantas inoculadas únicamente con *N. aberrans* y con ambos patógenos, el contenido de fenoles solubles totales fue variable entre las 6 y las 48 horas. El mayor contenido de estos compuestos se presentó 12 horas después de la inoculación con el oomiceto. En contraste, en las siguientes horas (72 y 96), las plantas inoculadas únicamente con el nemátodo presentaron su nivel mínimo de compuestos fenólicos. En cambio las plantas inoculadas con ambos patógenos recuperaron su contenido inicial de fenoles a las 72 horas y al final del experimento alcanzaron su nivel mínimo igual que el registrado a las 24 horas (Cuadro 3, Ensayo 1)

El contenido de fenoles en el vástago presentó un patrón de cambios similar al de las raíces. En las plantas inoculadas únicamente con el oomiceto (tratamiento *Pc*), el contenido de fenoles fue significativamente ($P \leq 0.05$) mayor en todos los tiempos evaluados, en comparación con los otros tres tratamientos, excepto a las 72 horas. Asimismo, en las plantas inoculadas con *N. aberrans* (tratamientos *Na* y *Na-Pc*), el contenido de fenoles fue significativamente ($P \leq 0.05$) menor respecto a las plantas sin inocular, excepto a las 12 horas, cuando el contenido fue mayor en el tratamiento conformado por las plantas inoculadas únicamente con *N. aberrans* (*Na*) respecto al testigo (Cuadro 3, Ensayo 1).

Cuadro 3. Contenido de fenoles solubles totales en plantas de Chile (mg^{-1} de ácido tánico g^{-1} de residuo seco) inoculadas con *N. aberrans* (N), *P. capsici* (O), con ambos patógenos (N-O) y en plantas sin inocular (Control). Las determinaciones se realizaron a diferentes tiempos después de la inoculación con *P. capsici*. La inoculación con el oomiceto se realizó 21 días después de la inoculación con *N. aberrans*.

| Región anatómica | Tratamiento | Tiempo posterior a la inoculación con <i>P. capsici</i> (horas) | | | | | | |
|------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| Ensayo 1 | Sistema radical completo | Control | 1.551 ^{Bb} | 1.835 ^{Aa} | 1.596 ^{Bb} | 0.746 ^{Bd} | 1.363 ^{Bc} | 0.625 ^{Be} |
| | | Pc | 1.989 ^{Aa} | 1.660 ^{Bb} | 1.941 ^{Aa} | 0.848 ^{Ae} | 1.491 ^{Ac} | 0.954 ^{Ad} |
| | | Na | 0.774 ^{Cc} | 1.109 ^{Cb} | 1.476 ^{Ca} | 0.387 ^{Ce} | 1.122 ^{Cb} | 0.583 ^{Bd} |
| | Na-Pc | 0.792 ^{Cd} | 0.931 ^{Dc} | 1.501 ^{Ca} | 0.398 ^{Ce} | 1.008 ^{Cc} | 0.436 ^{Cd} | |
| | C.V. | 1.920 | 1.925 | 1.549 | 3.113 | 3.517 | 4.665 | |
| | Vástago | Control | 4.733 ^{Bd} | 4.422 ^{Ce} | 6.646 ^{Bb} | 5.069 ^{Bc} | 7.004 ^{Aa} | 2.839 ^{Bf} |
| | | Pc | 7.382 ^{Aa} | 6.242 ^{Ad} | 7.306 ^{Ab} | 7.908 ^{Aa} | 6.588 ^{Bc} | 3.080 ^{Ae} |
| | | Na | 4.039 ^{Cb} | 5.623 ^{Ba} | 3.189 ^{Cc} | 3.914 ^{Cb} | 2.996 ^{Dcd} | 2.721 ^{Cd} |
| | Na-Pc | 3.819 ^{Db} | 4.062 ^{Ca} | 2.823 ^{Dc} | 2.805 ^{Dc} | 3.778 ^{Cb} | 2.749 ^{Cb} | |
| | C.V. | 2.022 | 4.159 | 1.404 | 1.432 | 3.156 | 2.103 | |
| Ensayo 2 | Ápices de la raíz | Control | 9.967 ^B | - | - | - | - | - |
| | | Pc | 11.318 ^A | - | - | - | - | - |
| | | Na | 8.451 ^C | - | - | - | - | - |
| | Na-Pc | 8.801 ^C | - | - | - | - | - | |
| | C.V. | 3.117 | - | - | - | - | - | |
| | Sistema radical sin ápices | Control | 7.475 ^A | - | - | - | - | - |
| | | Pc | 7.821 ^A | - | - | - | - | - |
| | | Na | 6.889 ^B | - | - | - | - | - |
| | Na-Pc | 6.932 ^B | - | - | - | - | - | |
| | C.V. | 2.996 | - | - | - | - | - | |
| Vástago | Control | 20.159 ^B | - | - | - | - | - | |
| | Pc | 22.541 ^A | - | - | - | - | - | |
| | Na | 22.442 ^A | - | - | - | - | - | |
| Na-Pc | 16.909 ^C | - | - | - | - | - | | |
| C.V. | 4.407 | - | - | - | - | - | | |

Cada valor representa la media de cinco repeticiones. Valores seguidos con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). Las letras mayúsculas corresponden a la prueba de comparación de medias de cada tiempo de muestreo realizado en cada región anatómica. Las letras minúsculas corresponden a la prueba de comparación de medias de un tratamiento en los diferentes tiempos de muestreo (-) Tiempo no evaluado.

Ensayo 2

Los tratamientos en ambas regiones anatómicas de la raíz, tuvieron el mismo comportamiento en cuanto al contenido de fenoles 6 horas después de la inoculación con el oomiceto. Las plantas inoculadas únicamente con *P. capsici* presentaron un contenido de fenoles solubles totales mayor en comparación con los demás tratamientos; aunque en la raíz sin ápices este tratamiento fue estadísticamente ($P \leq 0.05$) similar a las plantas sin inocular. En ambos estratos de la raíz, las plantas inoculadas con *N. aberrans* y con ambos patógenos, el contenido de fenoles fue significativamente menor ($P \leq 0.05$) en comparación con el tratamiento testigo. La respuesta presentada en el vástago (Cuadro 3; Ensayo 2) fue diferente a la observada en los dos estratos correspondientes al sistema radical, ya que el contenido de fenoles solubles totales en las plantas inoculadas únicamente con *P. capsici* fue estadísticamente igual ($P \leq 0.05$) a las inoculadas con *N. aberrans*. El contenido de fenoles en el vástago de las plantas inoculadas con ambos patógenos fue menor al encontrado en las plantas que sirvieron como control ($P \leq 0.05$) (Cuadro 3).

Contenido de ácido clorogénico en plantas de chile resistente y susceptible a *P. capsici* inoculadas con *N. aberrans*

El extracto de las plantas de chile CM-334 y J. E. Parker inoculadas y sin inocular con *N. aberrans*, presentó un tiempo de retención (6 minutos) idéntico al ácido clorogénico estándar, empleado para elaborar la curva con concentraciones conocidas, del citado compuesto fenólico (Apéndice 4). El contenido de ácido clorogénico fue mayor en las plantas resistentes en comparación con el material susceptible ($P \leq 0.05$); así mismo, con excepción del tallo de plantas CM334, el contenido de este compuesto fue significativamente menor en las plantas de ambos genotipos cuando el nemátodo estuvo presente (Cuadro 4).

La concentración del ácido clorogénico en las hojas de CM-334 fue 105 % mayor al encontrado en el material susceptible. Fue evidente que en ambos genotipos las hojas presentaron contenidos significativamente mayores del ácido, respecto a la raíz (5.9 y 3.4 veces más en el material resistente y susceptible,

respectivamente) y el tallo (20.4 y 12.2 veces más en el material resistente y susceptible); mientras que, en los tallos se registraron los menores contenidos (Cuadro 2). El nivel de ácido clorogénico en las raíces de plantas de CM-334 inoculadas con *N. aberrans* fue 9.5 % menor al de las plantas sin inóculo. En cambio, en la raíz de las plantas susceptibles el nivel del compuesto fenólico en las plantas inoculadas con el nemátodo fue 17.5 % inferior respecto a las plantas testigo. En las hojas donde las diferencias de la concentración de ácido clorogénico también fueron estadísticamente marcadas ($P \leq 0.05$), la concentración del compuesto fenólico disminuyó 11 % (CM-334) y 35 % (J.E. Parker) en las plantas inoculadas con el nemátodo, en comparación con las testigo.

Cuadro 4. Contenido de ácido clorogénico (μg de ácido clorogénico g^{-1} de materia fresca) en raíz, tallo y hojas de plantas de chile CM-334 y J.E. Parker, resistente (R) y susceptible (S) a *P. capsici*, respectivamente, e inoculadas (I) y sin inocular (SI) con *N. aberrans*.

| Tratamiento | Ácido clorogénico ($\mu\text{g g}^{-1}$ de materia fresca) | | |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|
| | Raíz | Tallo | Hojas |
| R NaI | 85.912 ^B | 26.562 ^A | 508.712 ^B |
| R Control | 94.904 ^A | 26.235 ^A | 571.467 ^A |
| S Na | 69.006 ^C | 17.899 ^B | 206.512 ^D |
| S Control | 83.621 ^B | 25.029 ^{AB} | 319.153 ^C |
| <i>Promedio R</i> | 90.408 ^a | 26.444 ^a | 540.089 ^a |
| <i>Promedio S</i> | 76.314 ^b | 21.465 ^b | 262.832 ^b |
| C.V | | | |

Cada valor representa la media de cinco repeticiones. Para cada órgano de la planta y para cada genotipo, valores seguidos con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). Las letras minúsculas corresponden a la prueba de comparación de medias de cada órgano de la planta entre los cultivares.

V. DISCUSIÓN

En plantas de chile CM-334 la actividad de las peroxidasas, en el sistema radical completo y el desprovisto de ápices, fue menor cuando fueron inoculadas sólo con *N. aberrans* y con ambos patógenos; mientras que, en las raíces de las plantas inoculadas únicamente con *P. capsici* la actividad enzimática fue significativamente mayor. La resistencia de algunos genotipos de *C. annuum* a *P. capsici* se ha asociado con incrementos en la actividad de las peroxidasas (Mozzetti, *et al.* 1995; Fernández-Pavía, 1997; Egea *et al.*, 2001; Gayoso *et al.*, 2004). Por ejemplo, en el material Smith-5, resistente a *P. capsici*, el incremento de la actividad de las peroxidasas se relacionó con el engrosamiento de la pared celular mediante la acumulación de lignina, 24 h posteriores a la inoculación con el oomiceto (Egea *et al.*, 2001). Tal relación podría encontrar sustento en el hecho de que las peroxidasas catalizan el último paso en la biosíntesis de lignina (Boudet, 2000). En lo que respecta a interacciones planta-nemátodo, previamente fue reportado por Zacheo *et al.* (1993) que la actividad de peroxidasas en la raíz de plantas de jitomate, susceptibles y resistentes, incrementó cuando fueron inoculadas con *Meloidogyne incognita* a los 7 días posteriores a la inoculación; sin embargo, el incremento de la actividad enzimática en el material resistente fue dos veces superior al presentado por el susceptible. El hecho de que la actividad de las peroxidasas incrementa con las interacciones incompatibles, cuando son inoculadas con nemátodos, podría ser consecuencia del incremento en la expresión del gen o genes encargados de su codificación. (Williamson y Hussey, 1996; Vercauteren *et al.*, 2001; Godelieve y Fenoll, 2002).

En contraste con los resultados obtenidos raíz y en el sistema radical sin ápices, en la región del ápice radical, la actividad de las peroxidasas fue mayor cuando el nemátodo estuvo presente (sólo o en combinación con el oomiceto) respecto a la registrada en las plantas inoculadas solamente con *P. capsici*. Es relevante recordar que *N. aberrans* fue inoculado 21 días antes de la inoculación con el oomiceto, y en ese tiempo, las raíces ya presentan ligeros inchamientos. Además, *N. aberrans* penetra a las raíces por los ápices y/o raíces secundarias laterales y migra a un sitio cerca del tejido vascular para establecer un sitio permanente de

alimentación, involucrando procesos de hipertrofia e hiperplasia, que requieren la síntesis *de novo* de la pared celular mediante la síntesis activa de componentes de la pared celular (Godelieve y Fenoll, 2002; Manzanilla-López, *et al.*, 2002). Adicionalmente, Vercauteren *et al.* (2001), usando técnicas de hibridación *in situ*, encontraron que en la interacción compatible entre *Arabidopsis thaliana*-*Meloidogyne incognita* se indujo la expresión del gen que codifica para la síntesis de peroxidasas dentro de las células gigantes. Por esta razón, para elucidar la función de las peroxidasas en esta interacción compatible (CM334-*N. aberrans*) sería necesario determinar el contenido y la composición de la lignina en esa región anatómica de la raíz, ya que, al parecer, la resistencia o susceptibilidad a la infección y reproducción de los nemátodos está relacionada con los cambios cuantitativos y cualitativos de la lignina (Wuyts, *et al.* 2006). Al respecto, fue demostrado experimentalmente que la interacción incompatible entre el cultivar de jitomate VFN8 y *Meloidogyne incognita* propició el incremento de la actividad de las peroxidasas en la raíz y estuvo acompañado por aumento de la concentración de lignina (Zacheo, *et al.*, 1995). Además, los cambios en el contenido o composición de lignina afectan significativamente la reproducción de nemátodos agalladores. Esto ha sido demostrado en plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana*, en las que las modificaciones de la composición de lignina, consistentes en el incremento de 50 % de siringil e inhibición de la síntesis guayacil (ambos compuestos son monómeros constituyentes de lignina) de las células de los haces vasculares de la raíz, redujeron significativamente la reproducción del nemátodo, en comparación con las plantas no mutadas. Este comportamiento podría ser debido al incremento de siringil lignina (principal componente de las células de esclerénquima, cuyas paredes celulares se caracterizan por ser altamente impermeables) en los haces vasculares, lo que impidió el flujo de nutrientes al sitio de alimentación del nemátodo (Wuyts, *et al.* 2006).

En el presente estudio, la mayor actividad de las peroxidasas correspondió al estrato del sistema radical sin ápices; esto sugiere que la actividad de las peroxidasas es mayor en las células de esa región anatómica de la planta, posiblemente debido a la alta demanda de lignina para engrosar las paredes celulares secundarias. Al respecto, Cahill y McComb (1992) encontraron que el

contenido de lignina de las plántulas de *Eucalyptus* ssp. incrementó a lo largo del sistema radical, a partir del ápice; así, el contenido de lignina en los primeros 5 cm desde el ápice fue casi tres veces superior al del tejido comprendido en el primer centímetro de la base de la raíz.

El hecho de que la mayor actividad de las peroxidadasas, durante las 96 horas de evaluación, generalmente ocurriera en el vástago de las plantas inoculadas únicamente con el oomiceto y en el tratamiento sin inocular, en contraste con la menor actividad de los tratamientos con el nemátodo, indica que a pesar de que el estímulo se dio en la raíz, la resistencia al oomiceto también se manifiesta en el vástago de la planta, y que el nemátodo interfiere, de alguna manera, con el mecanismo de resistencia a *P. capsici* vía la actividad de las peroxidadasas. Al respecto, Ueeda *et al.* (2006) encontraron que el vástago de plantas de Chile CM-334 reacciona de forma hipersensitiva a la inoculación con *P. capsici*, comportándose como resistente al oomiceto. Estos resultados se contradicen con lo reportado previamente por Fernández-Pavía (1997), quien señaló que el follaje de las plantas CM-334 es susceptible a *P. capsici* y su resistencia se expresa solamente en la raíz. Esta discrepancia podría resolverse con estudios en los que se evalúe el comportamiento del vástago de las plantas de Chile CM-334, inoculado con *P. capsici*, y que permitan conocer con mayor profundidad cuáles son los mecanismos involucrados en la respuesta y contrastarlos con los de la raíz. Por otro lado, aunque las peroxidadasas son altamente catalíticas, tienen especificidad limitada y existen en múltiples isoformas, características que impiden entender claramente su función en las plantas.

En algunos casos, durante la patogénesis, el papel de las peroxidadasas no ha sido establecido inequívocamente y todavía no está claro si es causa o consecuencia de este fenómeno (Zacheo, *et al.*, 1993; Esnault y Chibar, 1997). Lo anterior, podría explicar en parte el incremento estadísticamente significativo de la actividad de las peroxidadasas en el vástago de las plantas inoculadas con la presencia de ambos patógenos al final del experimento, respecto a los tiempos previos de evaluación.

La resistencia del genotipo de Chile CM-334 a *P. capsici* está relacionada con incrementos de mRNA que codifica para la síntesis de PAL (Fernández-Pavía, 1997) y que la resistencia en follaje y raíz podría estar controlada por distintos genes. De ser así, dos mecanismos diferentes estarían confiriendo la resistencia, uno para la raíz y otro para el follaje (Walker, 1997). Lo anterior ayuda a explicar, parcialmente, por que las variaciones de la actividad de la PAL, de cada tratamiento en los diferentes muestreos fueron mayores en el vástago respecto al sistema radical. Sin embargo, generalmente la actividad de PAL fue mayor en las plantas inoculadas únicamente con el oomiceto, en cambio, fue menor y similar ($P \leq 0.05$) en las testigo y las inoculadas con el nemátodo (sólo o en combinación con el oomiceto). Éstos resultados están en concordancia con los obtenidos por Godínez-Vidal y colaboradores (2007), y permiten sugerir que *N. aberrans* puede generar, como es el caso de *M. incognita*, cambios en el patrón normal de expresión génica del hospedante, reprimiendo también la expresión del gen *PAL*. Lo anterior ha sido previamente documentado en interacciones compatibles planta-nemátodo (Goddijn *et al.*, 1993; Baldrige *et al.*, 1998).

La PAL está involucrada en los mecanismos de protección de la planta que incluyen la síntesis de compuestos con propiedades antimicrobianas, monómeros de la pared celular y de ácido salicílico (Cahill y McComb, 1992; Mozzetti *et al.*, 1995; Fernández-Pavía, 1997; Boudet, 2000; Dixon *et al.*, 2002; Shadle *et al.*, 2003). La posible inhibición de la expresión del gen *PAL*, encargado de codificar para la síntesis de la enzima PAL, favorecería la infección y reproducción del nemátodo. Al respecto, Cahill y McComb (1992) reportaron que el incremento de la actividad de la PAL en interacciones incompatibles planta-patógeno (*Eucalyptus calophylla-Phytophthora cinnamomi*) ocurrió en las primeras 48 h posteriores a la inoculación con el patógeno y estuvo acompañado con aumentos de la concentración de lignina y fenoles solubles; en los tiempos posteriores la actividad de la enzima decrece drásticamente a niveles significativamente inferiores a los presentados en las plantas sin inocular.

También se sabe de la acumulación de compuestos fenólicos, como respuesta a la infección por fitopatógenos, y se ha sugerido que juegan un papel importante

en la resistencia a la enfermedad (Hanlbrock y Scheel, 1989). Así, la resistencia de algunos cultivares de *C. annuum* a *P. capsici* se ha relacionado con cambios cuantitativos y cualitativos de los compuestos fenólicos (Candela *et al.*, 1995; Fernández-Pavía, 1997). Varios compuestos fenólicos, como el ácido *trans*-cinámico, el pirogalol, el ácido 2-OH naftoico y el etilgalato, son tóxicos a nemátodos (Mahajan *et al.*, 1985) y otros, como el ácido *trans*-cinámico, el *p*-hidroxibenzoico, vanílico, salicílico y *p*-coumárico, inhiben el crecimiento micelial de *P. capsici* (Candela *et al.*, 1995; Fernández-Pavía, 1997). Por otro lado, el chile CM-334 es susceptible a *N. aberrans* (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes, *et al* 2005, Godinez-Vidal *et al.*, 2007) pero resistente a especies de *Meloidogyne* y se sugiere que los compuestos fenólicos, principalmente el ácido clorogénico, puede estar involucrado en la resistencia al nemátodo (Pegard *et al.*, 2005). El ácido clorogénico así como otros compuestos fenólicos se forman a través de la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides, y han sido considerados como parte de los mecanismos de tolerancia de las plantas a la presencia de patógenos (Huang y Rhode, 1973; Shadle *et.al*, 2003; Pegard *et al.*, 2005; Wuyts *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos en la presente investigación indicaron que, frecuentemente, el mayor contenido de fenoles solubles totales en la raíz y el vástago se registró en las plantas inoculadas únicamente con *P. capsici* y las diferencias con los demás tratamientos fueron significativas ($P \leq 0.05$); en contraste, las plantas inoculadas únicamente con el nemátodo o en combinación con el oomiceto presentaron niveles significativamente ($P \leq 0.05$) menores respecto al testigo. Por lo anterior, y con base en lo señalado por Fernández-Pavía, respecto a que la resistencia de CM-334 se explica en parte por la presencia de fenoles que inhiben el crecimiento de *P. capsici*, es posible sugerir, con base en los resultados de la presente investigación, que *N. aberrans* genera cambios en la síntesis, tasa de renovación (o recambio) o ambas de los compuestos fenólicos, lo que modifica los tejidos de la planta resistente y propicia su transformación en un substrato adecuado para el establecimiento del oomiceto. El hecho de que el contenido de ácido clorogénico en las plantas, tanto de CM-334 como J.E. Parker, inoculadas con *N. aberrans*, fueron significativamente menores que los de las plantas de ambos genotipos de Chile

sin inocular, aunado a que la actividad de la PAL fue menor en la raíz de las plantas inoculadas con el nemátodo comparado con la registrada en las plantas sin inocular, fortalecen la hipótesis de que en interacciones compatibles el nemátodo interfiere con los mecanismos de protección y afectan de manera importante la ruta de los fenilpropanoides (Edens *et al.*, 1995; Wuyts *et al.*, 2006; Godínez-Vidal *et al.*, 2007).

En el presente estudio, la infección por *N. aberrans* redujo las respuestas de tolerancia a *P. capsici* en las plantas de chile CM-334, lo que sugiere que la pérdida o inhibición de la resistencia a *P. capsici* inducida por *N. aberrans*, puede, en parte, estar asociada con una disminución de la actividad enzimática de las peroxidasas y la PAL, y el contenido de fenoles solubles totales y ácido clorogénico. Además, la evidencia experimental obtenida sustenta la idea de que *N. aberrans* afecta las plantas del cv. CM-334 debido, en parte, a la disminución de la actividad enzimática de las peroxidasas y la PAL. Aunque no se cuenta en este momento con la evidencia concluyente, es posible especular que la disminución de la actividad enzimática podría ser un resultado de la represión en la expresión de los genes responsables de su codificación (Zavaleta-Mejía, 2002; Godínez-Vidal, 2007). Actualmente, se carece de información relacionada con el efecto de *N. aberrans* en la expresión génica de sus hospedantes; pero, no se descarta la posibilidad de que tenga un efecto similar al ejercido por *Meloidogyne* spp. Sin embargo, también cabe la posibilidad de que los mecanismos a través de los cuales *N. aberrans* reprime las respuestas de tolerancia del cv. CM-334, no involucren la represión de la expresión de los genes antes mencionados, sino que impacten en el nivel postranscripcional, a través de metabolitos (producidos directamente por el nemátodo u hospedante en respuesta a la presencia del nemátodo) que interfieran en la síntesis o actividad de las peroxidasas, la PAL, o acumulación y toxicidad de los compuestos fenólicos.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos bajo las condiciones en que se realizó la presente investigación permiten plantear las siguientes conclusiones:

1. En plantas de chile CM-334 la infección con *N. aberrans* altera el metabolismo de los compuestos fenólicos de la raíz y vástago a partir de las primeras 6 horas y hasta las 24 horas posteriores a la inoculación con *P. capsici*
2. La alteración del metabolismo de los compuestos fenólicos detectada como disminución de la concentración de fenoles solubles totales y de ácido clorogénico, es en parte debida a la disminución de la actividad de las enzimas peroxidasas y fenilalanina amonio liasa.
3. La intensidad de esas alteraciones en la raíz es mayor respecto a la del vástago.

VII. LITERATURA CITADA

- Alcantara, T.P.; P.W. Bosland. 1994. An inexpensive disease screening technique for foliar blight of chile pepper seedlings. *HortScience* 29:1182-1183.
- Alcázar, M.D.; A. Espín; M.E. Candela. 1993. Estudio ultraestructural de la infección de tallos de *Capsicum annuum* con distinta sensibilidad a *Phytophthora capsici*. *Fitopatología* 28: 77-85.
- Anterola, A. M.; N. G. Lewis. 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61: 221-294.
- Aragaki, M.; J.Y. Uchida. 2001. Morphological distinctions between *Phytophthora capsici* and *P. tropicalis* sp. nov. *Mycologia* 93: 137-145.
- Atkinson, H.J. 1994. Plant-nematode interactions: Molecular and genetic basis. In: K. Kohmoto; U.S. Singh; R.P. Singh (eds.). *Pathogenesis and host parasite specificity in plant diseases: histological, biochemical, genetic and molecular bases*. Pergamon Press. Oxford U.K. pp. 355-369.
- Baldrige, G.N.; O'Neill N.; 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.
- Bird, A.F.; B.R. Loveys. 1980. The involvement of cytokinins in a host-parasite relationship between the tomato (*Lycopersicon esculentum*) and a nematode (*Meloidogyne javanica*). *Parasitology* 80:497-505

- Black, L. L., S. K. Green, G. L. Hartman, J. M Poulos. 1991. Pepper Diseases: A Field Guide. Asian Vegetable Research and Development Center, AVRDC Publication 91, 347.
- Boudet, A. M. 2000. Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 81-96.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Cahill, D.M.; J. A. McComb. 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.; M.D. Alcázar; A. Espín; C. Egea; L. Almela. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44: 116-123.
- Cardona, C.H. 1985. Problemática de la producción de chile en el estado de Zacatecas y sus repercusiones en las intermediaciones del seguro agrícola por siniestros de plagas y enfermedades. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. 81.
- Chance, B.; A.C. Maehly. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.
- Chitwood, D.J.; W.R. Lusby. 1991. Metabolism of plant sterols by nematodes. *Lipids* 26: 619-627.

- Cramer, C.L.; D. Weissenborn; C.K. Cottingham; C.J. Denbow; J.D. Eisenbac; D.N. Radin; X. Yu. 1993. Regulation of defense-related gene expression during plant-pathogen interactions. *Journal of Nematology* 25: 507-518.
- Del Prado-Vera, C.I. 1985. Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. En: Mendoza, N.M.; I.J. Thomason (eds.). *Fitonematología Avanzada*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. De México. pp. 57-65.
- Dixon, R.A. 2001. Natural products and disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- Dixon, R.A.; L. Achnine; P. Kota; C.J Liu; M.S.S. Reddy; L. Wang. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence: a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3: 371-390.
- Edens, R.M.; S. C. Anand; R. I. Bolla. 1995. Enzymes of the Phenylpropanoid Pathway in Soybean Infected with *Meloidogyne Incognita* or *Heterodera Glycines*. *Journal of Nematology*. 27 (3): 292-303.
- Egea, C.; M.D. Alcázar; M.E. Candela. 1996. Capsidiol: its role in the resistance to *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 98: 737-742.
- Egea, C.; A.A. Sid; M.E. Candela. 2001. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 158: 151-158
- Elliot, Ch.G. 1983. Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*. Pp. 71-80. In *Phytophthora*. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. D.C. Erwin, S. Bartniki-Garcia and P.H. Tsao eds. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota.

- Esnault R.; Chibar R.N. 1997. Peroxidases and plant defense. *Plant Peroxidases. Newslett.* 10: 34-41.
- Fernández-Pavia, S. 1997. Host-Pathogen interactions in the root rot resistant *Phytophthora capsici* / *Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph. D. Dissertation. New Mexico State University.
- Fernández-Pavia, S.; C.M. Liddell. 1997. Resistance of *Capsicum annuum* CM-334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. *Phytopathology* 87: 529.
- Friend, J.; S.B. Reynolds; M.A. Aveyard. 1973. Phenylalanine ammonia lyase, Chlorogenic acid and lignin in potato tuber tissue inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiology Plant Pathology* 3: 495-507.
- Fritzemeier, K.H.; C. Cretin; E. Kombrink; F. Rohwer; J. Taylor; D. Scheel; K. Hahlbrock. 1987. Transient induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate: CoA ligase mRNA in potato leaves infected with virulent and avirulent races of *Phytophthora capsici*. *Plant Physiology* 85:34-41.
- Gayoso, C.; F. Pomar; F. Merino; M.A. Bernal. 2004. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae* 102: 1-13.
- Goddijn, O.J.M.; K. Lindsey; F.M. Van der Lee; L.C. Klap; P.C. Sijmons. 1993. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harboring promoter-gus A fusion constructs. *Plant Journal* 4: 863-873.
- Godelieve, G.; C. Fenoll. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review Phytopathology*. 40 199-219.

- Godinez-Vidal, D.; M. Rocha-Sosa; E. B. Sepúlveda-García; J. Lara-Reyna; R. Rojas-Martínez; E. Zavaleta-Mejía. 2007. Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli cm-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology*. In press
- Gómez-Vásquez R.; R. Day; H. Buschmann; S. Randles; J.R. Beeching; R.M Cooper. 2004. Phenylpropanoids, Phenylalanine Ammonia Lyase and Peroxidases in Elicitor-challenged Cassava (*Manihot esculenta*) Suspension Cells and Leaves. *Annals of Botany* 94: 87 – 97.
- Goverse A.; H. Overmars; J. Engelbertink; A. Schots; J. Bakker; J. Helder. 2000. Both induction and morphogenesis of cyst nematode feeding cells are mediated by auxin. *Mol. Plant-Microbe Interact* 13:1121–29.
- Hahlbrock, K.; D. Scheel. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 40: 347-369.
- Hernández, H.J.; G.G. Arcos; L.N. Becerra. 1991. Identificación de daños causados por fitopatógenos en el cultivo de chile jalapeño. Congreso Nacional de Fitopatología. Sociedad Mexicana de Fitopatología. p. 25.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H. 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* 42: 462-468.
- Huang, C.L.; R.A. Rhode. 1973. Phenol accumulation related to resistance in tomato to infection by root-knot and lesion nematodes. *Journal of Nematology* 5: 253-258.
- Hutangura, P.; U. Mathesius; M.G.K. Jones; B.G. Rolfe. 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* 26:221–31.

Inserra, N.; N. Vovlas; G. Griffin; J. Anderson. 1983. Development of the false root-knot nematode, *Nacobbus aberrans*, on sugarbeet. *Journal of Nematology* 15: 288-296.

Jones D.H. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and role in plants development. *Phytochemistry* 23: 1349-1359.

Jones, J.G.K. 1981. Host cell responses to endoparasitic nematode attack: Structure and function of giant cells and syncytia. *Annals Applications in Biology* 97: 223-229.

Kim, J.; B. Kook. 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.

Kochba, J.; R.M. Samish. 1972. Level of endogenous cytokinins and auxin in roots of nematode-resistant and susceptible peach rootstocks. *Journal of American Society Horticulture Science*. 97:115–119

Lagrimini L.M.; V. Gingas; F. Finger; S. Rothstein; Liu T-T. 1997. Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase. *Plant Physiology* 114: 1187 - 1196.

Lizzi, Y.; J.P. Roggero; P.J. Coulomb. 1995. Behavior of the phenolic compounds on *Capsicum annuum* leaves infected with *Phytophthora capsici*. *Journal Phytopathology* 143: 619-627.

- Mahajan, R.; S. Prabhsharan; L.B. Krishan. 1985. Nematicidal activity of some phenolic compounds against *Meloidogyne incognita*. Review Nematology 8: 161-164.
- Manzanill-López R.H., M.A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R.N. Inserra, P.S. Lehman, I.C. Del Prado-Vera, R.M. Souza, K. Evans. 2002. El género *Nacobbus* Thorne Allen, 1994 (Nematoda: Pratylenchidae): Sistemática, distribución, biología y manejo. Nematropica 32, 149-227.
- Martinez-Tellez, M.A., Lafuente MT, 1997. Effect of high temperature conditioning on ethylene, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and polyphenol oxidase in flavedo of chilled "Fortune" mandarin fruit. Journal of Plant Physiology 150, 674-678.
- Mathesius, U.; H.R.M Schlaman; H.P Spaink; C. Sautter; B.G. Rolfe; M.A. Djordjevic. 1998. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoides and derivatives of chitin oligosaccharides. Plant Journal 14:23–34.
- Mitchell, H.J.; S.A. Hall; R. Stratford; J.L. Hall; M.S. Barber. 1999. Differential induction of cinnamyl alcohol dehydrogenase during defensive lignification in wheat (*Triticum aestivum* L.): characterization of the major inducible form. Planta 208: 31-37.
- Mozzetti, C.L.; G. Ferraris; A. Tamietti. 1995. Variation in enzyme activities in leaves and cell suspensions as markers of incompatibility in different *Phytophthora*-pepper interactions. Physiological and Molecular Plant Pathology 46: 95-107.
- Niebel, A.; B. Gheysen; M. Van Montague. 1994. Plant-cyst nematode and plant - root -knot nematode interactions. Parasitology Today 10: 424-430.

- Nugroho, K.H.; M.C. Verberne; R. Verpoorte. 2002. Activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 755-760.
- Opperman, H.; G. Taylor; M. Conkling. 1994. Root-knot nematode-directed expression of a plant root-specific gene. *Science* 263: 221-223.
- Pegard, A.; A. Brizzard; O. Fazari; P. Soucaze; C. Djian-Caporalino. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95, 2: 158-165.
- Pérez M (1985) Herencia de la resistencia a la marchitez causada por tres cepas y su mezcla del hongo *Phytophthora capsici* Leo. en cuatro materiales de Chile *Capsicum annuum*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México
- Pollock, C.J.; R.B. Drysdale. 1976. The role of the phenolic compounds in the resistance of tomato cultivars to *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathology Z* 86: 56-66.
- Ramirez, V.J. 1998. Enfermedades fungosas del cultivo de Chile. En: Enfermedades de las hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Sinaloa, México. p. 225.
- Sandoval, B.J. 1993. Chile. En: Enfermedades infecciosas de los cultivos. Díaz Franco. P. 125-136.
- SAS Institute. 1999-2000. SAS user's guide: Statistics. Version 8.1. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA. 1290.
- Shadle G. L.; S. V. Wesley; K. L. Korth; F. Chen; C. Lamb; R. A. Dixon. 2003. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco

- with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 64: 153-161.
- Shibaoka H. 1994. Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules: alterations in the crosslinking between microtubules and the plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 45:527–44.
- Sijmons. P.C. 1993. Plant-nematode interactions. *Plant Molecular Biology*. 23: 917-931.
- Sollars, J.R.; M.E. Waugh; K. Onsurez; C.L. Biles; C.M. Liddell. 1993. Phenolic production and the attachment of *Phytophthora capsici* zoospores to wounded roots of *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 83 1414 1415.
- Thipayapong, P.; M.D. Hunt.; J.C. Steffens. 1995. Systemic wound induction of potato (*Solanum tuberosum*) polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 40: 673-676.
- Trujillo-Viramontes, F.; E. Zavaleta-Mejía, R.I. Rojas-Martínez, J. Lara. 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 (1): 37-44.
- Ueeda, M., M. Kubota; K.Nishi. 2006. Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annum* cv. SCM334. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67: 149-154.
- Vargas, E.M.T.; E. Zavaleta-Mejía; A.A.M Hernández. 1996. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en Chile (*Capsicum annum* L) serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica*. 26: 159-166.

- Vercauteren, I.; E. Van Der Schueren; M. Van Montagu; G. Gheysen. 2001. *Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematodes. *Molecular Plant-Microbe Interact.* 14: 288–99.
- Walker, S.J. 1997. A comparative study of the inheritance of Phytophthora root rot and foliar blight resistance in *Capsicum annuum*. Master Thesis. New Mexico State University. USA.
- Waterman, P.G.; S. Mole. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Ed. Blackwell Scientific Publications. Oxford, U.K. 238p.
- Weissenborn, D.L.; C.J. Denbow, M. Laine, S.S. Lang, Z. Yang, X. Yu, C.L. Cramer. 1995. HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins: Molecular specialization within a complex pathway. *Physiology Plantarum.* 93: 393-400.
- Williamson, V.M.; R.S. Hussey. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell.* 8: 1735-1745.
- Wuyts, N.; G. Lognay; R. Swennen; D.De Waele. 2006. Nematode infection and reproduction in transgenic and mutant *Arabidopsis* and tobacco with an altered phenylpropanoid metabolism. *Journal of Experimental Botany* 57, 11: 2825-2835.
- Yoshioka H.; N. Doke. 1994. Rapid accumulation of Phenylalanine ammonia-lyase mRNA and 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Co A reductase mRNA by protein synthesis inhibitors. *Plant Cell Physiology* 35(8): 1257-1260.
- Zacheo, G.; C. Orlando; T. Bleve-Zacheo. 1993. Characterization of anionic peroxidases in tomato isolines infected by *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology.* 25 (2): 249-256.

Zacheo, G.; T. Bleve-Zacheo; D. Pacoda; C. Orlando; D.Rurbin. 1995. The association between heat-induced susceptibility of tomato to *Meloidogyne incognita* and peroxidase activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 46: 491-507.

Zavaleta-Mejía, E. Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nemátodos fitoparásitos, una hipótesis. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 118-122.

VIII. APÉNCIDE

Apéndice 1. Determinación de proteína por el método de Bradford

REACTIVOS:

- Albúmina sérico-bovina (Sigma)
- Azul brillante de Coomassie G 250 (Sigma)
- Amortiguador Tris-HCl pH 7.1, PVP al 1% (p/v)
- Amortiguador de acetato de amonio 0.1M, pH 7.7 y β -mercaptoetanol 0.02 M
- Etanol al 98% (J. Baker)
- Ácido fosfórico

PROCEDIMIENTO

Preparación del reactivo de Bradford: agregar 50 mL de etanol al 98 % en agua (v:v) a 100 mg de Azul Brillante de Coomassie G 250, hasta disolver. Una vez disuelto agregar 100 mL de ácido fosfórico y aforar a 1 L con agua desionizada y filtrar.

Cuerva de calibración: Pesar 0.01 g de albúmina sérico-bovina, disolver y aforar a 10 mL con amortiguador Tris HCl pH 7.1 para la determinación de peroxidases, o amortiguador acetato de amonio 0.1M, pH 7.7 y β -mercaptoetanol 0.02 M, para la determinación de la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL). Para obtener la curva de calibración los reactivos deben mezclarse como se indica en el Cuadro 1A.

Medir la absorbancia de cada muestra, correspondiente a una concentración de proteína, en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm en el modo de sensibilidad alta. Realizar la calibración del espectrofotómetro, a absorbancia cero, con 100 μ L del amortiguador y 5 mL del reactivo de Bradford.

Cuadro 1 A. Reactivos y secuencia de mezclado.

| Reactivo de Bradford (mL) | Amortiguador (μ L de Tris-HCl o acetato de amonio) | Albúmina sérico-bovina (μ L) | Concentración de albúmina sérico-bovina (μ g) |
|---------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------|
| 5 | 100 | 0 | 0 |
| 5 | 98 | 2 | 2 |
| 5 | 94 | 6 | 6 |
| 5 | 90 | 10 | 10 |
| 5 | 75 | 25 | 25 |
| 5 | 50 | 50 | 50 |
| 5 | 30 | 70 | 70 |
| 5 | 0 | 100 | 100 |

Las Figuras 1A y 2A fueron seleccionadas como curvas representativas con los ajustes de regresión para cuantificar las proteínas; se obtuvo una curva similar, cada vez que se determinó la proteína en las muestras de tejido.

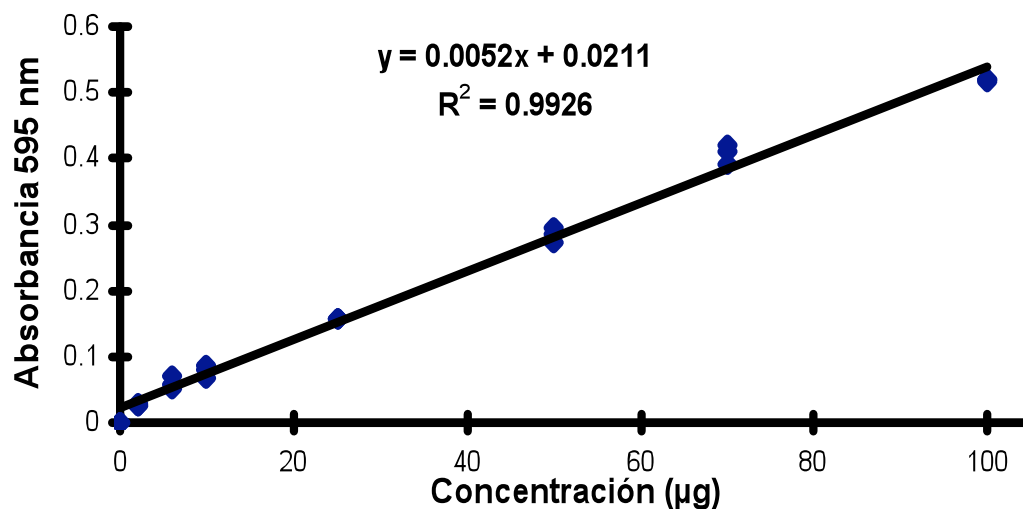


Figura 1A. Curva estándar para la determinación de proteína total y la actividad de peroxidasa, preparada con amortiguador Tris HCl pH 7.1.

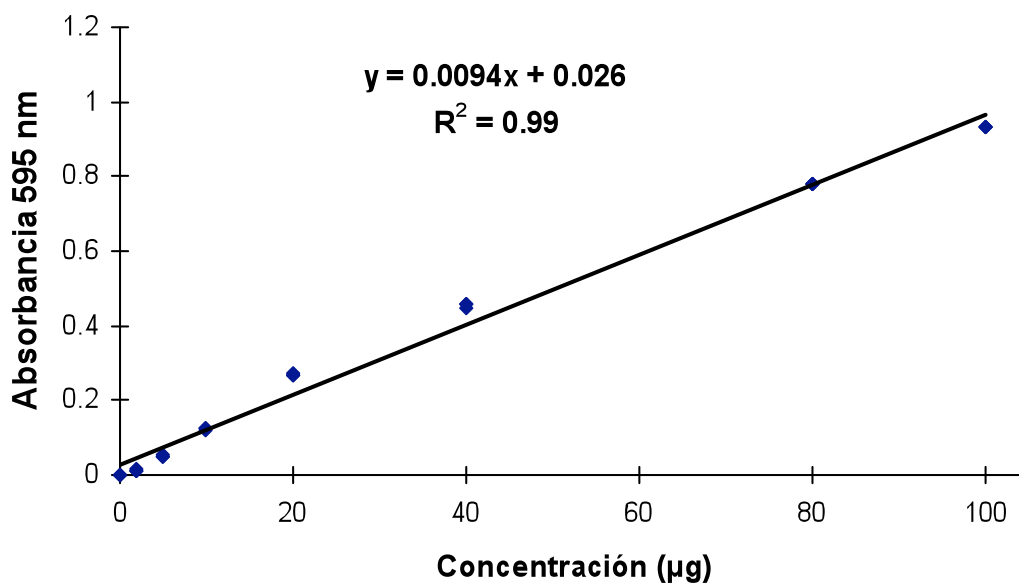


Figura A2. Curva estándar para la determinación de proteína total y la actividad de PAL, preparada con amortiguador de acetato de amonio 0.1M, pH 7.7 y β -mercaptoetanol 0.02 M.

Apéndice 2. Preparación de la curva estándar con ácido *trans*-cinámico para determinar la actividad de la PAL

REACTIVOS:

- Ácido *trans*-cinámico (SIGMA)
- Amortiguador borato de sodio 0.1M, pH 8.8

PROCEDIMIENTO

Preparar una solución 1000 μM de ácido *trans*-cinámico (PM: 148.16) en amortiguador de borato de sodio 0.1 M, pH 8.8 (**Solución A**). Preparar, a partir de la solución A una solución diluida 50 veces (20 μM), con 1 mL de ésta y aforada a 50 mL con el mismo amortiguador, la solución se diluye 50 veces (**Solución B**).

Preparar una curva estándar con ácido *trans*-cinámico, para determinar la actividad de la PAL, con concentraciones crecientes, a partir de 0 y hasta 2.5 μM :

- a) Aforar 0.2 mL de la solución B a 25 mL con el amortiguador de borato de sodio; con lo que, la solución se diluye 1:125 y la concentración final fue 0.16 μM .
- b) Aforar 0.625 mL de la solución B a 25 mL con el amortiguador de borato de sodio; con lo que, la solución se diluye 1:40 y la concentración final fue 0.5 μM .
- c) Aforar 1.25 mL de la solución B a 25 mL con el amortiguador de borato de sodio; con lo que, la concentración se diluye 1:20 y la concentración final fue 1 μM .
- d) Aforar 1.875 mL de la solución B a 25 mL con el amortiguador de borato de sodio; con lo que, la concentración se diluye 1:15 y la concentración final fue 1.5 μM .
- e) Aforar 2.5 mL de la solución B a 25 mL con el amortiguador de borato de sodio; con lo que, la concentración se diluye 1:10 y la concentración final fue 2 μM .
- f) Aforar 3.125 mL de la solución B a 25 mL con el amortiguador de borato de sodio; con lo que, la concentración se diluye 1:8 y la concentración final fue 2.5 μM .

Medir la absorbancia de cada solución en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 290 nm en el modo de sensibilidad media. Calibrar a cero de absorbancia con el amortiguador borato de sodio.

La Figura 3A fue seleccionada como curva representativa, con el ajuste de regresión, para cuantificar la concentraciones de ácido *trans*-cinámico, se generó una curva similar cada vez que se determinó la actividad de la PAL en el tejido.

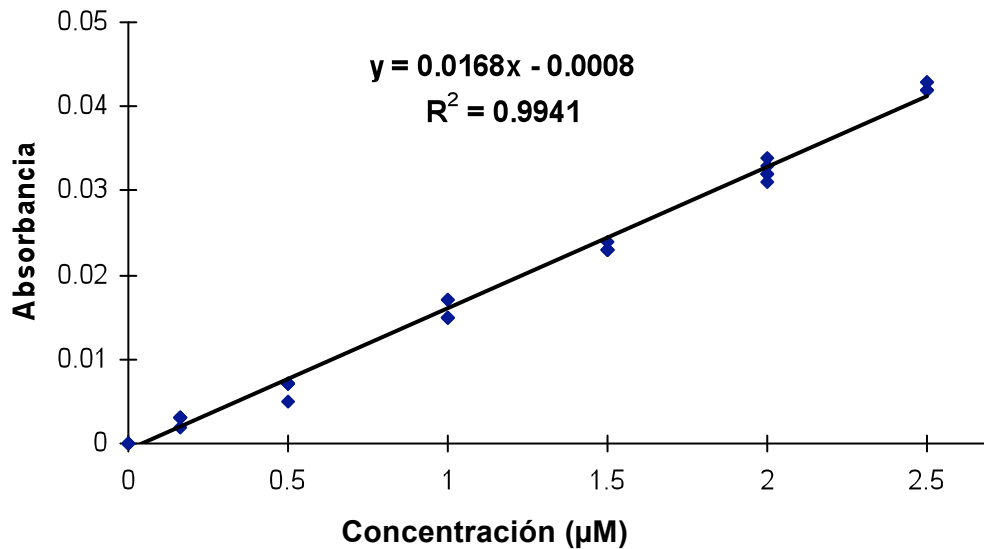


Figura 3A. Curva estándar para la determinación de ácido *trans*-cinámico y la actividad de PAL.

Apéndice 3. Preparación de la curva estándar con ácido tánico para la cuantificación de fenoles solubles totales

REACTIVOS:

- Ácido tánico (SIGMA)
- Acetona al 98% (J.Baker)
- Reactivo de Folin Ciocalteu (SIGMA)
- Na₃CO₃ al 10%

PROCEDIMIENTO:

Disolver 100 mg de ácido tánico en 10 mL de acetona (**Solución A**). Aforar 100 µL de ésta solución a 10 mL con acetona (**Solución B**, con contenido final de 1000 µg). Preparar la curva estándar de ácido tánico con diferentes concentraciones:

- Aforar 50 µL de la solución B a 10 mL con acetona (contenido final de 5 µg).
- Aforar 100 µL de la solución B a 10 mL con acetona (contenido final de 10 µg).
- Aforar 200 µL de la solución B a 10 mL con acetona (contenido final de 20 µg).
- Aforar 400 µL de la solución B a 10 mL con acetona (contenido final de 40 µg).
- Aforar 600 µL de la solución B a 10 mL con acetona (contenido final de 60 µg).
- Aforar 800 µL de la solución B a 10 mL con acetona (contenido final de 80 µg).
- Aforar 1 mL de la solución B a 10 mL con acetona (contenido final de 100 µg).
- Aforar 1.2 mL de la solución B a 10 mL con acetona (contenido final de 120 µg).
- Aforar 1.4 mL de la solución B a 10 mL con acetona (contenido final de 140 µg).
- Aforar 1.6 mL de la solución B a 10 mL con acetona (contenido final de 160 µg).
- Aforar 2 mL de la solución B a 10 mL con acetona (contenido final de 200 µg).

Agregar agua desionizada a 100 μL de cada solución, con las diferentes concentraciones, para obtener un volumen total de 17 mL. Luego, agregar 1 mL del reactivo Folin Ciocalteu (SIGMA), homogenizar y adicionar 2mL de Na_3CO_3 al 10 % en agua (p:v). Colocar las muestras en la oscuridad durante 2 horas, para permitir que se desarrolle la coloración azul, dependiente de la concentración de taninos. Determinar la absorbancia en un espectrofotómetro, a 760 nm en el modo de sensibilidad media, después de ajustar la absorbancia inicial a cero con agua desionizada.

La Figura 4A fue seleccionada como curva representativa, con el ajuste de regresión, para cuantificar la concentraciones de taninos en el tejido.

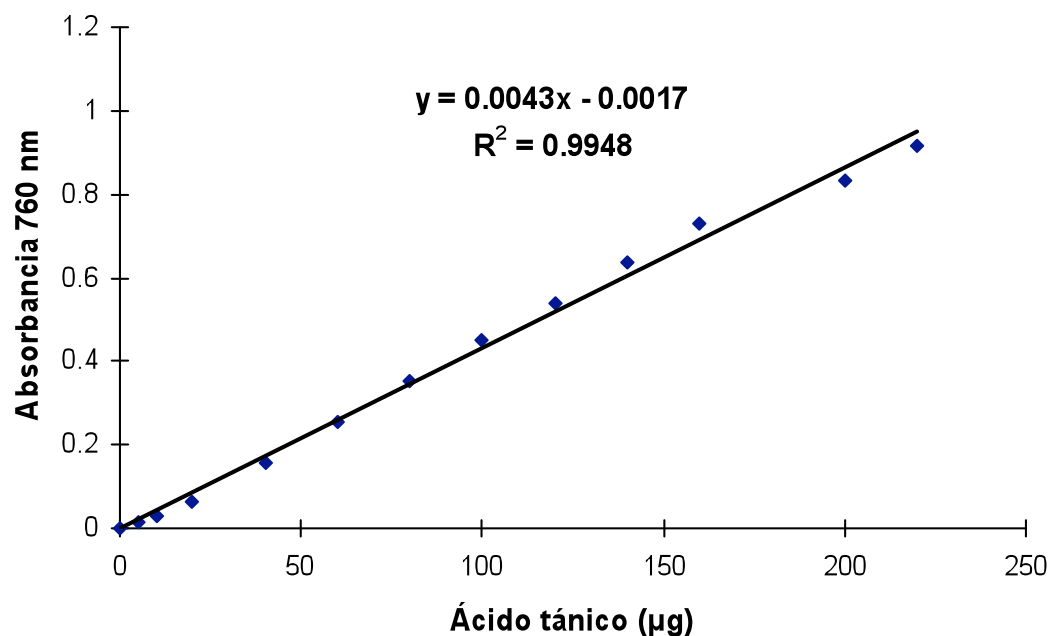


Figura 4A. Curva estándar para la determinación de fenoles.

Apéndice 3. Cromatograma del ácido clorogénico estándar

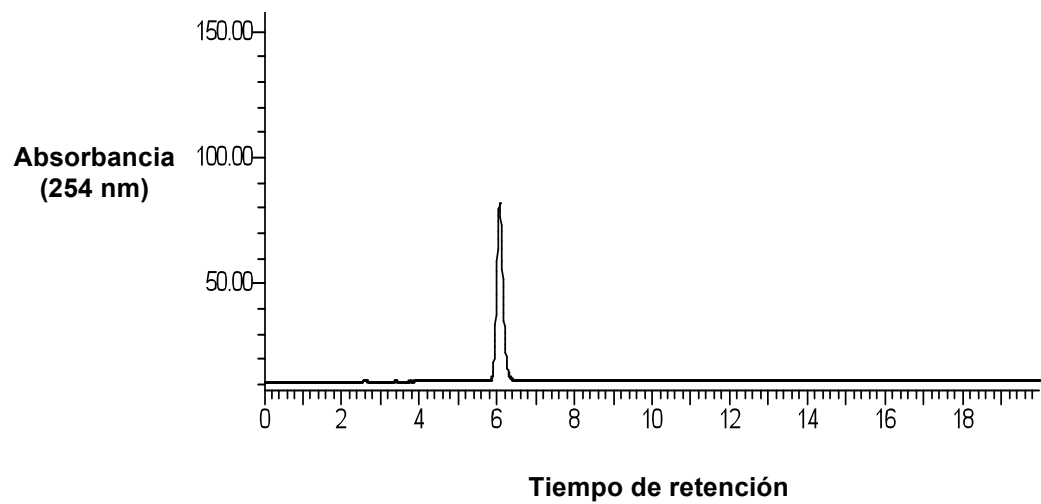


Figura 5A. Cromatograma del ácido clorogénico estándar