



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**“CAMBIOS EN LA RUTA MEVALÓNICA COMO  
RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Nacobbus*  
*aberrans* EN CHILE CM-334”**

**DAMARIS GODINEZ VIDAL**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

---

---

El presente proyecto de investigación titulado: “CAMBIOS EN LA RUTA MEVALÓNICA COMO RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Nacobbus aberrans* EN CHILE CM-334”, realizado por la alumna: **Damaris Godinez Vidal**, ha sido aprobado por el Comité Particular para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**  
**ESPECIALISTA EN FITOPATOLOGÍA**

V.O.

**Consejero**

---

**Dra. Emma Zavaleta Mejía**

**Asesor**

---

**Dr. Mario Rocha Sosa**

**Asesor**

---

**Dra. Patricia León Mejía**

**Asesor**

---

**Dra. Reyna I. Rojas Martínez**

**Asesor**

---

**Dr. Lorenzo Guevara**

Montecillo, Texcoco, Estado de México a 23 de noviembre de 2010.

# **“CAMBIOS EN LA RUTA MEVALÓNICA COMO RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *Nacobbus aberrans* EN CHILE CM-334”,**

Damaris Godinez Vidal, Dra.  
Colegio de Postgraduados, 2010

Se determinó la acumulación de transcritos de los genes *Hmg* (*Hmg1*, *Hmg2* y *Hmg3*, responsables de la regulación de la biosíntesis de esteroides y fitoalexinas), *FPPS* (farnesil pirofosfato sintasa), *SS* (escualeno sintasa, implicado en la síntesis de esteroides) y *EAS* (5-epiaristológeno sintasa, responsable de la síntesis de fitoalexinas), la actividad enzimática de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA-reductasa (HMGC<sub>o</sub>A-r) y *EAS*, y el contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas y no infectadas por *Nacobbus aberrans*. Las plantas se inocularon con 2000 J<sub>2</sub> de *N. aberrans* o se transplantaron en suelo naturalmente infestado por éste, y se mantuvieron en cámaras de crecimiento e invernadero, respectivamente. A los 0, 2, 7, 14 y 21 días después de la inoculación (ddi) y a los 0, 7, 14, 21 y 28 días después del trasplante (ddt), se analizó por RT-PCR la acumulación de mRNA de los genes mencionados y se determinó la actividad HMGC<sub>o</sub>A-r y *EAS*. En plantas infectadas por el nematodo, la acumulación de transcritos de *Hmg1* fue menor que *Hmg2* a los 2 ddi; mientras que a los 21 ddi los transcritos de *Hmg1* fueron mayores que *Hmg2* en comparación con las plantas control; la mayor acumulación de *Hmg1* se asoció con un incremento en la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r y la presencia del estadio de hembra inmadura. La acumulación de *EAS* en las raíces infectadas por *N. aberrans* generalmente se relacionó con un incremento en la actividad de *EAS*, aunque el incremento no fue directamente proporcional; la mayor actividad de *EAS* se registró de los 14 a los 21 días posteriores a la exposición de las plantas al nematodo. *Hmg3* y *SS* se acumularon constitutivamente. En presencia del nematodo *FPPS* presentó el mayor incremento a los 21 ddi. El contenido de capsidiol en las raíces de plantas inoculadas con 2000 J<sub>2</sub> y mantenidas en cámaras de crecimiento fue menor que el encontrado en las raíces no inoculadas, tal reducción fue significativa a los 7 (Tukey,  $\alpha = 0.01$ ) y 14 ddi (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ); en plantas provenientes de invernadero, las diferencias fueron significativas a los 14 (Tukey,  $\alpha = 0.01$ ) y 21 ddt (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). El capsidiol causó la inmovilización de los J<sub>2</sub> de *N. aberrans* y ésta fue mayor en la medida en que se incrementó la concentración (desde 0.01 hasta 1.50  $\mu\text{g}$  de capsidiol/mL) y el tiempo de exposición a la fitoalexina. Este efecto en los juveniles se observó desde las 24 h de exposición al compuesto y fue más evidente a las 72 h, tiempo en el que se encontraron diferencias altamente significativas entre todas las concentraciones probadas en comparación con el testigo (Tukey,  $\alpha = 0.0001$ ). Sin embargo, los J<sub>2</sub> recobraron su movilidad cuando el capsidiol fue reemplazado por agua, lo que sugiere que el efecto de la fitoalexina fue sólo nematostático. Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que *N. aberrans* modifica la expresión de algunos genes de la ruta mevalónica abatiendo la acumulación de capsidiol y propiciando un abastecimiento adecuado de esteroides para proveerse de condiciones favorables para su establecimiento y desarrollo.

Palabras clave: *Nacobbus aberrans*, *Capsicum annuum* CM-334, Ruta mevalónica, Capsidiol.

**“MEVALONIC PATHWAY CHANGES INDUCED BY *Nacobbus aberrans*  
IN CHILLI CM-334”**

Damaris Godinez Vidal, Dra.  
Colegio de Postgraduados, 2010

Transcripts accumulation of the *Hmg* (*Hmg1*, *Hmg2* and *Hmg3*, responsible for the regulation of sterols and phytoalexins synthesis), *FPPS* (farnesyl pyrophosphate synthase), *SS* (squalene synthase, involved in sterols synthesis) and *EAS* (5-epiaristolochene synthase, responsible for phytoalexins synthesis) genes, enzyme activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGC<sub>oA</sub>-r) and *EAS*, and capsidiol content in roots of chilli pepper CM-334 infected and non-infected by *Nacobbus aberrans* were determinate. Plants were inoculated with 2000 J<sub>2</sub> of *N. aberrans* or transplanted in soil naturally infested, and kept in growth chambers and greenhouse, respectively. At 0, 2, 7, 14 and 21 days after inoculation (dai) and at 0, 7, 14, 21 and 28 days after transplanting (dat) the mRNA accumulation of genes mentioned above was analyzed by RT-PCR, and HMGC<sub>oA</sub>-r and *EAS* activity were determinate. In nematode infected plants, the accumulation of *Hmg1* transcripts was lower than those of *Hmg2* at 2 dai, but at 21 dai the *Hmg1* transcripts were higher than those of *Hmg2* compared to the control plants; at this time the largest accumulation of *Hmg1* was associated with an increase in activity of HMGC<sub>oA</sub>r and the presence of the immature female stage. *EAS* accumulation in roots infected by *N. aberrans* usually was associated with an increase in *EAS* activity, although the relationship was not directly proportional; the higher activity of *EAS* was observed at 14 and 21 days after plants were exposed to the nematode. Accumulation of *SS* and *Hmg3* was constitutive. In presence of the nematode, *FPPS* showed the highest increase at 21 dai. Capsidiol content in roots of plants inoculated with 2000 J<sub>2</sub> and maintained in growth chambers, was lower than in the non-inoculated ones, this reduction was significant at 7 (Tukey,  $\alpha=0.01$ ) and 14 (Tukey,  $\alpha=0.05$ ) dai; in plants grown in greenhouse, differences were significant at 14 (Tukey,  $\alpha=0.01$ ) and 21 dat (Tukey,  $\alpha=0.05$ ). Capsidiol caused the immobilization of J<sub>2</sub> of *N. aberrans* and the effect was greater as the time of exposure and capsidiol concentration increased (from 0.01 to 1.50  $\mu\text{g}$  of capsidiol/mL). Juvenile's immobilization was observed since 24 h of exposure being more evident at 72 h; differences were highly significant at all tested concentrations in comparison to the control (Tukey,  $\alpha=0.0001$ ). However, the phytoalexin effect was only nematostatic since J<sub>2</sub> recovered mobility when capsidiol was replaced by water. The results of this study suggest that *N. aberrans* modifies the expression of some genes of the mevalonic pathway by lowering accumulation of capsidiol and promoting an adequate supply of sterols to provided favorable conditions for its establishment and development.

Key words: *Nacobbus aberrans*, *Capsicum annum* CM-334, Mevalonic pathway, Capsidiol.

## **DEDICATORIA**

**A Dios por la vida que me ha dado y por darme la oportunidad de mejorar cada día**

**Porque has complementado mi vida,  
Porque has estado en los buenos y malos momentos,  
Porque asientes pocas veces y me contradices muchas,  
Por tu amor cariño...**

**Gracias por compartir este breve espacio de nuestras vidas...  
En este tiempo de nubarrones y sirenas  
tu cariño me motivó a culminar esta labor que tanto amo con más  
convicción... con más aínco... con más entusiasmo...**

**Gracias por caminar a mi lado...**

**A ti mi adorado Paco, con todo mi amor**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al pueblo de México por su apoyo a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que hicieron posible mis estudios de Doctorado.

Al CONACYT, quién institucionalmente financió mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Posgraduados, en especial al Instituto de Fitosanidad y todo su personal, por el apoyo brindado durante mi estancia en el postgrado.

Al Instituto de Biotecnología-UNAM, principalmente a los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, por su amistad y apoyo durante la realización de la investigación.

Al CINVESTAV-IPN, especialmente a los integrantes del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Naturales de Plantas, por amistad y apoyo durante la estancia de investigación.

A la Dra. Emma Zavaleta Mejía, por la gran experiencia de vida brindada durante el desarrollo de mi vida profesional.

Al Dr. Mario Rocha Sosa, por su gran apoyo durante el curso de mi formación y por sus siempre acertadas sugerencias. A ti querido Sensey, mil gracias.

Al Dr. Edmundo Lozoya Gloria, por su siempre amable disposición, sus acertadas observaciones y su enorme apoyo durante el transcurso de la investigación.

Al Dr. R. Marcos Soto Hernández, por sus sugerencias, apoyo y su siempre amable disposición durante la realización de la investigación.

A la Dra. Reyna I. Rojas Martínez, por enseñarme a tener siempre otra perspectiva y visión de las cosas.

A mi muy querido amigo MC. Edgar Baldemar Sepúlveda García, quién me enseñó a trabajar con una sonrisa en los labios, quién me apoyo en los buenos y malos momentos durante mi formación y sin cuya ayuda, además de sus atinadas sugerencias, no hubiera podido concluir esta investigación. A ti mi querido Baldemarcito, muchas gracias.

A quienes escapan de mi mente siempre volátil. Muchas gracias.

# Gracias por formar parte de esta etapa de mi vida...

Sensey Rochita Mami Zavaleta **Adorado kikiriboo Paco** Doc Edmundo  
Marthita Doc Soto Hermanaka Axelle Rouse Mamá Julia & Papá Victor  
Pecoso Chris Tía Chochil Mamá Tere & Papá Francisco Comadre Ale Amiguis  
Baldemarcito **Pequeño Alex** Chamaca Ivonne Brother Ale Rodri  
Miss Celina Amiguis Ruth Teacher César Pollo Henning Teacher Alejandro  
Oso Hermman Srita. Spongospora Diana Ana Karetina Amiguis Eleniux Sra.  
Sc Yolis Amiguis Olguiux **Michael†** **My Sons** Jacinta & Copérnico  
Hércules Ceres Atenea Ptolomeo Pericles Minerva Aquiles Roselind &  
Euclides Sócrates Pandora Aracne Neptuno.

Para mis pequeños ángeles que sin hacer preguntas y sin importar nada  
siempre estuvieron ahí... Gracias por su cariño incondicional...

## NOTA

El presente trabajo fue realizado como parte del proyecto “**ROMPIMIENTO DE RESISTENCIA A *Phytophthora capsici* POR *Nacobbus aberrans* EN CHILE CM-334**” financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 28594-b).



# CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN GENERAL</b> .....	iii
<b>GENERAL SUMMARY</b> .....	iv
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	xiv
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. OBJETIVO</b> .....	3
<b>III. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
Rompimiento de Resistencia a <i>P. capsici</i> en Chile CM-334 .....	5
Reprogramación de la expresión génica por nematodos fitopatógenos .....	6
Reprogramación de la expresión génica por <i>N. aberrans</i> en Chile CM-334 .....	9
Biosíntesis de isoprenoides en plantas .....	10
3-Hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa: Actividad y regulación .....	12
Farnesil difosfato sintasa: su papel en la ruta MEV .....	16
Escualeno sintasa y biosíntesis de esteroides .....	17
5-Epi-aristoloqueno sintasa y biosíntesis de capsidiol .....	19
5-Epi-aristoloqueno hidroxilasa .....	21
Metabolitos secundarios asociados con la resistencia a nematodos .....	22
<b>IV. LITERATURA CITADA</b> .....	25
<b>CAPÍTULO II. ACUMULACIÓN DE CAPSIDIOL EN RAÍCES DE CHILE CM-334 INFECTADAS POR <i>Nacobbus aberrans</i> Y SU EFECTO EN JUVENILES DEL SEGUNDO ESTADIO</b> .....	37
<b>RESUMEN</b> .....	37
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	38
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Interacción de las plantas de Chile con el nematodo .....	39
Extracción, detección y cuantificación de capsidiol .....	40

Efecto del capsidiol en J <sub>2</sub> de <i>N. aberrans</i> .....	41
Análisis estadístico .....	42
<b>RESULTADOS</b>	
Detección y contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por <i>N. aberrans</i> .....	42
Efecto del capsidiol sobre <i>P. capsici</i> en condiciones <i>in vitro</i> .....	44
Efecto del capsidiol en J <sub>2</sub> de <i>N. aberrans</i> .....	44
<b>DISCUSIÓN</b> .....	46
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	48
<b>CAPÍTULO III. ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE GENES DE LA RUTA MEVALÓNICA Y ACTIVIDAD DE HMGC<sub>o</sub>A-r Y EAS EN CHILE CM-334 INFECTADO POR <i>Nacobbus aberrans</i></b> .....	51
<b>RESUMEN</b> .....	51
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	52
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Establecimiento de experimentos .....	54
Infección por <i>Nacobbus aberrans</i> .....	55
Diseño y validación de oligonucleótidos. Genes <i>Hmg</i> .....	55
Genes farnesilpirofosfato sintasa ( <i>FFPS</i> ) .....	57
Genes escualeno sintasa ( <i>SS</i> ) .....	57
Extracción de RNA y PCR .....	60
Análisis tipo Southern-blot para los genes <i>SS</i> .....	61
Actividad enzimática de HMGC <sub>o</sub> A-r y EAS .....	62
Análisis estadístico .....	62
<b>RESULTADOS</b>	
Interacción de las plantas de chile CM-334 con <i>N. aberrans</i> .....	63
Acumulación de transcritos de los genes <i>Hmg1</i> , <i>Hmg2</i> , <i>Hmg3</i> , <i>FFPS</i> , <i>SS</i> y <i>EAS</i> .....	67
Número de copias de <i>SS</i> .....	70
Actividad enzimática de HMGC <sub>o</sub> A-r y EAS .....	71
<b>DISCUSIÓN</b> .....	72
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	78

<b>ANEXO I</b> .....	85
<b>ANEXO II</b> .....	87

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
<b>CAPÍTULO I.</b>	
1	Ruta mevalónica o vía MEV ..... 13
2	Síntesis de isoprenoides en citosol, retículo endoplasmático y mitocondria .... 16
 <b>CAPÍTULO II. ACUMULACIÓN DE CAPSIDIOL EN RAÍCES DE CHILE CM-334 INFECTADAS POR <i>Nacobbus aberrans</i> Y SU EFECTO EN JUVENILES DEL SEGUNDO ESTADIO</b>	
1	Cromatograma del estándar capsidiol, obtenido con un detector de UV a $\lambda=205$ nm ..... 43
2	Contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas y no infectadas por <i>N. aberrans</i> a diferentes tiempos posteriores a la exposición al nematodo ..... 43
3	Efecto del capsidiol sobre el crecimiento micelial de <i>P. capsici in vitro</i> ..... 45
4	Porcentaje de J <sub>2</sub> de <i>N. aberrans</i> inmovilizados después de su exposición al capsidiol por 12, 24 y 72 h ..... 45
 <b>CAPÍTULO III. ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE GENES DE LA RUTA MEVALÓNICA Y ACTIVIDAD DE HMGC<sub>o</sub>A-r Y EAS EN CHILE CM-334 INFECTADO POR <i>Nacobbus aberrans</i></b>	
1	Representación esquemática de la localización de los oligonucleótidos <i>Hmg1</i> , <i>Hmg2</i> y <i>Hmg3</i> ..... 56
2	Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de farnesilpirofosfato sintasa de <i>C. annuum</i> , <i>L. esculentum</i> , <i>N. tabacum</i> y <i>A. thaliana</i> ..... 58
3	Comparación de la secuencia de aminoácidos de <i>CASS</i> con los genes <i>SS</i> de <i>N. tabacum</i> (U59683), <i>N. benthamiana</i> (U46000), <i>A. thaliana</i> (U79159) y rata (M95591) ..... 59
4	Generación de sondas homologas para los genes <i>SS</i> ..... 61
5	Plantas de chile CM-334 infectadas por <i>N. aberrans</i> . Plantas con 6 a 8 hojas verdaderas inoculadas con 2000 J <sub>2</sub> del nematodo, establecidas en cámaras de crecimiento ..... 64
6	Plantas de chile CM-334 infectadas por <i>N. aberrans</i> . Plantas con 6 a 8 hojas verdaderas que fueron transplantadas a suelo naturalmente infestado con el

	nematodo .....	65
7	Estadios de desarrollo de <i>Nacobbus aberrans</i> en raíces infectadas de chile CM-334 .....	66
8	Acumulación de transcritos de los genes <i>Hmg1, Hmg2, Hmg3, FPPS, SS</i> y <i>EAS</i> en raíces de plantas CM-334 infectadas por <i>N. aberrans</i> , de experimentos realizados en cámaras de crecimiento y en invernadero .....	68
9	Comparación de la acumulación de transcritos con los datos normalizados de los genes <i>Hmg1, Hmg2, Hmg3, FPPS, SS</i> y <i>EAS</i> en raíces de chile CM-334 infectadas por <i>N. aberrans</i> .....	69
10	Análisis tipo Southern blot para determinar el número de copias de los genes <i>SS</i> en el genoma del chile CM-334 .....	70
11	Actividad enzimática de HMGCoA-r en raíces de chile infectadas por <i>N.</i> <i>aberrans</i> .....	71
12	Actividad enzimática de <i>EAS</i> en raíces de chile CM-334 infectadas por <i>N.</i> <i>aberrans</i> .....	72

## LISTA DE CUADROS

CUADRO		Pág.
<b>CAPÍTULO III. ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE GENES DE LA RUTA MEVALÓNICA Y ACTIVIDAD DE HMGC<sub>o</sub>A-r Y EAS EN CHILE CM-334 INFECTADO POR <i>Nacobbus aberrans</i></b>		
1	Características de los oligonucleótidos para <i>Hmg1</i> , <i>Hmg2</i> y <i>Hmg3</i> .....	56
2	Características de los oligonucleótidos para <i>FPPS</i> .....	57

**“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la Ciencia logra abrir”**

Albert Einstein

## I. INTRODUCCIÓN

En Chile (*Capsicum annuum* L.) la marchitez ocasionada por *Phytophthora capsici* L. es la principal enfermedad que limita su producción en México (Redondo *et al.*, 1989), y se considera que la mejor estrategia para su manejo, la constituye el uso de variedades resistentes. Investigadores del INIFAP en el Bajío encontraron que el genotipo de Chile tipo serrano CM-334 destaca por su alto grado de resistencia al oomiceto; su alta resistencia se ha mantenido aún con las cepas más patogénicas de *P. capsici* (Fernández-Pavía y Liddell, 1997; Ortega *et al.*, 1991; Bonnet *et al.*, 2007; Glosier *et al.*, 2008). Se sabe que variedades resistentes a oomicetos y ciertos hongos fitopatógenos, se muestran susceptibles cuando son previamente infectadas por nematodos fitoparásitos, fenómeno conocido como “rompimiento de resistencia”. El genotipo de Chile CM-334 se comportó como susceptible al oomiceto cuando fue previamente infectado por el nematodo falso nodulador, *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). Se ha considerado que el rompimiento de resistencia, se debe a los cambios metabólicos inducidos por el nematodo en la planta resistente al oomiceto. En las raíces de plantas infectadas por nematodos endoparásitos sedentarios ocurren cambios cuantitativos en el contenido de reguladores de crecimiento, proteínas, ácido aspártico, aminoácidos y ácidos nucleicos, entre otros (Hernández *et al.*, 1992; Williamson y Hussey, 1996; Vargas, 1998). Asimismo, se han observado alteraciones en la actividad de enzimas importantes en diferentes rutas metabólicas, como la del ácido shikímico, la de los fenilpropanoides y la mevalónica (Favery *et al.*, 1998, Davis *et al.*, 2000, Godínez-Vidal *et al.*, 2008; López-Martínez *et al.*, 2010).

Los nematodos frecuentemente asociados con el rompimiento de resistencia son aquellos que inducen sitios especializados de alimentación (células gigantes o sincicios) en las raíces del hospedante invadido, como los formadores de quistes (*Heterodera* spp. y *Globodera* spp.) y los agalladores (*Meloidogyne* spp. y *N. aberrans*). Las células hospedantes que finalmente se constituyen en el sitio especializado de alimentación sufren cambios morfológicos y fisiológicos que se manifiestan a nivel local y sistémico, modificándose así el metabolismo normal de la planta infectada. Al respecto, se ha reportado que la formación de tales sitios de alimentación, resulta de interacciones complejas planta-nematodo, en donde el patrón de expresión de genes en las células infectadas es alterado (Oka *et al.*, 1997). La reprogramación de la expresión génica de las células hospedantes para la mayoría de los nematodos fitoparásitos, es un área relativamente poco



estudiada. En la interacción de *Arabidopsis thaliana*-*H. schachtii*, el nematodo modificó la expresión de por lo menos 24 genes en las células destinadas a la formación del sincicio (Hermsmeier *et al.*, 2000). El análisis global del transcriptoma de la planta en la interacción compatible *A. thaliana*-*M. incognita*, mostró que 3373 genes desplegaron una expresión diferencial durante el desarrollo de las células gigantes (Jammes *et al.*, 2005), y en presencia del nematodo el 70% de los genes implicados en las respuestas de defensa de *A. thaliana*, fueron localmente reprimidos. Asimismo, la infección de *A. thaliana* por *M. incognita*, resultó en una represión de los genes *PAL* (Godijn *et al.*, 1993) que codifican para la síntesis de PAL (fenilalanina amonio-liasa), enzima importante en la ruta de los fenilpropanoides y a través de la cual se sintetizan distintos metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos con propiedades antimicrobiales y fitoalexinas, importantes en los mecanismos de defensa de las plantas (Pilol y Palazol, 1996; Salisbury y Ross, 1996). *M. incognita* también modificó la expresión de los genes *Hmg* induciendo su sobreexpresión (Cramer *et al.*, 1993), tales genes codifican para la síntesis de HMGCoA-r (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa), enzima clave en la síntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas como el capsidiol y de esteroides, estos últimos esenciales para el crecimiento y desarrollo del nematodo, el cual es totalmente dependiente de su hospedante para la obtención de éstos (Chitwood y Lusby, 1991; Jain *et al.*, 2000). En las raíces infectadas por *Meloidogyne* también se ha detectado un incremento en la expresión de otros genes implicados en la síntesis de paredes celulares (Van der Eycken *et al.*, 1992), y en la síntesis de proteínas formadoras de canales de membrana (Conkling *et al.*, 1990).

El capsidiol, la principal fitoalexina sesquiterpénica del chile, es una de las más estudiadas con relación a su nivel de producción luego del ataque por oomicetos y hongos fitopatógenos. Sin embargo, a pesar del conocimiento relativamente amplio que se tiene acerca de esta fitoalexina, poco se sabe de la dinámica de su acumulación en raíces infectadas por nematodos agalladores y de su efecto tóxico en estos fitopatógenos; de hecho esta situación prevalece en diversas interacciones planta-nematodo. De los pocos reportes existentes al respecto, podemos citar la acumulación de gliceolina en plantas de soya después de la infección por *M. incognita* (Kaplan *et al.*, 1980) y *H. glycines* (Huang y Barker, 1991). En el caso de la interacción de *Pinus strobus*-*Bursaphelenchus xylophilus* se detectó la acumulación de un estilbeno (3-O-metildihidropinosilvin estilbenoide) y una flavonona (2S-pinoembrina flavonona), ambos con propiedades antimicrobianas (Hanawa *et al.*, 2001). En la interacción compatible chile CM-334-*N. aberrans*, aunque se tiene el antecedente de que en presencia del nematodo hubo una menor acumulación de la fitoalexina capsidiol (Godinez-

Vidal *et al.*, 2009), se desconoce tanto la toxicidad de la fitoalexina en el nematodo, como la relación que existe entre la acumulación del capsidiol y el desarrollo del nematodo en las raíces infectadas.

En nuestro grupo de investigación se ha demostrado que plantas CM-334 infectadas por *N. aberrans* y posteriormente expuestas a *P. capsici*, muestran susceptibilidad al oomiceto a los 21 días posteriores a la inoculación del nematodo (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005), tiempo que coincide con la presencia de hembras inmaduras (Godinez-Vidal *et al.*, 2009); las cuales de acuerdo con Manzanilla-López *et al.* (2002) son las responsables de inducir los sitios especializados de alimentación. También consistentemente se han observado reducciones en la actividad de PAL (Godinez-Vidal *et al.*, 2008) y peroxidasas (López-Martínez *et al.*, 2010) en plantas CM-334 infectadas por *N. aberrans*. Al respecto, en algunos trabajos la respuesta de hipersensibilidad y los incrementos en la actividad de PAL se han asociado con la resistencia a *P. capsici* en CM-334 y otros genotipos resistentes (Candela *et al.*, 1995; Fernández-Pavia, 1997; García-Pérez *et al.*, 1998; Gayoso *et al.*, 2004).

Hasta ahora los trabajos de investigación sobre la reprogramación génica que inducen los nematodos fitoparásitos en las células destinadas a la formación de los sitios especializados de alimentación, se han realizado con nematodos formadores de quistes y con varias especies de *Meloidogyne*, existiendo un desconocimiento total sobre la reprogramación que induce *N. aberrans* en sus hospedantes. Por lo anterior, es de fundamental relevancia conocer qué modificaciones en la expresión génica induce *N. aberrans* en chile CM-334, el impacto de tales modificaciones en la actividad de las enzimas codificadas por los genes afectados y su efecto en la acumulación de los productos finales de las rutas metabólicas en las que tales enzimas participan. Así, la presente investigación tuvo por

## **II. OBJETIVO**

Comparar en raíces de chile CM-334 infectadas y no infectadas por *N. aberrans* la acumulación de transcritos de los genes *Hmg1*, *Hmg2*, *Hmg3*, *FPPS*, *SS* y *EAS* y el contenido de capsidiol.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

En Chile (*Capsicum annuum* L.) la marchitez ocasionada por *Phytophthora capsici* L. es una de las principales enfermedades que limitan su producción en México y en el mundo (Redondo y Rodríguez, 1987; Ristaino y Johnston, 1999; Parra y Ristaino, 2001). *P. capsici* causa pudrición radical, lo que interfiere con la absorción y transporte de agua y nutrientes; no obstante, también se sabe que el oomiceto es capaz de infectar todos los estratos de la planta en cualquier etapa fenológica, provocando lesiones necróticas en hojas, frutos y tallos (Ristaino y Johnston, 1999). Una vez que el oomiceto infecta a un hospedante susceptible, la enfermedad puede ser devastadora y ningún método actualmente disponible proporciona el control adecuado para la enfermedad; incluso el control químico ha dejado de ser una práctica común, debido al surgimiento de aislamientos resistentes a fungicidas del grupo de los fenilamidos como el mfenoxam y el metalaxil (Ristaino y Johnston, 1999; Parra y Ristaino, 2001). Por ello, se considera que para el manejo de esta enfermedad la mejor estrategia la constituye el uso de variedades resistentes. Investigadores del INIFAP en el Bajío reportaron que el genotipo de Chile tipo serrano CM-334 es altamente resistente al oomiceto; tal resistencia se ha mantenido aún cuando se ha inoculado con las cepas más patógenas de *P. capsici* (Fernández-Pavía y Liddell, 1997; Ortega *et al.*, 1991; Bonnet *et al.*, 2007; Glosier *et al.*, 2008). El genotipo CM-334 constituye la fuente más eficiente de resistencia conocida para *P. capsici* y *P. parasitica* (Bonnet *et al.*, 2007). Sy *et al.* (2005) reportaron que en este material existen tres genes de resistencia que se expresan de manera independiente en hojas, tallo y raíz. Asimismo, Pegard *et al.* (2005) demostraron que CM-334 es resistente a *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*; la resistencia se asoció con respuestas bioquímicas pospenetración y con la respuesta de hipersensibilidad, lo cual impidió la migración del nematodo y su establecimiento.

Evidencia experimental obtenida por Fernández-Pavía y Liddell (1997) indica que la resistencia a *P. capsici* no está dada por barreras físicas que impidan la penetración del oomiceto en las raíces, pero una vez que éste penetró ocurrió un aumento en la expresión de los genes *PAL* que codifican para la enzima fenilalanina amonio-liasa (PAL); tal modificación se asoció con cambios cuantitativos y cualitativos en los compuestos fenólicos que inhibieron el crecimiento de *P. capsici in vitro*. También la actividad de peroxidasas ácidas se incrementó en plantas CM-334, en comparación con plantas susceptibles (Fernández-Pavía y Liddell, 1997). La fitoalexina capsidiol, también se acumula en concentraciones tóxicas para el oomiceto en CM-334 (Candela *et al.*, 2000; Villar-Luna *et al.*, 2009). Resultados similares han sido observados en otros materiales que exhiben resistencia a *P. capsici* (Egea *et al.*, 1996; Candela *et al.*, 2000).

A pesar del alto grado de resistencia a *P. capsici* mostrado por el material CM-334, se ha demostrado que éste se comporta como susceptible al oomiceto cuando es previamente infectado por el nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). Este fenómeno conocido como “Rompimiento de Resistencia”, implica que plantas resistentes al ataque de oomicetos y ciertas especies de hongos al ser infectadas por nematodos agalladores de raíces (*Meloidogyne* spp. y *N. aberrans*) o formadores de quistes (*Heterodera* spp. y *Globodera* spp.), “pierden” su resistencia y se comportan como susceptibles (Sasser *et al.*, 1955; Hernández *et al.*, 1992, Goddijn *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005).

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

El fenómeno de rompimiento de resistencia, se ha documentado en varios cultivos. Por ejemplo, jitomate (*Lycopersicon esculentum*) resistente a *Fusarium* spp., se comportó como susceptible cuando fue infectado por *Meloidogyne* spp. (Abawi y Barker, 1984). También variedades de fríjol (*Phaseolus vulgaris*) resistentes a *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, mostraron susceptibilidad al hongo cuando fueron infectadas por *M. incognita* (France y Abawi, 1994). Marley y Hillocks (1994) encontraron que en materiales de *Cajanus cajan* resistentes a *F. udum*, el rompimiento de resistencia al hongo se asoció con la infección previa de las plantas por *M. incognita* y *M. javanica*.

El rompimiento de resistencia por nematodos fitoparásitos ha tratado de explicarse argumentando que las heridas causadas por ellos en las raíces de las plantas hospedantes, constituyen puertas de entrada para el oomiceto; sin embargo, se ha observado con frecuencia que al causar heridas de manera artificial en raíces de plantas resistentes, no se induce el rompimiento de resistencia. Por otro lado, en experimentos con plantas con doble sistema radical, en donde a pesar de existir una separación física entre el nematodo y el oomiceto u hongo, el rompimiento de resistencia ocurre. Lo anterior sugiere que los cambios metabólicos y/o fisiológicos inducidos por el nematodo son los responsables del rompimiento de resistencia y no el daño mecánico ocasionado por éste en la raíz de la planta hospedante (Bowman y Bloom, 1966; Vargas *et al.*, 1996). Tanto *Meloidogyne* spp. como *N. aberrans* son capaces de inducir incrementos en reguladores de crecimiento, proteínas y aminoácidos, ácido aspártico y ácidos nucleicos, y modificar la actividad de varias enzimas (Hernández *et al.*, 1992; Williamson y Hussey, 1996; Vargas, 1998; Davis *et al.*, 2000). Recientemente, se ha observado que plantas CM-334 infectadas por *N. aberrans* y posteriormente inoculadas con *P. capsici*, presentan una reducción en la actividad de PAL y en la de

peroxidasas, lo cual contrasta con la mayor actividad encontrada en las plantas inoculadas sólo con el oomiceto (Godinez-Vidal *et al.*, 2008; López-Martínez *et al.*, 2010). En plantas infectadas sólo por *N. aberrans*, se redujo el contenido de fenoles solubles totales, particularmente el ácido clorogénico, en comparación con las plantas no infectadas (López-Martínez *et al.*, 2010). En contraste, en la interacción Chile CM-334-*Meloidogyne* spp., el contenido de ácido clorogénico se incrementó 59 veces con respecto a las plantas no inoculadas (Pegard *et al.*, 2005). Lo anterior, sugiere que *N. aberrans* modifica la expresión de genes implicados con los mecanismos de defensa de CM-334, lo cual puede favorecer el establecimiento y desarrollo del nematodo, y convertir al sistema radical en un sustrato adecuado para el establecimiento del oomiceto.

Fernández-Pavía y Liddell (1997), también reportan que en plantas CM-334 infectadas por *P. capsici* la expresión de los genes *Hmg* fue menor en comparación con la de plantas susceptibles NM6-4. Los genes *Hmg* codifican para la síntesis de la HMGCoA-r (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa), enzima clave en ruta de los isoprenoides mediante la cual se sintetizan diversos metabolitos secundarios como las fitoalexinas sesquiterpénicas y los esteroides (Jain *et al.*, 2000). Fernández-Pavía y Liddell (1997) al encontrar niveles de expresión tan bajos en las plantas resistentes CM-334 comparadas con las susceptibles, concluyeron que los genes *Hmg* no estaban implicados en la resistencia de CM-334. No obstante, se sabe que tanto los oomicetos como los nematodos fitoparásitos, agalladores y formadores de quistes, son totalmente dependientes de los esteroides sintetizados por sus hospedantes (Chitwood y Lusby, 1991); de ahí que el limitado crecimiento de *P. capsici* en plantas CM-334 podría también, en parte, estar asociado con un contenido inadecuado de esteroides en las raíces de CM-334 (Zavaleta-Mejía, 2002).

### **Reprogramación de la expresión génica por nematodos fitopatógenos**

Los nematodos frecuentemente asociados con el fenómeno de rompimiento de resistencia a oomicetos y hongos fitopatógenos, corresponden a aquellos géneros endoparásitos como *Meloidogyne* spp. y *N. aberrans* que se caracterizan por inducir en sus hospedantes la formación de agallas. Estos nematodos poseen un estilete hueco retráctil conectado al esófago y a tres glándulas esofágicas, mediante el cual atraviesan las paredes celulares de su hospedante para liberar secreciones esofágicas y para tomar nutrientes (Caillaud *et al.*, 2008). Al respecto, se sabe que varios nematodos fitoparásitos secretan efectores que interfieren con las respuestas de defensa de las plantas para que la infección ocurra, éstos pueden liberar a través del estilete patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPS por sus siglas en inglés) que disparan las defensas basales de las

células hospedantes. Recientemente, Bellafigiore *et al.* (2008) reportaron que juveniles del segundo estadio (J<sub>2</sub>) de *M. incognita* secretan a través del estilete bajos niveles de proteínas identificadas como 14-3-3b -implicada en transducción de señales, respuesta a estrés y apoptosis (Jaubert *et al.*, 2004)-, Hsp90 -proteína de choque térmico (Chen *et al.*, 2005)-, aldolasas, gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasas, proteínas con dominio de tioredoxina y con dominio de S-transferasas. En el análisis del secretoma completo de *M. incognita* se identificaron 486 proteínas, y mediante el uso de grupos eucarióticos ortólogos se realizó su clasificación: 103 proteínas catalizan modificaciones postraduccionales -proteínas que pueden transformarse o realizar funciones de chaperona-; 93 participan en síntesis o secreción; 88 disparan reacciones metabólicas; 48 interactúan con ácidos nucleicos (DNA o RNA); 25 están implicadas en transducción de señales; 33 interaccionan con actina o microtúbulos; 17 participan en procesos de detoxificación y ocho catalizan modificaciones a la pared celular (Bellafigiore *et al.* 2008).

Los nematodos una vez que han invadido las raíces del hospedante, transforman las células radicales en estructuras especializadas de alimentación, células gigantes o sincicios, fundamentales para su crecimiento y desarrollo (Caillaud *et al.*, 2008). La formación de tales estructuras requiere de extensivos cambios en el patrón de expresión de los genes de las células infectadas (Oka *et al.*, 1997). A lo largo de la evolución con su planta hospedante, los nematodos fitoparásitos han desarrollado estrategias para reclutar genes que les permitan manipular procesos metabólicos para su propio beneficio. Este manipuleo o reprogramación de la expresión génica es un fenómeno poco estudiado. En la interacción *Arabidopsis thaliana*-*H. schachtii*, el nematodo modificó la expresión de por lo menos 24 genes en las células destinadas a la formación del sincicio (Hermsmeier *et al.*, 2000). En la interacción *A. thaliana*-*M. incognita*, se detectó la sobreexpresión del gen que codifica para una enzima similar a la D-ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa, la cual es clave en el ciclo de Calvin y en la ruta oxidativa de la pentosa fosfato (Favery *et al.*, 1998); por lo anterior, los autores sugieren que el establecimiento del sitio de alimentación por parte del nematodo, implica la reprogramación de las rutas metabólicas primarias en su hospedante. En otro estudio, Potenza *et al.* (2001) identificaron que en la interacción *Medicago sativa*-*M. incognita* la expresión de cuatro genes (*Mia-1*, *Mia-2*, *Mia-3* y *Mia-4*) en la planta, es modificada por el nematodo. La expresión de los genes *Mia-1* y *Mia-2* fue alta en raíces y en cotiledones durante la migración y la formación de agallas por el nematodo. Las secuencias de aminoácidos deducidas de ambos genes, correspondieron a zonas ricas en glicina importantes para la unión de proteínas al RNA y a una fosfoenolpiruvato carboxinasas, respectivamente. Asimismo, las secuencias de aminoácidos de los genes *Mia-3* y *Mia-4* fueron

similares a la de isoflavona reductasa y la de metalotionina, por lo que se sugirió su posible participación en el secuestro de radicales libres de oxígeno, los cuales son el resultado del estrés oxidativo durante la interacción del nematodo con su hospedante susceptible.

Otros reportes muestran incrementos en la expresión del gen que codifica para la síntesis de extensina (Van der Eycken *et al.*, 1992) -proteína estructural de la pared celular-, y del gen *Tob RB7*, responsable de la síntesis de proteínas formadoras de canales de membrana en raíces (Conkling *et al.*, 1990). En este contexto, también se ha reportado la caracterización de algunos genes implicados en la reorganización del citoesqueleto en células gigantes (de Almeida Engler *et al.*, 2004; Jammes *et al.*, 2005). Al respecto, de Almeida Engler *et al.* (2004) reportaron que tres genes de forminas *AtFH1*, *AtFH6* y *AtFH10* son específicamente inducidos en células gigantes. Las forminas son una familia de proteínas altamente conservada, que están implicadas en la polimerización *de novo* de filamentos de actina (Evangelista *et al.*, 2003). de Almeida Engler *et al.* observaron que *AtFH6* está uniformemente distribuido en la membrana plasmática, lo que podría regular el crecimiento isotrópico de la célula gigante, ello mediante el control del ensamblaje de los cables de actina. En este caso los cables de actina podrían ser requeridos, para orientar el tráfico de vesículas en la biogénesis de la membrana plasmática y la pared celular de la célula gigante.

En general en la interacción planta-nematodo, la respuesta de defensa inicial y el patrón de expresión de los genes implicados es similar en plantas susceptibles como en resistentes, los factores que determinarán que este patógeno se establezca o no, serán la velocidad y la magnitud de las respuestas de defensa (Kuc, 1997). El establecimiento exitoso de *A. thaliana*-*M. incognita* se asoció con la supresión de las respuestas de defensa de la planta (Jammes *et al.*, 2005). De los 22,089 genes monitoreados del transcriptoma completo de *A. thaliana*, se identificaron 3373 genes que desplegaron una expresión diferencial durante el desarrollo de las células gigantes. Así, en presencia del nematodo el 70% de los genes implicados en las respuestas de defensa de *A. thaliana*, fueron localmente reprimidos (Jammes *et al.*, 2005). La supresión de la expresión de genes de defensa incluye aquellos relacionados con resistencia (*PAD4*, *NHL3*), genes asociados con la ruta del etileno y del ácido jasmónico (*EIN3*, *ERF1* y *PR4*) y genes implicados en la síntesis de compuestos con propiedades antimicrobianas (Caillaud *et al.*, 2008).

En la interacción compatible *Solanum lycopersicon*-*M. incognita*, Melillo *et al.* (2006) observaron que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) se

llevó a cabo a las 12 h posteriores a la inoculación del nematodo; sin embargo, ROS no fue detectable a nivel citosólico a los 2 días posteriores a la inoculación, tiempo en donde se observó la inducción de la célula gigante. Este hecho pone de manifiesto que la supresión de las defensas de la planta, es un paso esencial para el establecimiento exitoso del nematodo. Por ejemplo, la infección de *A. thaliana* por *M. incognita*, está asociada con la represión de los genes *PAL* (Goddijn *et al.*, 1993) que codifican para PAL, enzima importante en la ruta de los fenilpropanoides a través de la cual se sintetizan distintos compuestos con propiedades antimicrobianas como los ácidos fenólicos y las fitoalexinas, y que son parte importante de los mecanismos de defensa (Pilol y Palazol, 1996; Salisbury y Ross, 1996). Asimismo, se ha reportado que en *S. lycopersicon* la inducción de la expresión de los genes *Hmg2*, los cuáles han sido asociados con la síntesis de la fitoalexina capsidiol (Stermer *et al.*, 1991; Sun-Hwa *et al.*, 2003; Godinez-Vidal *et al.*, 2009), se lleva a cabo después de la infección por *M. incognita* o *M. hapla*, hecho por el cual los genes *Hmg2* son referidos por los autores como “genes de respuesta al nematodo” (Cramer *et al.*, 1993).

#### **Reprogramación de la expresión génica por *N. aberrans* en chile CM-334**

Se ha reportado que *N. aberrans* interfiere con las respuestas de defensa en plantas de chile CM-334, como la ruta de los fenilpropanoides (Diez y Gil, 1998) que resulta en la formación de compuestos con propiedades antimicrobianas como los fenoles solubles y las fitoalexinas (Bell, 1981). Consistentemente se ha observado que plantas infectadas por el nematodo, presentan una reducción de la actividad de PAL (Vargas *et al.*, 1996; Godinez-Vidal *et al.*, 2008; López-Martínez *et al.*, 2010). Godinez-Vidal *et al.* (2008) encontraron que 21 días después de la inoculación de *N. aberrans*, la actividad de PAL fue 48.3% más baja en plantas de chile CM-334 infectadas por el nematodo en comparación con las plantas no infectadas. Estos cambios inducidos por *N. aberrans* en la actividad de PAL, son similares a los reportados en otros trabajos en donde se muestra que la actividad de la enzima se reduce significativamente en plantas de jitomate, cebada y soya susceptibles a *Meloidogyne* spp., en comparación con la de plantas resistentes (Jain *et al.*, 1987; Rezk *et al.*, 1987; Edens *et al.*, 1995), en las cuales la actividad se incrementa. Asimismo, los niveles de fenoles solubles totales y de ácido clorogénico en particular, fueron reducidos significativamente en presencia de *N. aberrans* en plantas CM-334 (López-Martínez *et al.*, 2010). En este contexto, las reducciones en la actividad de PAL y posiblemente de los metabolitos producidos a través de la ruta, podrían ser un prerrequisito para el desarrollo del nematodo, lo que se traduce en una respuesta de susceptibilidad de la planta al nematodo.



Recientemente, se encontró que en plantas CM-334 infectadas por *N. aberrans* se modificó la acumulación de transcritos de los genes *Hmg*. En esta interacción, la acumulación de transcritos de los genes *Hmg1*, asociados con la síntesis de esteroides (Ohyama *et al.*, 2007), fue mayor que la acumulación de los de *Hmg2* a los 21 posteriores a la inoculación del nematodo, en comparación con las plantas control; en este tiempo la mayor acumulación de *Hmg1* se asoció con un incremento en la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r y la presencia del estadio de hembra inmadura (Godinez-Vidal *et al.*, 2009).

### **Biosíntesis de isoprenoides en plantas**

La glicoproteína transmembranal HMGC<sub>o</sub>A-r (EC 1.1.1.34) (Liscum *et al.*, 1983), cataliza la síntesis de ácido mevalónico o mevalonato a partir de HMGC<sub>o</sub>A en una reacción irreversible, por lo que es considerada como el punto de regulación en la biosíntesis de isoprenoides en plantas (Bach *et al.*, 1997), hongos (Basson *et al.*, 1986) y mamíferos (Goldstein y Brown, 1990). Los isoprenoides de plantas también llamados terpenoides, comprenden un grupo de compuestos con funciones diversas (Eisenreich *et al.*, 2001), que son clasificados como metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios incluyen a los esteroides, los carotenoides, los reguladores de crecimiento y los poliprenoles, los cuales son compuestos esenciales para la fotoprotección, la regulación del crecimiento y el desarrollo, así como para mantener la integridad y las funciones bioquímicas específicas del sistema de endomembranas. Los metabolitos secundarios (monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos) aunque no son esenciales para la viabilidad de las plantas, intervienen en interacciones importantes entre las plantas y su medio (Chappell, 1995); un ejemplo son los isoprenoides involucrados en las interacciones planta-planta (Stevens, 1984), planta-insecto (Gibson y Pickett, 1983) y planta-patógeno (Stoessel *et al.*, 1976).

La ruta biosintética de los isoprenoides se descubrió inicialmente en animales y levaduras y por emplear mevalonato fue denominada vía Mevalónica (MEV) (Qureschi y Porter, 1981; Bloch, 1992; Bochar *et al.*, 1999). Durante mucho tiempo se consideró que la ruta MEV constituía una vía universal para la síntesis de todos los isoprenoides; sin embargo, algunos resultados obtenidos a partir de plantas y bacterias no podían ser explicados mediante esta ruta. Un estudio realizado con varias especies de plantas, mostró que el mevinolin un inhibidor específico de la HMGC<sub>o</sub>A-r, impedía la biosíntesis de isoprenoides citoplásmicos (esteroides), pero no afectaba la formación de isoprenoides plastídicos como las clorofilas y los carotenoides (Bach y Lichtenthaler, 1982). Actualmente, los resultados que parecían incongruentes son explicados a través de la existencia de

una ruta independiente para la biosíntesis de isoprenoides: la ruta del 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato o vía MEP (Flesch y Rohmer, 1988; Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002).

Las enzimas de la ruta MEV se localizan en el citoplasma de las plantas, a diferencia de las implicadas en la vía MEP, las cuales se importan desde el citoplasma hacia los plástidos donde llevan al cabo su función (Lois *et al.*, 2000). Algunos estudios realizados en plantas con sustratos marcados, han mostrado que la síntesis de sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se realiza en el citoplasma por la ruta MEV; en contraste con los monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos, que son formados exclusivamente en los plástidos por la vía MEP. Por ello, es posible considerar una compartimentalización de ambas vías. A la fecha existen diferentes evidencias de la intercomunicación entre ambas rutas metabólicas, que sugieren un intercambio de intermediarios (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002). La vía MEP es la ruta principal para la biosíntesis de entkaureno (precursor de giberelinas) en *A. thaliana*; sin embargo, se ha demostrado una contribución parcial de la ruta MEV para su síntesis (Kasahara *et al.*, 2002). Otro reporte que puso de manifiesto la intercomunicación entre ambas rutas, mostró que las membranas de los plástidos tienen un sistema unidireccional de vesículas para exportar isopentenil pirofosfato (IPP) y geranylgeranyl difosfato (GGPP) de modo eficiente hacia el citoplasma (Bick y Lange, 2003). En este trabajo realizado con cloroplastos aislados de espinaca, col y mostaza, Bick y Lange observaron que las vesículas son capaces de transportar eficientemente el IPP y GGPP en presencia de 2.5 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ . Asimismo, sometiendo las vesículas a un gradiente ácido de pH ( $\Delta\text{pH}$  2.0) el transporte de estos intermediarios se triplicó; no obstante este incremento fue suprimido cuando se incorporó el protonóforo CCCP (carbonil cianido *m*-clorofenilhidrazona). Las vesículas también fueron sometidas a un gradiente de potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) mediante el empleo de un ionóforo de  $\text{K}^+$  (valinomicina), la presencia del ionóforo generó un potencial negativo y también se dio lugar un incremento en el transporte de IPP. Estos resultados dieron evidencia sólida de que tanto el  $\Delta\text{pH}$  como el  $\Delta\Psi$  son fuerzas directoras del sistema de transporte de IPP, además de dar cuenta de la implicación de un mecanismo de intercomunicación entre las vías MEP y MEV.

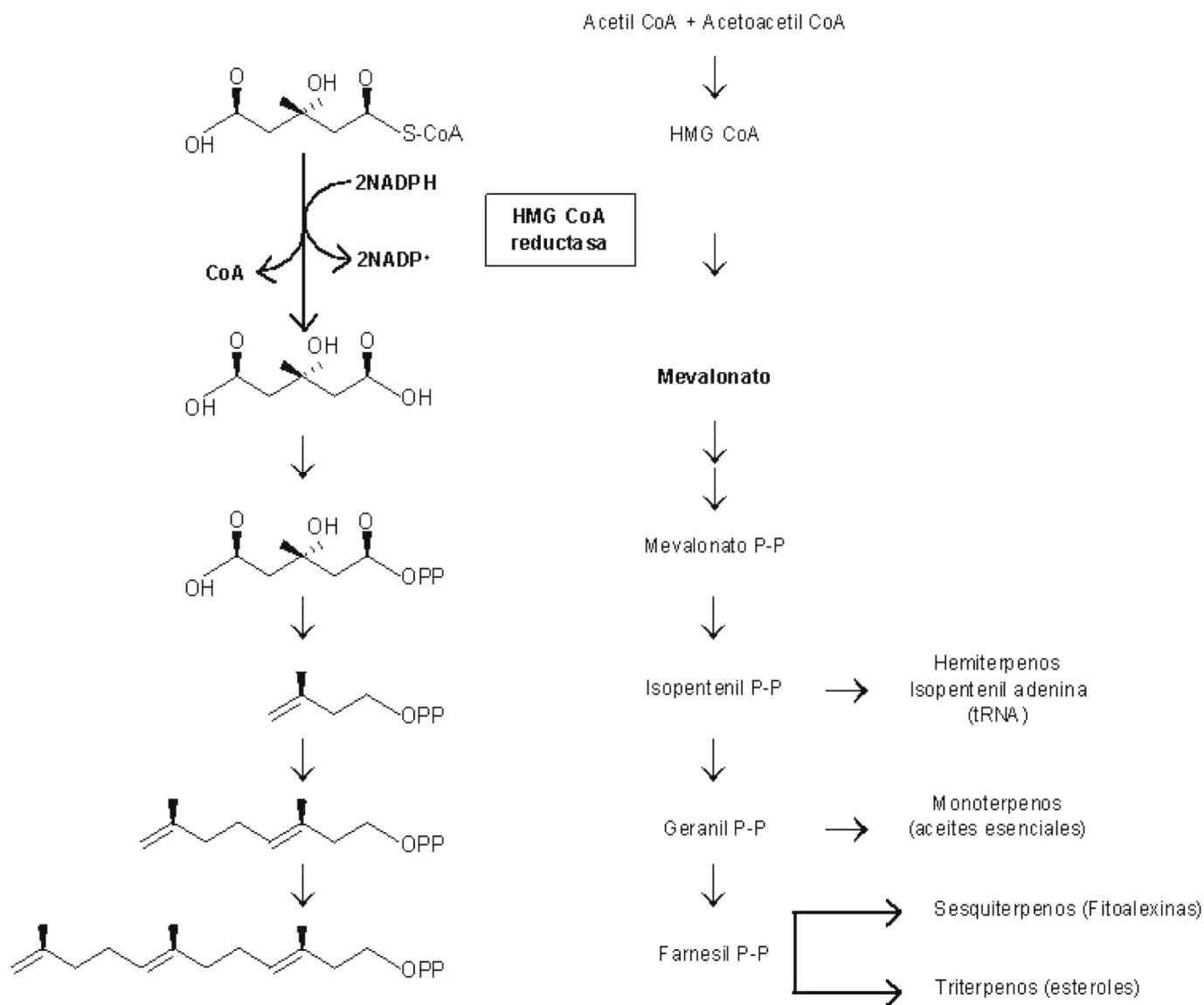
El ácido mevalónico está compuesto por seis carbonos y se origina a partir de la condensación secuencial de tres unidades de acetil-CoA que generan HMGCoA, misma que es convertida a mevalonato en una reacción irreversible catalizada por la HMGCoA-r (Fig. 1). Luego el mevalonato, es fosforilado y descarboxilado para generar IPP y su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). La condensación de varias unidades de IPP o DMAPP mediante la actividad de las prenil

transferasas, generarán intermediarios de distinto tamaño para la síntesis de isoprenos. DMAPP con un IPP genera un geranil pirofosfato (GPP), intermediario de los monoterpenos; la adición de un tercer IPP genera un farnesil pirofosfato (FPP), intermediario de los sesquiterpenos; un cuarto IPP forma geranilgeranil pirofosfato (GGPP), intermediario de los diterpenos y así sucesivamente. En general como se mencionó anteriormente, los monoterpenos (10 carbonos), diterpenos (20 carbonos) y tetraterpenos (40 carbonos) son sintetizados en plástidos; mientras que los sesquiterpenos (15 carbonos) y triterpenos (30 carbonos) son sintetizados en el citosol. Todas las enzimas de la ruta han sido identificadas y ubicadas en el citoplasma, donde llevan al cabo su función (Lois *et al.*, 2000).

Una vez formados los intermediarios GPP, FPP o GGPP las terpeno sintasas (TPS), catalizarán ciclizaciones para generar la gran diversidad de esqueletos hidrocarbonados que caracteriza a los isoprenoides. Las TPS, también llamadas monoterpeno, sesquiterpeno y diterpeno ciclasas, producen modificaciones redox en los prenil fosfatos para generar enlaces intramoleculares, y con ello anillos de diferente tamaño, forma y actividad biológica (Bohlmann *et al.*, 1998). Se considera que las TPS pueden estar implicadas en la regulación del flujo metabólico, ya que operan en puntos de ramificación de la ruta y por tanto comprometen el metabolismo hacia la producción de los diferentes isoprenos.

### **3-Hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa: Actividad y regulación**

La HMGCoA-r se localiza en el citoplasma y en el retículo endoplasmático, lo cual ha llevado a sugerir diferencias en sus cinéticas de actividad y en su regulación (Bach *et al.*, 1990; Lois *et al.*, 2000). Algunos estudios sobre la secuencia primaria de HMGCoA-r en diferentes organismos, sugieren que ésta consiste de ocho regiones de unión a membrana. El dominio de membrana, el cual no es esencial para la actividad catalítica, consiste de ocho hélices transmembranales en mamíferos, mientras que en plantas éstas se encuentran truncadas y en organismos procariotes inclusive están ausentes (Takahashi *et al.*, 1999). También, se ha encontrado que la región N-terminal está involucrada en la degradación regulada de la enzima, mientras que la región C-terminal protege al sitio catalítico que se encuentra inmerso en el citosol (Liscum *et al.*, 1985). En plantas el número de genes que codifican para la HMGCoA-r varía dependiendo de la especie; por ejemplo, en *A. thaliana* es codificada por dos genes diferentes (Monfar *et al.*, 1990), en tomate por tres (Narita y Gruissem, 1989) y en maíz, chícharo (Monfar *et al.*, 1990) y papa (Choi *et al.*, 1992) por una familia multigénica.



**Fig. 1.** Ruta mevalónica o vía MEV. La formación de mevalonato se realiza mediante la acción de la HMGCoA-r, la cual sustituye el CoA del sustrato HMGCoA por un grupo hidroxilo, reduciendo así al NADPH (Rodríguez-Concepción y Boronat, 2002).

Los genes *Hmg* son diferencialmente expresados después de un estímulo externo, como el ataque por patógenos o durante el crecimiento y desarrollo de tejidos específicos de las plantas (Sun-Hwa *et al.*, 2003). Se ha sugerido que distintas isoformas o isogenes de HMGC<sub>o</sub>A-r, están implicadas en la síntesis de esteroides y fitoalexinas sesquiterpénicas. Un estudio realizado por Choi *et al.* (1992), reveló una expresión diferencial de las isoformas *Hmg1*, *Hmg2* y *Hmg3* de *S. tuberosum* luego de realizar tratamientos con ácido araquidónico o por la inoculación con razas incompatibles de *P. infestans*. Estos investigadores observaron que *Hmg2* y *Hmg3* fueron fuertemente inducidas después de los tratamientos; mientras que *Hmg1* fue fuertemente suprimida por los mismos tratamientos. Tales resultados ponen de manifiesto la importancia de HMGC<sub>o</sub>A-r en la regulación de la síntesis de esteroides y fitoalexinas en papa. En raíces de *C. annuum* cv. Nockwang Sun-Hwa *et al.* (2003), encontraron que la expresión de *Hmg2* fue rápidamente inducida una hora después de la inoculación con *P. capsici*, y fue incrementándose hasta las 48 h posteriores a la inoculación. En frutos sanos de chile, *Hmg1*, *Hmg2* y *Hmg3* se expresaron diferencialmente dependiendo del estado de maduración del fruto; así *Hmg1* y *Hmg2* se expresaron en las primeras etapas de crecimiento del fruto y fueron gradualmente desapareciendo conforme el fruto alcanzó su maduración; en contraste *Hmg3* fue fuertemente expresado durante todo el desarrollo del fruto. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que los genes *Hmg2* además de formar parte importante, junto con los genes *Hmg1* y *Hmg3*, en el proceso de crecimiento y desarrollo de los frutos, son clave en la síntesis de fitoalexinas y por tanto en los mecanismos de defensa inducibles del chile.

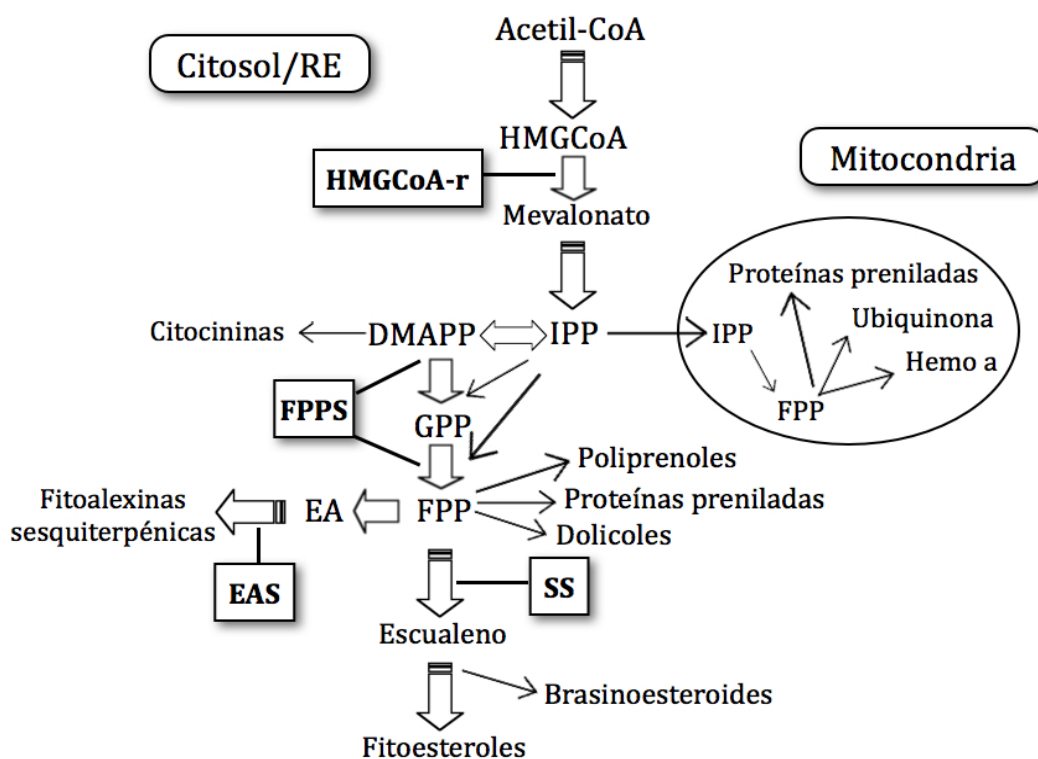
Otros reportes, señalan a la isoforma *Hmg1* como candidata para la regulación de la síntesis de esteroides en plantas. Ohyama *et al.* (2007), reportaron que mutantes en *Hmg1* de *A. thaliana*, muestran fenotipos pleiotrópicos que incluyen achaparramiento, senescencia prematura y esterilidad masculina. Trabajos previos también mostraron que en estas mutantes *Hmg1*, los niveles de esteroides fueron más bajos que los de las plantas silvestres (Suzuki *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que *Hmg1* juega un papel crítico en la síntesis de triterpenos y que los esteroides contribuyen con la elongación celular, el retraso de la senescencia y la fertilidad; sin embargo, se desconoce cómo es que se regula *Hmg1*. Se sabe que en *A. thaliana* *Hmg1* codifica para dos diferentes isoformas de HMGC<sub>o</sub>A-r: HMGR1S y HMGR1L (Lumbreras *et al.*, 1995). HMGR1L tiene 50 aminoácidos más en la región N-terminal que HMGR1S, y aunque ambas isoformas tienen la misma localización celular es posible que su degradación sea distinta. Se ha mencionado que la actividad de la enzima es regulada, a nivel transcripcional (Jelesko *et al.*, 1999), a nivel de RNA mensajero (Stermer *et al.*, 1991) y postranscripcionalmente. Algunos estudios sugieren que la regulación de la

actividad también puede ser mediada por una fosforilación reversible (Russell *et al.*, 1985), aunque en otros se ha propuesto que dicha fosforilación puede incrementar la susceptibilidad de la enzima para su degradación proteolítica (Parker *et al.*, 1984). Por ejemplo, mediante fosforilación se ha observado una degradación basal y acelerada del mevalonato en mamíferos (Inoue *et al.*, 1991), y una inactivación de HMGC<sub>o</sub>A-r en plantas (Sugden *et al.*, 1999). No obstante, la diferencia funcional entre las dos isoformas de *Hmg1*, HMGR1S y HMGR1L, y el mecanismo de regulación postranscripcional *in vivo* permanecen sin resolverse. Se ha sugerido que mutaciones puntuales en los sitios de fosforilación de las isoformas de *Hmg1* para generar mutantes *Hmg1-1*, podrían resolver el problema (Suzuki *et al.* 2004).

La actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r también responde a varios estímulos o señales, presentando incrementos durante interacciones planta-patógeno. Chappell y Nable (1987), reportaron que en presencia de un elicitador de tipo fungoso se indujeron incrementos de HMGC<sub>o</sub>A-r en cultivos celulares de tabaco, lo cual condujo a la acumulación de compuestos con propiedades antimicrobianas. Incrementos en la actividad de esta enzima han sido asociados con incrementos de su RNA mensajero (Bach *et al.*, 1991; Stermer *et al.*, 1991). Al respecto, se sabe que los cambios en la expresión génica inducidos por nematodos fitoparásitos en su hospedante, pueden afectar la acumulación de transcritos y la actividad de la enzima (Favery *et al.*, 1998). Cramer *et al.* (1993), reportaron que después de la inoculación con J<sub>2</sub> de *M. incognita* y *M. hapla* a plantas de tomate con la construcción *Hmg2::GUS*, se observaron altos niveles de actividad de GUS una vez que comenzó a formarse el sitio especializado de alimentación. También, como se mencionó anteriormente, la acumulación de transcritos de los genes *Hmg* es modificada en plantas CM-334 infectadas por *N. aberrans*. Esta modificación fue evidente a los 21 posteriores a la inoculación del nematodo, tiempo en que la acumulación de transcritos de los genes *Hmg1*, fue mayor que la acumulación de los de *Hmg2* en comparación con las plantas control; dicho incremento se asoció con el aumento en la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r y la presencia del estadio de hembra inmadura (Godinez-Vidal *et al.*, 2009). Posiblemente el incremento en la expresión de *Hmg1* favoreció la formación de esteroides, los cuales son necesarios para el crecimiento y desarrollo del nematodo (Chitwood y Lusby, 1991), que es totalmente dependiente de los esteroides sintetizados por su planta hospedante.

## Farnesil difosfato sintasa: su papel en la ruta MEV

La evidencia disponible indica que HMGC<sub>o</sub>A-r es la enzima clave en la regulación de la ruta MEV; sin embargo, otras enzimas como la farnesil difosfato sintasa (FPPS; EC 2.5.1.1/EC 2.5.1.10), también están implicadas en el control de la ruta. La FPPS cataliza dos reacciones de condensación 1'-4 entre el IPP y los difosfatos alílicos, los DMAPP y los resultantes GPP para generar farnesil difosfato (FPP) (Masferrer *et al.*, 2002). Se ha propuesto que su papel en la regulación de la vía MEV se debe principalmente a que el FPP es el punto de inicio de diferentes ramificaciones de la ruta (Fig. 2), y considerando que este sitio de la ruta es el punto que conduce a la síntesis de una gran variedad de productos finales, la regulación de FPPS deber ser altamente controlada.



**Fig. 2.** Síntesis de isoprenoides en citosol, retículo endoplasmático y mitocondria. HMGC<sub>o</sub>A-r, 3-hidroxi-3 metilglutaril CoA reductasa; IPP, isopentenil pirofosfato; DMAPP, dimetilalil pirofosfato; GPP, geranyl pirofosfato; FPP, farnesil pirofosfato; FPPS, farnesil pirofosfato sintasa; SS, escualeno sintasa; EA, 5-epi-aristolóqueno; EAS, 5-epi-aristolóqueno sintasa (Modificado de Masferrer *et al.*, 2002).

Al igual que los genes *Hmg*, en *A. thaliana* también se han encontrado diferentes isoformas de *FPPS*. Cunillera *et al.* (1996) encontraron que esta planta posee dos isoformas de *FPPS*: *FPS1* y *FPS2*. *FPS1* codifican para *FPS1S* y para *FPS1L*, las cuales difieren por una extensión de 41 aminoácidos en el N-terminal de *FPS1L*; dicha extensión funciona como marca de la isoforma dentro de la mitocondria. Las isoformas *FPS1S* y *FPS2* se encuentran en el citosol y en compartimentos del retículo endoplasmático. A partir de un análisis realizado en plantas de *A. thaliana* que poseen la construcción *FPS::GUS*, se ha postulado que cada isoforma de *FPS* podría tener un papel especializado en la dirección del flujo de los intermediarios de la ruta, para la síntesis de productos finales específicos. *FPS1S* podría funcionar como proveedora de *FPP* para la conversión de isoprenoides que sirvan a las funciones celulares generales de la planta; mientras que *FPS2* podría estar implicada en la síntesis de isoprenoides que sirvan en procesos más especializados (Cunillera *et al.*, 2000). Un estudio que señala la importancia de las isoformas de *FPS* en el control de la ruta *MEV*, fue reportado por Masferrer *et al.* (2002) en plantas de *A. thaliana* que sobreexpresan *FPS1S*. Estas plantas mostraron un fenotipo de senescencia y muerte celular prematura, además de un crecimiento menos vigoroso comparadas con las plantas silvestres; el inicio y la severidad de estos fenotipos fue asociado con los niveles de actividad de *FPS*. En hojas en donde existieron altos niveles de actividad de *FPS*, se observó una inducción prematura de los genes *SAG12* relacionados con senescencia. Otro experimento realizado con las transgénicas *FPS1S* de *A. thaliana*, mostró que éstas recobraron el fenotipo silvestre cuando fueron crecidas en presencia de mevalonato o citocinina 2-isopenteniladenina (2-iP). Asimismo, la cuantificación de citocininas demostró que la sobreexpresión de *FPS1S* reduce los niveles de citocininas endógenas de tipo zeatina. Estos resultados sugieren que los incrementos en la actividad de *FPS*, deben ir acompañados de un aumento en la síntesis de mevalonato, ya que de lo contrario se reducirían los niveles de *IPP* y *DMAPP* disponibles para la síntesis de citocininas (Masferrer *et al.*, 2002). Al respecto, también se ha sugerido que niveles específicos de los intermediarios de la vía *MEV* deben ser altamente controlados, particularmente aquellos localizados en las ramificaciones de la ruta, con el fin de evitar efectos deletéreos en el crecimiento y desarrollo de la planta (Manzano *et al.*, 2004).

### **Escualeno sintasa y biosíntesis de esteroides**

La escualeno sintasa (*SS*; EC 2.5.1.21) es una enzima de unión a membrana que cataliza la síntesis de escualeno a partir de *FPP*. La reacción consta de dos pasos, el primero es la condensación de dos *FPP* para producir preescualeno, un intermediario de 30 carbonos; el segundo paso es la reducción dependiente de *NADPH* del preescualeno para formar escualeno, la cual requiere de un



cación divalente ( $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$ ) como cofactor para que se lleve a cabo la catálisis (Jarsfer *et al.*, 2002). La enzima SS al igual que otras enzimas de la ruta MEV, es codificada por una pequeña familia de genes (Lee *et al.*, 2002). En *A. thaliana* Busquets *et al.* (2008) reportaron la presencia de dos genes SS: *SQS1* y *SQS2*, los cuales están organizados en tándem. En este trabajo los autores encontraron que el gen *SQS1* es expresado en todos los tejidos en desarrollo de la planta; mientras que *SQS2* es expresado principalmente en cotiledones, hipocótilos y en el tejido vascular de hojas. Asimismo, una forma soluble de la enzima (en este caso la isoforma *SQS2*) expresada en *Escherichia coli* y purificada, fue incapaz de sintetizar escualeno a partir de FPP en presencia de NADPH y  $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$ . Estos resultados sugirieron que en *A. thaliana*, *SQS2* no genera una enzima SS funcional y que sólo *SQS1* lo hace.

Se considera que la SS además de generar al precursor para la síntesis de triterpenos, esteroides y brasinoesteroides, también desempeña un papel importante en la regulación de la ruta MEV. Cambios en la actividad de SS es respuesta a un patógeno o a un elicitador han sido relacionados con una alterada proporción de FPP entre las ramificaciones de la ruta, cuyas enzimas compiten por este sustrato (Zook y Kuc, 1991). Al respecto, se ha reportado que en cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* expuestos a elicitores de tipo fungoso, la síntesis y acumulación de esteroides es reducida, lo cual se asocia con un dramático decremento de la actividad de SS (Vögeli y Chappell, 1988). Al igual que en tabaco, en rodajas de papa expuestas a ácido araquidónico se ha observado que tanto la acumulación de glicoalcaloides esteroidales (que son parte de la respuesta de defensa a daño), como la actividad de SS disminuyen. Determinaciones de los niveles de transcritos de SS en plantas de tabaco y papa expuestas a los elicitores descritos, indicaron que éstos permanecen constantes (Devarenne *et al.*, 2002). Estos resultados sugieren que en plantas expuestas a elicitores de tipo fungoso, la regulación de SS podría ocurrir a nivel traduccional y postraduccional.

Los esteroides, por otra parte, son esenciales para la fisiología celular de todos los organismos eucarióticos, y se ha reportado que mutaciones que eliminan algún paso enzimático para la síntesis de esteroides son letales (Tozawa *et al.*, 1999). Los esteroides se encuentran predominantemente en membrana celular contribuyendo con su apropiada funcionalidad, al controlar la fluidez membranal. Los esteroides también funcionan como precursores de hormonas esteroides, como los estrógenos y la testosterona en mamíferos, ecdisteroides en insectos y brasinoesteroides en plantas (Noguchi *et al.*, 1999). Los esteroides también han sido asociados con ligandos de receptores nucleares, que directamente afectan la transcripción y la transducción de señales. Al respecto, Jang *et al.* (2000)

sugirieron que los esteroides pueden servir como señales para controlar el destino celular durante la embriogénesis de las plantas.

### **5-Epi-aristoloqueno sintasa y biosíntesis de capsidiol**

A partir del FPP se generan varios sesquiterpenos gracias a la acción de las sesquiterpeno ciclasas (SC), la versatilidad de las ciclizaciones permite que sea posible generar hasta 7000 compuestos distintos (Bohlmann *et al.*, 1998). El primer paso en la síntesis de la fitoalexina sesquiterpénica capsidiol, es la ciclización del FPP a 5-epi-aristoloqueno. Dicha reacción es catalizada por una SC denominada 5-epi-aristoloqueno sintasa (EAS), y posteriormente mediante dos reacciones de hidroxilación en las posiciones 1 y 3 catalizadas por la 5-epi-aristoloqueno hidroxilasa (EAH), se genera el capsidiol (Takahashi *et al.*, 2005). Un análisis de hibridación de DNA genómico reveló que las SC forman parte de una familia multigénica; así en tabaco se detectaron de 12 a 15 copias de *EAS*, de las cuales sólo la *TEAS4* es inducible por patógenos o elicitores (Yin *et al.*, 1997). En este trabajo se encontró que fusiones del promotor *TEAS4* al gen reportero GUS, revelan una expresión inducible por distintas cepas de *P. parasitica* y por la cepa avirulenta *P. syringae* pv. *syringae* 61. Una mutante de la cepa 61 atenuada en su sistema de secreción también estimuló la expresión de *TEAS4::GUS*, lo que sugirió que la expresión de *TEAS4* se rige en parte por los mecanismos de “inmunidad innata” de la planta. En Chile, se ha reportado la presencia de cinco a ocho genes *EAS*, de los cuales sólo el gen *PEAS1* fue inducido en plantas expuestas a *P. capsici* (Zavala-Páramo *et al.*, 2000). Otros dos genes que codificaban para EAS, *CASC1* y *CASC2*, fueron reportados en plantas de Chile expuestas a luz UV y su expresión heteróloga en *E. coli* reveló una actividad que corresponde a la 5-epi-aristoloqueno sintasa (Back *et al.*, 2000). Cabe mencionar que la función bioquímica equivalente entre *TEAS4* y *PEAS1*, permite sugerir similitudes en la inducción de su expresión.

Lee *et al.* (2002) reportaron que la actividad de EAS en hojas de *C. annuum* fue rápidamente inducida en respuesta a tratamientos con luz UV, lo que se asoció con una acumulación similar de transcritos. Aunque generalmente la actividad de EAS se corresponde con la expresión de los genes, la acumulación de capsidiol no siempre está asociada con la actividad. Al respecto, Keller *et al.* (1998) reportaron que la actividad de SC en hojas de tabaco inoculadas con *Ralstonia solanacearum* no se relacionó con la acumulación de capsidiol. En este contexto, es posible especular que no sólo la actividad de EAS es clave en la síntesis de capsidiol, sino que también EAH constituye un paso importante para su síntesis o incluso para la síntesis de otros sesquiterpenos.

Uno de los primeros reportes acerca de la inducción de capsidiol se realizó en cultivos celulares de tabaco expuestos a celulasa (Threlfall y Whatehead, 1988); los cultivos mostraron una disminución de la actividad de SS, mientras que el capsidiol se acumuló. Al ser FPP también un sustrato de la SS que cataliza el primer paso para la síntesis de esteroides, es claro que debe existir una regulación coordinada entre SS y EAS para canalizar el metabolismo de acuerdo con los rendimientos de la planta, y en este caso para garantizar que el FPP se canalice hacia la producción de la fitoalexina en tabaco. La expresión de estas dos familias multigénicas, SS y EAS, y la actividad de las enzimas correspondientes, es inducida por diferentes tipos de estrés y por el ataque de patógenos. Por ejemplo, se ha reportado que en cultivos celulares de tabaco tratados con elicitores, existe una relación entre la inducción de la síntesis de sesquiterpenos y la supresión de la síntesis de esteroides (Devarenne *et al.*, 1998). En respuesta a un elicitador de tipo fungoso, Devarenne *et al.* (1998) demostraron que la actividad de SS se redujo a las 24 h posteriores a la exposición con el elicitador; mientras que la actividad de EAS se incrementó durante el mismo periodo de tiempo. Estos resultados sugieren que la inducción de una enzima y la supresión de otra, podrían ser uno de los mecanismos que regulan la producción de escualeno y sesquiterpenos en plantas.

En Chile, la principal fitoalexina sesquiterpénica es el capsidiol (Kuc y Rush, 1985) y su síntesis y acumulación se dispara como consecuencia de la aplicación o presencia de diversos elicitores bióticos (Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria, 1996) y abióticos (Back *et al.*, 1998) o bien, después de la inoculación con un patógeno. La evidencia hasta ahora generada indica que la acumulación de capsidiol no solo se da a nivel local, en el sitio de infección, sino también de manera sistémica. Al respecto, Maldonado-Bonilla *et al.* (2008) demostraron que existe acumulación de capsidiol local y sistémica en hojas de tabaco tratadas con celulasa y Pep-13, una glicoproteína derivada de pared celular de varias especies de *Phytophthora* que induce las respuestas de defensa en tabaco (Yu, 1995). La acumulación de capsidiol fue acompañada por una inducción de la actividad de TEAS en el mismo tejido. Asimismo, en hojas de Chile estos autores demostraron que los tratamientos con celulasa y Pep-13 indujeron también la acumulación de ROS, además de la expresión de *PEAS1* local y sistémicamente. De igual manera la acumulación de capsidiol fue acompañada por una expresión similar de *PEAS1*.

El capsidiol, es una de las fitoalexinas más estudiadas con relación al nivel de producción luego del ataque principalmente por oomicetos y hongos fitopatógenos. Sin embargo, a pesar del conocimiento relativamente amplio que se tiene acerca de esta fitoalexina, poco se sabe de la

dinámica de su acumulación en raíces infectadas por nematodos agalladores y de su efecto tóxico en estos fitopatógenos. En general, es poco el conocimiento que se tiene acerca de la acumulación de fitoalexinas en interacciones planta-nematodo comparado con el que existe para otros fitopatógenos. De los pocos reportes existentes, podemos citar la acumulación de gliceolina en plantas de soya después de la infección por *M. incognita* (Kaplan *et al.*, 1980) y *H. glycines* (Huang y Barker, 1991). En el caso de la interacción de *Pinus strobus*-*Bursaphelenchus xylophilus* ocurrió la acumulación de un estilbeno (3-*O*-metildihidropinosilvin estilbenoide) y una flavonona (2*S*-pinocembrin flavonona), ambos con propiedades antimicrobianas (Hanawa *et al.*, 2001). En la interacción compatible chile CM-334-*N. aberrans*, aunque se tiene el antecedente de que en presencia del nematodo hubo una menor acumulación de la fitoalexina capsidiol (Godinez-Vidal *et al.*, 2009), se desconoce tanto la toxicidad de la fitoalexina en el nematodo, como la relación que existe entre la acumulación del capsidiol y el desarrollo del nematodo en las raíces infectadas.

### **5-Epi-aristoloqueno hidroxilasa**

El último paso en la biosíntesis de capsidiol es la hidroxilación del 5-epi-aristoloqueno en las posiciones 1 y 3. La primera evidencia de hidroxilasas del 5-epi-aristoloqueno se reportó en frutos de chile tratados con ácido araquidónico (AA), a partir de los cuales se purificó una enzima citocromo P-450 que hidroxila el carbono 3 (5-epi-aristoloqueno-3-hidroxilasa) (Hoshino *et al.*, 1995). Ralston *et al.* (2001) reportaron la clonación de cuatro hidroxilasas en plantas de tabaco, que corresponden a la citocromo P-450 y que son inducibles por celulasa; sus cinéticas de inducción y sus actividades son variables. Martínez-Quintana (2005), demostró que en raíces transformadas de tabaco tratadas con celulasa y extractos de levadura, se logró inducir una dihidroxilasa (EADH) cuya cinética fue similar a la mostrada por TEAS.

## Metabolitos secundarios asociados con la resistencia a nematodos

Entre los metabolitos secundarios que participan en la resistencia a nematodos, se encuentran diversos compuestos isoprenoides, flavonoides y glucosinolatos.

**Terpenoides.** Los compuestos isoprenoides han mostrado tener un efecto tóxico sobre nematodos fitoparásitos. Algunos monoterpenos bloquean el reconocimiento de la planta por el nematodo (Bauske *et al.*, 1994). Estudios *in vitro* en donde se realizaron tratamientos al suelo con monoterpenos como citral, mentol, geraniol, limoneno y  $\alpha$ -terpineol, redujeron el número de juveniles de *M. incognita*, *M. javanica* y *H. schachtii* (Viglierchio y Wu, 1989; Bauske *et al.*, 1994). Un estudio comparativo de las actividades nematocidas del geraniol y el citronelol, mostró que los alcoholes-monoterpenos son más activos que los aldehídos-monoterpenos contra *Anguina tritici*, *Tylenchulus semipenetrans*, *H. avenae* y *M. javanica* (Sangwan *et al.*, 1990).

Los sesquiterpenos, se sintetizan en respuesta a la infección por nematodos (Veech y McClure, 1977; Zinov'eva y Chalova, 1987; Chitwood y Lusby, 1991). Por ejemplo, los sesquiterpenos bicíclicos risitina y lubimina aislados de plantas de papa resistentes a *Ditylenchus destructor*, tienen un efecto nemastático en juveniles de *D. destructor* y *D. dipsaci* (Zinov'eva y Chalova, 1987). También los aldehídos sesquiterpenos derivados de plantas de algodón resistentes a nematodos, como el gosispol y el hemigosispol, determinan la resistencia a *M. incognita* (Veech y McClure, 1977). En estas plantas, después de la invasión de las raíces por el nematodo, el contenido de gosispol y sus derivados se incrementa en el tejido infestado. Veech y McClure determinaron que los nematodos pierden totalmente su movilidad luego de la exposición por 5 h a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de este aldehído sesquiterpénico. En el caso de la fitoalexina sesquiterpénica capsidiol, en general el conocimiento acerca de su acumulación en interacciones planta-nematodo es incipiente comparado con el que se tiene para otros fitopatógenos. Recientemente se demostró que concentraciones de 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  tienen un efecto nemastático en juveniles del segundo estadio de *N. aberrans in vitro* (Godinez-Vidal *et al.*, 2010).

Los diterpenos como la odoracina y la daphneolona, derivados de raíces de *Daphne odora*, mostraron efectos tóxicos contra *Aphelenchoides besseyi in vitro*; la odoracina pura a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mató el 100% de los nematodos (Chitwood, 1992). Chitwood sugirió que la actividad nematocida de estos diterpenos, posiblemente depende de la presencia de grupos OH en la estructura.

En cuanto a los triterpenos, se sabe que los esteroides juegan un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de los nematodos (Chitwood y Lusby, 1991). Los esteroides como principales componentes de las membranas celulares y precursores de compuestos fisiológicamente activos como las hormonas, son esenciales para los nematodos. Se ha mostrado que la resistencia a nematodos también puede asociarse con la concentración y tipo de esteroides presentes en la planta; así por ejemplo, la invasión por nematodos agalladores en plantas resistentes de tomate disminuyó el contenido de esteroides totales particularmente el estigmasterol; pero en plantas susceptibles se incrementó (Zinov'eva *et al.*, 2001). También, se ha señalado que generalmente el decremento en el contenido de esteroides en las raíces de las plantas, es acompañado por una acumulación de fitoalexinas sesquiterpénicas (Devarenne *et al.*, 1998; Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008).

Los esteroides glicoalcaloides como la  $\alpha$ -chaconina y la  $\alpha$ -tomatina, tienen efectos nocivos en nematodos. En *Panagrellus redivivus*, la LD<sub>50</sub> para la  $\alpha$ -chaconina y la  $\alpha$ -tomatina fue de 50 y 85  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, y fue dependiente del pH (similar a lo que ocurre con la mayoría de compuestos que contienen nitrógeno). Su efecto nocivo se asoció con la presencia de átomos de nitrógeno no protonados (Chitwood, 1992). Otros estudios han denotado la actividad de la azadirachtina, un limonoide aislado del árbol del neem (*Azadirachta indica*), que posee efectos nematocidas contra *A. composticola*, *Pratylenchus brachyrurus* y *P. zae* (Zinov'eva *et al.*, 2001). Los esteroides glicósidos, por otra parte, no son tóxicos por si mismos pero los productos de su hidrólisis (como las agliconas) son altamente tóxicos a nematodos (Meher *et al.*, 1988; Vasil'eva y Paseshnichenko, 2000). Los daños a las células vegetales causados por patógenos generalmente son acompañados por una reducción de la permeabilidad del tonoplasto, lo que favorece la liberación de los glicósidos presentes en las vacuolas, que al sufrir hidrólisis en el citoplasma generan las agliconas altamente tóxicas (Vasil'eva y Paseshnichenko, 2000). Los furostanol glicósidos como la asparanina, asparanina B, albicinina y sonunina (derivados de plantas de las familias Liliaceae y Fabaceae), aplicados a una concentración de 200  $\mu\text{g/mL}$  tuvieron un efecto nematocida sobre *M. incognita*; tal efecto se debe a un incremento en el número de carbohidratos en el glucósido (Meher *et al.*, 1988).

**Flavonoides.** Dentro de este grupo podemos citar la acumulación de la fitoalexina gliceolina en plantas de soya después de la infección por *M. incognita* (Kaplan *et al.*, 1980) y *H. glycines* (Huang y Barker, 1991). En el caso de la interacción de *P. strobus*-*B. xylophilus* ocurrió la acumulación de un estilbeno (3-*O*-metildihidropinosilvin estilbenoide) y una flavonona (2*S*-pinocembrina flavonona),

ambos con propiedades antimicrobianas (Hanawa *et al.*, 2001). También en las interacciones incompatibles chile CM-334 con *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*, se encontró que el contenido de fenoles solubles totales se incrementó, especialmente el ácido clorogénico (Pegard *et al.*, 2005). En contraste con lo anterior, en la interacción compatible chile CM-334 con *N. aberrans*, la acumulación de compuestos fenilpropanoides (fenoles solubles y particularmente el ácido clorogénico) se redujo (López-Martínez *et al.*, 2010). En genotipos de *C. cajan* resistentes a *F. udum*, también se observaron decrementos en la acumulación de la fitoalexina isoflavonoide cajanol después de la infección por *M. incognita* y *M. javanica* (Marley y Hillocks, 1994).

**Glucosinolatos.** Para este tipo de compuestos se tiene el antecedente de que los alil isotiocianatos y los alil cianidos, dos productos de la hidrólisis de la sinigrina tienen un LD<sub>50</sub> de 0.04 g/L y 3 g/L, respectivamente, sobre el nematodo bacteriófago *Caenorhabditis elegans*. En este estudio se observó que los alil isotiocianatos son tres veces más tóxicos a *C. elegans* que el mismo glucosinolato; hecho que sugirió que la aplicación de glucosinolatos, para la formación de isotiocianatos, podría ayudar en el control de nematodos (Donkin *et al.*, 1995).

#### IV. LITERATURA CITADA

- Abawi, S. and R. Barker. 1984.** Effects of cultivar, soil o temperature and population levels of *Meloidogyne incognita* on root necrosis and *Fusarium* wilt of tomatoes. *Phytopathology* 74:433-438.
- Bach, T. and H. Lichtenthaler. 1982.** Mechanisms of inhibition by mevinolin (MK 803) of microsomes from radish and of partially purified yeast HMG-CoA reductase. *Z Naturforsch [C]* 38:212-219.
- Bach, T., T. Weber and A. Motel. 1990.** Some properties of enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA in plants. Pp. 1-82. *In: G. Towers and H. Stafford, eds. Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids. Recent Advances in Phytochemistry. Vol. 24. Plenum Press, New York.*
- Bach, J., A. Wettstein, A. Boronat, A. Ferrer, M. Enjuto, W. Grisse and J.O. Narita. 1991.** Properties and molecular cloning of plant HMG-CoA reductase. Pp. 29-49. *In: G. Patterson and W. Nes, eds. Physiology and Biochemistry of Sterols. American Oil Chemist's Society, Champaign, IL.*
- Bach, J., A. Boronat, N. Campos, A. Ferrer and K. Wollack. 1997.** Mevalonate biosynthesis in plants. Pp. 135-150. *In: E. Parish and W. Nes, eds. Biochemistry and function of sterols. CRC Press, Boca Raton, FL.*
- Back, K., S. He, K.U. Kim and D.H. Shin. 1998.** Cloning and Bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiology* 39:899-904.
- Back, K., J. Nah, S.B. Lee, J.H. Song, D.H. Shin and H.Y Kim. 2000.** Cloning of a sesquiterpene cyclase and its functional expressions by domain swapping strategy. *Molecules and Cells* 10:220-225.
- Basson, M., M. Thorsness and J. Rine. 1986.** *Saccharomyces cerevisiae* contains two functional genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Proceedings of the National Academy of Science* 83:5563-5567.
- Bauske, E.M., R. Rodriguez-Kabana, V. Estaún, J.W. Kloepper, D.J. Robertson, C.F. Weaver and P.S. King. 1994.** Management of *Meloidogyne incognita* on cotton by use of botanical aromatic compounds. *Nematropica* 24:143-150.
- Bell, A. 1981.** Biochemical mechanism of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology* 32:21-81.



- Bellafiore, S., Z. Shen, M.N. Rosso, P. Abad, P. Shih and S.P. Briggs. 2008.** Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. PLoS Pathogens 4:e1000192.
- Bick, A. and M. Lange. 2003.** Metabolic cross talk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis: unidirectional transport of intermediates across the chloroplast envelope membrane. Archives of Biochemistry and Biophysics 415:146-154.
- Bohlmann, J., G. Meyer-Gauen and R. Croteau. 1998.** Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 95:4126-4133.
- Bloch, K. 1992.** Sterol molecule: structure, biosynthesis and function. Steroids 57:378-382.
- Bochar, D.A., J.A. Friesen, C.V. Stauffacher and V.W. Rodwell. 1999.** Biosynthesis of mevalonic acid from acetyl-CoA. Pp. 15-44, In: D. Cane, ed. Comprehensive natural product chemistry. Isoprenoids including carotenoids and steroids. Vol. 2. Elsevier, Oxford, United Kingdom.
- Bonnet, J., S. Danan, C. Boudet, L. Barchi, A.M. Sage-Palloix, B. Caromel, A. Palloix and V. Lefebvre. 2007.** Are the polygenic architectures of resistance to *Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper?. Theoretical and Applied Genetics 115:253-264.
- Bowman, P. and J. Blomm. 1966.** Breaking the resistance of tomato varieties to *Fusarium* wilt by *Meloidogyne incognita*. Phytopathology 56:871.
- Busquets, A., V. Keim, M. Closa, A. del Arco, A. Boronat, M. Arró and A. Ferrer. 2008.** *Arabidopsis thaliana* contains a single gene encoding squalene synthase. Plant Molecular Biology 67:25-36.
- Caillaud, M.C., G. Dubreuil, M. Quentin, L. Perfus-Barbeoch, P. Lecomte, J. de Almeida Engler, P. Abad, M.N. Rosso and B. Favery. 2008.** Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. Journal of Plant Physiology 165:104-113.
- Candela, M.E., M.D. Alcázar, A. Espin, C. Egea and L. Almela. 1995.** Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. Plant Pathology 44:116-123.
- Candela, M.E., C. Egea, M.D. García-Pérez, J. Costa and M. Candela. 2000.** Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. Acta Horticulturae 522:79-86.
- Chappell, J. and R. Nable. 1987.** Induction of sesquiterpenoids biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor. Plant Physiology 85:469-473.
- Chappell, J. 1995.** The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. Plant Physiology 107:1-6.

- Chávez-Moctezuma, M.P. and E. Lozoya-Gloria. 1996.** Biosynthesis of the sesquiterpenic phytoalexin capsidiol in elicited root cultures of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Reports* 15:360-366.
- Chen, B., W.H. Piel, L. Gui, E. Bruford and A. Monteiro. 2005.** The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. *Genomics* 86:627-637.
- Chitwood, D. and W. Lusby. 1991.** Metabolism of plant sterols by nematodes. *Lipids* 26:619-627.
- Chitwood, D.J. 1992.** Nematicidal compounds from plants. Pp. 185-204. *In:* H.N. Nigg and D. Seigler, eds. *Phytochemical resources for medicine and agriculture*. Plenum Press, New York.
- Choi, D., B. Ward and R. Bostock. 1992.** Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* 4:1333-1344.
- Conkling, A., C. Cheng, Y. Yamamoto and H. Goodman. 1990.** Isolation of transcriptionally regulated root-specific genes from tobacco. *Plant of Physiology* 93:1203-1211.
- Cramer, C., D. Weissenborn, C. Cottingham, C. Denbow, J. Elsenback, D. Radin and X. Xu. 1993.** Regulation of defense-related gene expression during plant-pathogen interactions. *Journal of Nematology* 25:507-518.
- Cunillera, N., M. Arró, D. Delourme, F. Karst, A. Boronat and A. Ferrer. 1996.** *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. *The Journal of Biological Chemistry* 271:7774-7780.
- Cunillera, N., A. Boronat and A. Ferrer. 2000.** Spatial and temporal patterns of GUS expression directed by 5' regions of the *Arabidopsis thaliana* farnesyl-diphosphate synthase genes FPS1 and FPS2. *Plant Molecular Biology* 44:747-758.
- Davis, E., R. Hussey, T. Baum, J. Bakker, A. Schots, M. Rosso and P. Abad. 2000.** Nematode parasitism genes. *Annual Review of Phytopathology* 38:365-396.
- de Almeida Engler J., K. Van Poucke, M. Karimi, R. De Groodt, G. Gheysen, G. Engler and G. Gheysen. 2004.** Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. *The Plant Journal* 38:12-26.
- Devarenne, T.P., D.H. Shin, K. Back, S. Yin and J. Chappell. 1998.** Molecular characterization of tobacco squalene synthase and regulation in response to fungal elicitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 349:205-215.
- Devarenne, T.P., A. Ghosh and J. Chappell. 2002.** Regulation of squalene synthase, a key enzyme of sterol biosynthesis, in tobacco. *Plant Physiology* 129:1095-1106.

- Diez, J. and L. Gil. 1998.** Variability in phenylalanine ammonia-lyase activity among cell cultures of elm clones inoculated with *Ophiostoma novo-ulmi* spores. *Plant Physiology* 47:687-692.
- Donkin, S.G., M.A. Eiteman and P.L. Williams. 1995.** Toxicity of glucosinolates and their enzymatic decomposition products to *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Nematology* 27:258-262.
- Edens, M., S. Anand and R. Bolla. 1995.** Enzymes of the phenylpropanoid pathway in soybean infected with *Meloidogyne incognita* or *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 27:292-303.
- Egea, C., M.D. Alcázar and M.E. Candela. 1996.** Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 98:737-742.
- Eisenreich W., F. Rohdich and A. Bacher. 2001.** Deoxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* 6:78-84.
- Evangelista, M., S. Zigmond and C. Boone. 2003.** Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *Journal of Cell Science* 116:2603-2611.
- Favery, B., P. Lecomte, N. Gil, N. Bechtold, D. Bouchez, A. Dalmasso and P. Abad. 1998.** RPE, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. *The EMBO Journal* 17:6799-6811.
- Fernández-Pavía, S. 1997.** Host-Pathogen interactions in the root rot resistant *Phytophthora capsici*/*Capsicum annuum* CM-334 pathosystem. Ph. D. Thesis. New Mexico State University. Las Cruces, New Mexico. 109 p.
- Fernández-Pavía, S. and C. Liddell. 1997.** Resistance of *Capsicum annuum* CM-334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. *Phytopathology* 87:529.
- France, A. and G. Abawi. 1994.** Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on selected bean genotypes. *Journal of Nematology* 26:467-474.
- Flesch, G. and M. Rohmer. 1988.** Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. Formation of isoprenic units from two distinct acetate pools and a novel type of carbon/carbon linkage between a triterpene and D-ribose. *European Journal of Biochemistry* 175:405-11.
- García-Pérez, M.D., C. Egea and M.E. Candela. 1998.** Defense response of pepper (*Capsicum annuum*) suspension cells to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 103:527-533.
- Gayoso, C., F. Pomar, F. Merino and M.A. Bernal. 2004.** Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. *Scientia Horticulturae* 102:1-13.

- Gibson, W. and J. Pickett. 1983.** Wild potato repels aphids by release of aphid alarm pheromone. *Nature* 302:608-609.
- Glosier, B.R., E.A. Oguniwin, G.S. Sidhu, D.R. Sisco and J.P. Prince. 2008.** A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. Physiological races of *P. capsici* in pepper. *Euphytica* 162:23-30.
- Goddijn, M., K. Lindsey, F. Van der Lee, J. Klap and P. Sijmons. 1993.** Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harboring promoter-gusA fusion constructs. *Plant Journal* 4:863-873.
- Godinez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, E.B. Sepúlveda-García, J. Lara-Reyna, R. Rojas-Martínez and E. Zavaleta-Mejía. 2008.** Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology* 120:299-303.
- Godinez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, P. León-Mejía, E. Lozoya-Gloria and E. Zavaleta-Mejía. 2009.** Changes in the mevalonate pathway in chili CM-334 infected by *Nacobbus aberrans*. XII National Congress of Biochemistry and Plant Molecular Biology & 6th Symposium México-USA. November 9-13. Guanajuato, México. P\_91.
- Godinez-Vidal, D. M. Soto-Hernández, M. Rocha Sosa, E. Lozoya-Gloria, R.I. Rojas-Martínez and E. Zavaleta-Mejía. 2010.** Capsidiol accumulation in chilli CM-334 infected by *Nacobbus aberrans* and its effect on second stage juveniles. *Nematropica* (*in press*).
- Goldstein, J. and M. Brown. 1990.** Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425-430.
- Hanawa, F., T. Yamada and T. Nakashima. 2001.** Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytochemistry* 57:223-228.
- Hermsmeier, D., J. Hart, M. Byzova, S. Rodermel and T. Baum. 2000.** Changes in mRNA abundance within *Heterodera schachtii*-infected roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:309-315.
- Hernández, A., E. Zavaleta-Mejía y G. Carrillo. 1992.** Efecto de *Nacobbus aberrans* (Thorne y Allen, 1994) en la infección de *Phytophthora capsici* Leo. en Chile. *Revista Mexicana de Fitopatología* 10:166-174.
- Hoshino, T., T. Yamaura, H. Imaishi, M. Chida, Y. Yoshizawa, K. Higashi, H. Ohkawa and J. Mizutani. 1995.** 5-epi-aristoloquene 3-hydroxylase from green pepper. *Phytochemistry* 38:609-613.
- Huang, J.S. and K.R. Barker. 1991.** Glyceollin I in soybean-Cyst nematode interactions. *Plant Physiology* 96:1302-1307.

- Inoue, S., S. Bar-Nun, J. Roitelman and R. Simoni. 1991.** Inhibition of degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase *in vivo* by cysteine protease inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 266:13311-13317.
- Jain, K., D. Bhatti and A. Taneja. 1987.** Nematode development and biochemical changes in susceptible and resistant tomato infected with root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). *Haryana Agricultural University Journal of Research* 17:24-29.
- Jain, K., R. Vincent and C. Nessler. 2000.** Molecular characterization of a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase gene from mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Molecular Biology* 42:559-569.
- Jammes, F., P. Lecomte, J. de Almeida-Engler, F. Bitton, M.L. Martin-Magniette, J.P. Renou, P. Abad and B. Favery. 2005.** Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 44:447-58.
- Jang, J.C., S. Fujioka, M. Tasaka, H. Seto, S. Takatsuto, A. Ishii, M. Aida, S. Yoshida and J. Sheen. 2000.** A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the fackel mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* 14:1485-1497.
- Jarsfater, M.B., D.L. Zhang and C.D. Poulter. 2002.** Recombinant squalene synthase. Synthesis of non-head-to-tail isoprenoids in the absence of NADPH. *Journal of the American Chemical Society* 124:8834-8845.
- Jaubert, S., J.B. Laffaire, T.N. Ledger, P. Escoubas, E.Z. Amri, P. Abad and M.N. Rosso . 2004.** Comparative analysis of two 14-3-3 homologues and their expression pattern in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *International Journal for Parasitology* 34:873-880.
- Jelesko, J., S. Jenkins, M. Rodríguez-Concepción and W. Gruissem. 1999.** Regulation of tomato *hmg1* during cell proliferation and growth. *Planta* 208:310-318.
- Kaplan, D.T., N.T. Keen and I.J. Thomason. 1980.** Association of glyceollin with the incompatible response of soybean roots to *Meloidogyne incognita*. *Physiological Plant Pathology* 16:309-318.
- Kasahara, H., A. Hanada, T. Kuzuyama, M. Takagi, Y. Kamiya and S. Yamaguchi. 2002.** Roles of the mevalonate and methylerythritol phosphate pathways in the biosynthesis of gibberellins in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277:45188-94.
- Keller, H., P. Czernic, M. Ponchet, P.H. Ducrot, K. Back, J. Chappell, P. Ricci and Y. Marco. 1998.** Sesquiterpene cyclase is not a determining factor for elicitor- and pathogen- induced capsidiol accumulation in tobacco. *Planta* 205:467-476.
- Kuc, J., and J.S. Rush. 1985.** Phytoalexins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 236:455-572.
- Kuc, J. 1997.** Molecular aspects of plant responses to pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* 19:551-559.

- Lee, J.H., Y.H. Yoon, H.Y. Kim, D.H. Shin, D.U. Kim, I.J. Lee and K.U. Kim. 2002.** Cloning and expression of squalene synthase cDNA from hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Molecules and Cells* 13:436-443.
- Liscum, L., R. Cummings, G. Anderson, G. DeMartino, J. Goldstein and M. Brown. 1983.** 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: a transmembrane glycoprotein of the endoplasmic reticulum with N-linked "high-mannose" oligosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Science* 80:7165-7169.
- Liscum, L., J. Finer-Moore, R. Stroud, K. Luskey, M. Brown and J. Goldstein. 1985.** Domain structure of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a glycoprotein of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 260:522-530.
- Lois, M., M. Rodríguez-Concepción, F. Gallego, N. Campos and A. Boronat. 2000.** Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant Journal* 22:503-13.
- López-Martínez, N., M.T. Colinas-León, C.B. Peña-Valdivia, Y. Salinas-Moreno, P. Fuentes-Montiel, M. Biesaga and E. Zavaleta-Mejía. 2010.** Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant Soil* DOI 10.1007/s11104-010-0553-5.
- Lumbreras, V., N. Campos and A. Boronat. 1995.** The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* *HMG1* gene generates an mRNA that encodes a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase isoform with an extended N-terminal region. *The Plant Journal* 8:541-549.
- Maldonado-Bonilla, L.D., M. Betancourt-Jiménez and E. Lozoya-Gloria. 2008.** Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *European Journal of Plant Pathology* 121:439-449.
- Manzanilla-López, R.H., M.A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R.N. Inserra, P.S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R.M. Souza and K. Evans. 2002.** The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149-227.
- Manzano, D., X. Fernández-Busquets, H. Schaller, V. González, A. Boronat, M. Arró and A. Ferrer. 2004.** The metabolic imbalance underlying lesion formation in *Arabidopsis thaliana* overexpressing farnesyl diphosphate synthase (isoform 1S) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity. *Planta* 219:982-992.

- Marley, P.S. and R.J. Hillocks. 1994.** Effect of root-knot nematodes on cajanol accumulation in the vascular tissues of pigeonpea after stem inoculation with *Fusarium udum*. *Plant Pathology* 43:172-176.
- Martínez-Quintana, J. 2005.** Estudio de la producción de capsidiol y nicotina en raíces peludas de tabaco. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Campus Irapuato. Irapuato, Guanajuato.
- Masferrer, A., M. Arró, D. Manzano, H. Schaller, X. Fernández-Busquets, P. Moncaleán, B. Fernández, N. Cunillera, A. Boronat and A. Ferrer. 2002.** Overexpression of *Arabidopsis thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *The Plant Journal* 30:123-132.
- Meher, H.C., S. Walia and C.L. Sethi. 1988.** Effect of steroidal saponins on the mobility of juveniles of *Meloidogyne incognite*. *Indian Journal of Nematology* 18:244-247.
- Melillo, M.T., P. Leonetti, M. Bongiovanni, P. Castagnone-Sereno and T. Bleve-Zacheo. 2006.** Modulation of reactive oxygen species activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. *New Phytologist* 170:501-512.
- Monfar, M., C. Caelles, L. Balcells, A. Ferrer, F. Hegardt and A. Boronat. 1990.** Molecular cloning and characterization of plant 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Pp. 83-97. *In*: G. Towers and H. Stafford, eds. *Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids*. Recent Advances in Phytochemistry. Vol. 24. Plenum Press, New York.
- Narita, J. and W. Gruissem. 1989.** Tomato hidroxy-methylglutaryl Co A reductase is required early in fruit development but not during ripening. *Plant Cell* 1:181-190.
- Noguchi, T., S. Fujioka, S. Takatsuto, A. Sakurai, S. Yoshida, J.M. Li and J. Chory. 1999.** *Arabidopsis det2* is defective in the conversion of (24r)-24-methylcholest-4-en-3-one to (24r)-24-methyl-5 alpha-cholestan-3-one in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology* 120:833-839.
- Ohyama, K., M. Suzuki, K. Masuda, S. Yoshida and T. Muranaka. 2007.** Chemical phenotypes of the *hmg1* and *hmg2* mutants of *Arabidopsis* demonstrate the *in-plant* role of HMG-CoA reductase in triterpene biosynthesis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 55:1518-1521.
- Oka, Y., I. Chet and Y. Spiegel. 1997.** Accumulation of lectins in cereal roots invaded by the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51:333-345.
- Ortega, G. R., C. Palazón E. and J. Cuartero Z. 1991.** Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the Mexican pepper SCM-334. *Plant Breeding* 107:50-55.

- Parker, R., S. Miller and D. Gibson. 1984.** Phosphorylation of microsomal HMG-CoA reductase increases susceptibility to proteolytic degradation *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 125:629-635.
- Parra, G. and J.B. Ristaino. 2001.** Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Disease* 85:1069-1075.
- Pegard, A., G. Brizzard, A. Fazari, O. Soucaze, P. Abad and C. Djian-Caporalino. 2005.** Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95:158-165.
- Potenza, C., S. Thomas and C. Sengupta-Gopalan. 2001.** Genes induced during early response to *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible alfalfa cultivars. *Plant Science* 161:289-299.
- Qureschi, N. and J.W. Porter. 1981.** Conversion of acetyl-coenzyme A to isopentyl pyrophosphate. Pp. 47-94. *In: Porter and S.L. Spurgeon, eds. Biosynthesis of Isoprenoid Compounds. Vol.1.* John Wiley and Sons, New York.
- Ralston, L. S.T. Kwon, M. Schoenbeck, J. Ralston, D.J. Schenk, R.M. Coates and J. Chappell. 2001.** Cloning, heterologous expression and functional characterization of 5-epi-aristolochene-1-3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 15:222-235.
- Redondo, E. y R. Rodríguez. 1987.** Mecanismos de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 77:123-137.
- Redondo, E., R. Rodríguez, M. Ortega, A. Larqué y E.M. Engleman. 1989.** Mecanismo de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 77:123-137.
- Rezk, A., I. Ibrahim and A. Ibrahim. 1987.** Efecto a root-knot nematodes on the phenolic contents of barley and wheat. *Nematropica* 15:259-263.
- Ristaino, J.B. and S.B. Johnston. 1999.** Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Disease* 83:1080-1089.
- Rodríguez-Concepción, M. and A. Boronat. 2002.** Elucidation of methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology* 130:1079-1089.
- Russell, W., J. Knight and T. Wilson. 1985.** Pea seedling HMG-CoA reductases: regulation of activity *in vitro* by phosphorylation and  $Ca^{2+}$ , and posttranslational control *in vivo* by phytochrome and



- isoprenoid hormones. Pp.191-206. *In*: D. Randall, D. Blevins and R. Larson, eds. Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology. Vol. 4. University of Missouri-Columbia.
- Salisbury, F. and C. Ross. 1996.** Plant Physiology. 4a edition. Wadsworth Publishing. California, USA. 759 p.
- Sangwan, N.K., B.S. Verma, K.K. Verma and K.S. Dhindsa. 1990.** Nematicidal activity of some essential plant oils. Pesticide Science 28:333-335.
- Sasser, N., G. Lucas and H. Powers. 1995.** The relationship of root-knot nematodes to blank shank resistance in tobacco. Phytopathology 45:459-461.
- Stermer, B., L. Edwards, B. Edington and R. Dixon. 1991.** Analysis of elicitor-inducible transcripts encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in potato. Physiological and Molecular Plant Pathology 39:135-145.
- Stevens, L. 1984.** Biological activity and chemistry of sesquiterpene lactones. Pp. 65-80. *In*: W. Nes, G. Fuller and L-S. Tsai, eds. Isopentenoids in Plants. Marcel Dekker, New York.
- Stoessl, J., B. Sothers and E. Ward. 1976.** Sesquiterpenoid stress compounds of the Solanaceae. Phytochemistry 15:855-873.
- Sugden, C., P.G. Donaghy, N.G. Halford and D.G. Hardie. 1999.** Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase *in vitro*. Plant Physiology 120:257-274.
- Sun-Hwa, H., K. Jong-Bum, H. Young-Soo and L. Shin-Woo. 2003.** Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced *Hmg2* from pepper (*Capsicum annum*). Biochemica et Biophysica Acta 1625:253-260.
- Suzuki, M., Y. Kamide, N. Nagata, H. Seki, K. Ohyama, H. Kato, K. Masuda, S. Sato, T. Kato, S. Tabata, S. Yoshida and T. Muranaka. 2004.** Loss of functions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (*HMG1*) in *Arabidopsis* leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels. The Plant Journal 37:750-761.
- Sy, O., P.W. Bosland and R. Steiner. 2005.** Inheritance of *Phytophthora* stem blight resistance as compared to *Phytophthora* root rot and *Phytophthora* foliar blight resistance in *Capsicum annum* L. Journal of the American Society of Horticultural Sciences 130:75-78.
- Takahashi, S.T. Kusumaya and H. Seto. 1999.** Purification, characterization and cloning of a Eubacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a key enzyme involved in biosynthesis of terpenoid. Journal of Bacteriology 181:1256-1263.
- Takahashi, S., Y. Zhao, P.E. O'Maille, B.T. Greenhagen, J.P. Noel, R.M. Coates and J. Chappell.**

2005. Kinetic and molecular analysis of 5-*epi*-aristolochene 1,3-dihydroxylase, a cytochrome P450 enzyme catalyzing successive hydroxylation of sesquiterpenes. *The Journal of Biological Chemistry* 280:3686-3696.
- Threlfall, D.R. and I.M. Whitehead. 1988.** Co-ordinated inhibition of squalene synthase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 27:2567-2580.
- Tozawa, R., S. Ishibashi, J. Osuga, H. Yagyu, T. Oka, Z. Chen, K. Ohashi, S. Perrey, F. Shionoiri and N. Yahagi. 1999.** Embryonic lethality and defective neural tube closure in mice lacking squalene synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 274:30843-30848.
- Trujillo-Viramontes, F., E. Zavaleta-Mejía, R.I. Rojas-Martínez y 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* 35:37-44.
- Van Der Eycken, W., A. Niebel, D. Inze, M. Van Montagu and G. Gheysen. 1992.** Molecular analysis of the interaction between *Meloidogyne incognita* and tomato. 21<sup>st</sup>. Int. Nematol. Symp. *Nematologica* 38:441.
- Vasil'eva, I.S. and V.A. Paseshnichenko. 2000.** *Usp. Biol. Khimii* 40:153-204.
- Vargas, M., E. Zavaleta-Mejía y A.M. Hernández. 1996.** Rompimiento de Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en Chile serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26:159-166.
- Vargas, M. 1998.** Cambios inducidos por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen en la actividad de fenilalanina amonio-liasa (PAL) en plantas de Chile (*Capsicum annum* L.) serrano CM-334 resistentes a *Phytophthora capsici* Leo. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 41 p.
- Veech, J.A. and M.A. McClure. 1977.** Terpenoid aldehydes in cotton roots susceptible and resistant to the root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 9:225-229.
- Viglierchio, D.R. and F.F. Wu. 1989.** Selected biological inhibitors for *Heterodera schachtii* control. *Nematropica* 19:75-79.
- Villar-Luna, E., B. Reyes-Trejo, R.I. Rojas-Martínez, O. Gómez-Rodríguez, A.M. Hernández-Anguiano y E. Zavaleta-Mejía. 2009.** Respuesta hipersensitiva en el follaje de CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.
- Vögeli, U. and J. Chappell. 1998.** Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiology* 88:1291-1296.

- Williamson, M. and R. Hussey. 1996.** Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8:1735-1745.
- Yin, S., L. Mei, J. Newmann, K. Back and J. Chappell. 1997.** Regulation of sesquiterpene cyclase gene expression. *Plant Physiology* 115: 437-451.
- Yu, L.M. 1995.** Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA.* 92:4088-4094.
- Zavala-Páramo, G., M.P. Chavez-Moctezuma, E. Garcia-Pineda, S. Yin, J. Chappell and E. Lozoya-Gloria. 2000.** Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene synthase gene (*gPEAS1*) from chili pepper (*Capsicum annuum*). *Physiologia Plantarum* 110:410-418.
- Zavaleta-Mejía, E. 2002.** Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparásitos, una hipótesis. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:118-122.
- Zinov'eva, S.V. and L.I. Chalova. 1987.** Phytoalexins of potato and their role in the resistance to stem nematodes. *Helminthologia* 24:303-309.
- Zinov'eva, S.V., Zh.V. Udalova, I.S. Vasil'eva, S.A. Vanyushkin and V.A. Paseshnichenko. 2001.** Role of isoprenoids in plant adaptation to biogenic stress induced by parasitic nematodes. *Applied Biochemistry and Microbiology* 37:456-462.
- Zook, M.N. and J.A. Kuc. 1991.** Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase-activity in elicitor-treated or fungal-infected potato-tuber tissue. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:377-390.

### ACUMULACIÓN DE CAPSIDIOL EN RAÍCES DE CHILE CM-334 INFECTADAS POR *Nacobbus aberrans* Y SU EFECTO EN JUVENILES DEL SEGUNDO ESTADIO

#### RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron comparar la acumulación de la fitoalexina capsidiol en raíces de chile (*Capsicum annuum* L.) CM-334 infectadas y no infectadas con *Nacobbus aberrans*, y determinar el efecto del capsidiol en juveniles del segundo estadio (J<sub>2</sub>) del nematodo en condiciones *in vitro*. El contenido de capsidiol en las raíces de plantas inoculadas con 2000 J<sub>2</sub> y mantenidas en cámaras de crecimiento fue menor que el encontrado en las raíces no inoculadas; tal reducción fue significativa a los 7 (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ) y a los 14 días (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) después de la inoculación con el nematodo. En plantas provenientes de otro experimento realizado en invernadero con suelo naturalmente infestado con *N. aberrans*, también se obtuvo un menor contenido de capsidiol en plantas infectadas por el nematodo en comparación con las no infectadas; las diferencias fueron significativas a los 14 (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ) y a los 21 días (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) posteriores al trasplante en suelo infestado. La exposición de los J<sub>2</sub> de *N. aberrans* al capsidiol, causó la inmovilización de los juveniles, la cual aumentó en la medida en que se incrementó la concentración (desde 0.01 hasta 1.50  $\mu\text{g}$  de capsidiol/mL) y el tiempo de exposición a la fitoalexina. Este efecto en los juveniles se observó desde las 24 h de exposición al compuesto y fue más evidente a las 72 h, tiempo en el que se encontraron diferencias altamente significativas entre todas las concentraciones probadas en comparación con el testigo (Tukey,  $\alpha= 0.0001$ ). Sin embargo, los J<sub>2</sub> recobraron su movilidad cuando el capsidiol fue reemplazado por agua, lo que sugiere que el efecto de la fitoalexina fue sólo nematostático. El hecho de que el capsidiol fue tóxico a *N. aberrans* y de que hubo una reducción en la acumulación de la fitoalexina en las raíces infectadas por el nematodo, sugiere que los mecanismos de defensa del chile CM-334 pueden ser abatidos por el nematodo para favorecer su establecimiento y desarrollo.

## INTRODUCCIÓN

Una de las principales enfermedades que limita la producción de chile (*Capsicum annuum* L.) en México, es la marchitez ocasionada por *Phytophthora capsici* L. y se considera que la mejor estrategia para su manejo es el uso de variedades resistentes. La línea de chile tipo serrano Criollo de Morelos 334 (CM-334) destaca por el alto grado de resistencia mostrado a las cepas más patogénicas de *P. capsici* (Redondo y Rodríguez, 1987; Fernández-Pavía, 1997; Glosier *et al.*, 2008). A pesar de esta resistencia las plantas han mostrado susceptibilidad al oomiceto cuando son previamente inoculadas con el nematodo falso agallador *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). Como ocurre con otros nematodos que inducen en su hospedante la formación de sitios especializados de alimentación, *N. aberrans* provoca modificaciones morfológicas (Manzanilla-López *et al.*, 2002), a nivel celular (Castillo y Marbán-Mendoza, 1984) y molecular (Godinez-Vidal *et al.*, 2009) en las raíces de las plantas hospedantes. La resistencia de CM-334 a *P. capsici* se asocia con la reacción de hipersensibilidad (Fernández-Pavía, 1997; Villar-Luna *et al.*, 2009), y la producción de diferentes metabolitos cuya síntesis se dispara como consecuencia de la interacción con el patógeno (Fernández-Pavía, 1997; Candela *et al.*, 2000; López, 2007; Godinez-Vidal *et al.*, 2008). Uno de los compuestos probablemente asociados con la resistencia de CM-334 al oomiceto es la fitoalexina capsidiol, la cual puede acumularse en concentraciones tóxicas (Candela *et al.*, 2000; Villar-Luna *et al.*, 2009). Con frecuencia en interacciones incompatibles chile-*P. capsici*, la respuesta de hipersensibilidad va acompañada por la acumulación de capsidiol en cantidades cuantificables (Ward, 1976; Egea *et al.*, 1996a). Por ejemplo en los genotipos de chile Wonder, Americano y Smith-5 resistentes a *P. capsici*, el capsidiol se acumuló en las zonas necróticas de los tallos luego de la inoculación con el oomiceto (Egea *et al.*, 1996a).

El capsidiol es la principal fitoalexina sesquiterpénica sintetizada en chile (Kuc y Rush, 1985) y su síntesis y acumulación se dispara como consecuencia de la aplicación o presencia de diversos estimuladores bióticos (Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria, 1996) o abióticos (Back *et al.*, 1998). También, es una de las fitoalexinas más estudiadas con relación al nivel de producción luego del ataque principalmente por oomicetos y hongos fitopatógenos. Sin embargo, a pesar del conocimiento relativamente amplio que se tiene acerca de esta fitoalexina, poco se sabe de la dinámica de su acumulación en raíces infectadas por nematodos agalladores y de su efecto tóxico en estos fitopatógenos. En general, el conocimiento acerca de la acumulación de fitoalexinas en interacciones planta-nematodo es incipiente comparado con el que se tiene para otros

fitopatógenos. De los pocos reportes que existen podemos citar la acumulación de gliceolina en plantas de soya después de la infección por *Meloidogyne incognita* (Kaplan *et al.*, 1980) y *Heterodera glycines* (Huang y Barker, 1991). En el caso de la interacción de *Pinus strobus*-*Bursaphelenchus xylophilus* ocurrió la acumulación de un estilbeno (3-*O*-metildihidropinosilvin estilbenoide) y una flavonona (2*S*-pinocembrina flavonona), ambos con propiedades antimicrobianas (Hanawa *et al.*, 2001).

Respecto a la interacción compatible chile CM-334-*N. aberrans*, aunque se tiene el antecedente de que en presencia del nematodo hubo una menor acumulación de la fitoalexina capsidiol (Godinez-Vidal *et al.*, 2009), se desconoce tanto la relación que existe entre la acumulación del capsidiol y el desarrollo del nematodo en las raíces infectadas, como la toxicidad de la fitoalexina en el nematodo. Por otro lado, se tiene evidencia de que en plantas de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans* se abatieron algunos mecanismos de defensa, como la actividad de las enzimas PAL y peroxidasas, el contenido de fenoles solubles y de capsidiol en comparación con las plantas no inoculadas con el nematodo (Godinez-Vidal *et al.*, 2008; Zavaleta-Mejía *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere que la susceptibilidad del chile CM-334 a *P. capsici* en presencia de *N. aberrans* podría en parte explicarse por la reducción en algunos de sus mecanismos de defensa. Con base en estos antecedentes los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Comparar la acumulación de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas y no infectadas con *N. aberrans* a diferentes tiempos posteriores a la inoculación con el nematodo y 2) determinar el efecto del capsidiol en juveniles del segundo estadio del nematodo en condiciones “*in vitro*”.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Interacción de las plantas de chile con el nematodo.** Se utilizaron plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) CM-334 resistentes a *P. capsici* con seis a ocho hojas verdaderas. En las cámaras de crecimiento se establecieron 80 plantas, 40 fueron inoculadas con 2000 juveniles del segundo estadio (J<sub>2</sub>) de *N. aberrans* y las 40 restantes constituyeron los testigos no inoculados. Los juveniles infectivos J<sub>2</sub> del nematodo, se obtuvieron a partir de masas de huevos extraídas de raíces de jitomate agalladas por el nematodo. Las masas se incubaron a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  en cajas Petri con agua destilada y una vez emergidos los J<sub>2</sub>, se cuantificó el número de juveniles por mL de agua. Se inocularon 2000 J<sub>2</sub> en la base del tallo de cada planta y a los 0, 2, 7, 14 y 21 días después de la

inoculación (ddi), se colectaron las raíces de ocho plantas de cada uno de los tiempos, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

En invernadero se establecieron 74 plantas, 37 fueron transplantadas en suelo naturalmente infestado con el nematodo, y las 37 restantes en suelo esterilizado (plantas testigo). A los 0, 7, 14, 21 y 28 días después del trasplante (ddt), se colectaron las raíces de siete plantas de cada tiempo, se congelaron y almacenaron.

**Extracción, detección y cuantificación de capsidiol.** Se empleó la metodología propuesta por Egea *et al.* (1996b), con algunas modificaciones. Se maceraron 0.5 g de raíces del chile en nitrógeno líquido y se mezclaron con 10 mL de cloroformo-metanol (2:1 v/v). Los extractos obtenidos se filtraron a través de papel Whatman® No.3, se les adicionó una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro, se incubaron a temperatura ambiente por 12 h en oscuridad y posteriormente se evaporaron a sequedad a  $65^{\circ}\text{C}$  en baño María. El residuo se resuspendió en 2 mL de metanol y se cubrió con papel aluminio. El capsidiol se detectó mediante el desarrollo de cromatofolios de sílica gel 60 F<sub>254</sub> de 10 x 10 cm, en ciclohexano:acetato de etilo (1:1 v/v). Los cromatofolios se asperjaron con vainillina-etanol al 10% y ácido sulfúrico-etanol al 10% y se incubaron a  $110^{\circ}\text{C}$  por 5 min, empleando capsidiol (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) como estándar (donado por el MC. Edgar Villar-Luna). La banda correspondiente al capsidiol se raspó de cada cromatofolio, eluyó en 200  $\mu\text{L}$  de metanol e incubó a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche. La fase acuosa se separó centrifugando a 14,000 rpm por 1 min y se cuantificó.

La cuantificación de capsidiol se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), y por espectrofotometría. Para el análisis por HPLC se utilizó un equipo Hewlett Packard Mod. 1100 equipado con detector de Arreglo de Diodos y lámpara de Deuterio (UV)-Wolframio (VIS-IR); se empleó una columna Zorbax XDB-CN 3 x 150 mm con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y con una proporción de 97:3 hexano:isopropanol (v/v) (Moreau *et al.*, 1992). La curva patrón se obtuvo utilizando diferentes concentraciones de capsidiol (5, 10, 15, 20, 40 y 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ). Se analizaron tres muestras de los extractos obtenidos de las raíces de ambos experimentos y de cada una se realizaron tres lecturas de 20  $\mu\text{L}$ . La concentración de capsidiol se calculó mediante el software Agilent ChemStation versión B02.01.

La determinación espectrofotométrica se llevó a cabo empleando dos agentes reveladores, vainillina y metanol. Para la determinación por vainillina, se empleó la metodología propuesta por Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria (1996) con algunas modificaciones. Para tal fin, se tomaron 25  $\mu\text{L}$  de cada muestra y se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de una mezcla de vainillina al 2% y ácido sulfhídrico 1:1 (v/v); posteriormente, se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 30 min para permitir el desarrollo de color, y se cuantificaron a 640 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Para la cuantificación por metanol, primero se realizó un escaneo de 200 a 800 nm UV-Vis utilizando como control al metanol y como referencia el estándar capsidiol y se determinó que la máxima absorbancia del estándar capsidiol, fue a 230 nm. La curva patrón se obtuvo como se indicó con anterioridad. Se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra, se les agregó 1  $\mu\text{L}$  de sulfato cérico amoniacal (2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y se incubaron a temperatura ambiente por 3 min. La cuantificación se realizó a 230 nm en el NanoDrop ND-1000.

**Efecto del capsidiol en  $J_2$  de *N. aberrans*.** Debido al bajo grado de solubilidad que presenta el capsidiol en agua, primero se disolvió 1 mg del compuesto en 300  $\mu\text{L}$  de MeOH y posteriormente se aforó con agua destilada esterilizada a 1 mL, para tener una solución stock 1 mg/mL. Las concentraciones a probar se definieron tomando como base la concentración promedio de capsidiol (1.50  $\mu\text{g/g}$  de raíz), que se obtuvo en raíces de chile CM-334 infectadas con *N. aberrans* en la primera fase del presente estudio. Se establecieron ocho tratamientos con cuatro repeticiones en un diseño completamente al azar. Seis tratamientos correspondieron a diferentes concentraciones de capsidiol (0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, y 1.50  $\mu\text{g}$  de capsidiol/mL) y los dos restantes constituyeron los testigos, un testigo absoluto con agua (TA) y otro con metanol (TM). Este último se estableció con el fin de evaluar el efecto del metanol presente en la solución stock. Para evaluar el efecto del capsidiol en los  $J_2$  de *N. aberrans*, se establecieron cuatro microsiracusas de vidrio conteniendo cada una 100  $J_2$  y la solución correspondiente a cada concentración probada. Se mantuvieron a  $\pm 28^\circ\text{C}$  y a las 24, 48 y 72 h, se cuantificó el número de juveniles inmóviles. Para determinar si los juveniles inactivos recuperaban o no su movilidad, al término de las 72 h de exposición se eliminó con cuidado la solución del tratamiento sustituyéndola por agua destilada esterilizada, y después de transcurridas 24 h se volvió a registrar el número de juveniles inactivos.

Con la finalidad de corroborar que se había logrado la solubilización del capsidiol se realizó la evaluación de su toxicidad sobre *P. capsici*; para ello se prepararon cajas de Petri con medio V8 conteniendo un círculo de papel filtro Whatman® No.3 de aproximadamente 3 cm de diámetro, que fue previamente sumergido en una solución de 500, 1000 y 2000  $\mu\text{g/mL}$ . En esta prueba también se



incluyeron los testigos TA y TM. Para establecer el rango de concentraciones a probar se tomó como referencia lo reportado por Egea *et al.*, (1996a), quienes encontraron que una concentración de 1200 µg de capsidiol en el medio de cultivo tuvo un efecto tóxico sobre *P. capsici*. En cada caja se colocó sobre el papel filtro, un disco de medio V8 de 1 cm de diámetro colonizado por micelio de *P. capsici* (cepa 6143, proporcionada por la Dra. Silvia Fernández Pavía, Catedrática de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). Las cajas se incubaron a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$ , y se midió el crecimiento radial del micelio a las 24, 48 y 72 h de exposición. Con la finalidad de determinar si el efecto del capsidiol era de tipo fungicida o solamente fungistático, después de las 72 h de exposición el micelio se transfirió a medio sin la fitoalexina.

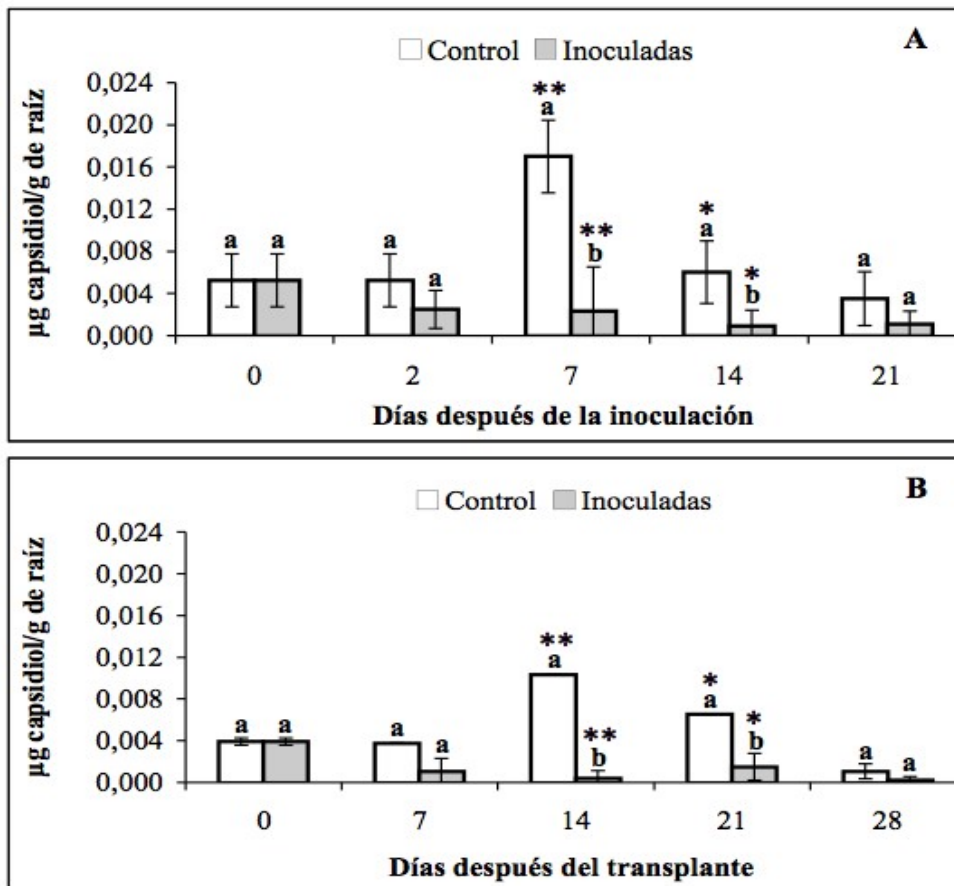
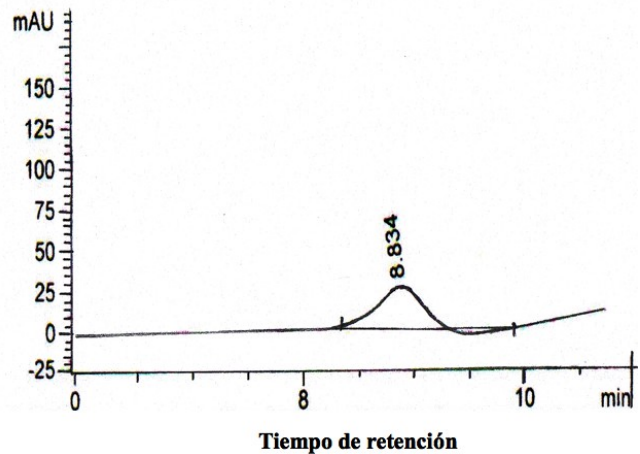
**Análisis estadístico.** Todos los experimentos se establecieron en un diseño completamente al azar. Con los datos obtenidos de cada variable se realizaron los análisis de varianza (ANOVA) correspondientes para detectar diferencias entre tratamientos y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ).

## RESULTADOS

**Detección y contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*.** En los cromatofolios de sílica gel después de la aspersion con vainillina y ácido sulfúrico, se evidenció la presencia de capsidiol al desarrollarse una banda de color azul violáceo con un valor de Rf igual a 0.2 después de incubarla a  $110^{\circ}\text{C}$  por 5 min (Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria, 1996; Egea *et al.*, 1996b). También en los cromatogramas obtenidos por HPLC se detectó un pico único a los 8.93 min (Fig. 1), correspondiente al capsidiol (Moreau *et al.*, 1992).

En los extractos de las raíces de chile CM-334 infectadas con *N. aberrans*, el contenido de capsidiol siempre fue menor en comparación con el de las plantas testigo no infectadas. En el experimento realizado en cámaras de crecimiento, el contenido de la fitoalexina se redujo significativamente en un 86 y 85% a los 7 (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ) y a los 14 días (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ), respectivamente (Fig. 2A); mientras que, en el experimento en invernadero las reducciones fueron de 96 y 77% a los 14 (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ) y a los 21 días (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) después del transplante en suelo infestado con el nematodo, respectivamente (Fig. 2B). La tendencia en los resultados obtenidos en el contenido de capsidiol con los tres métodos utilizados (HPLC, vainillina y metanol), fue similar (Anexo I).

**Fig. 1.** Cromatograma del estándar capsidiol, obtenido con un detector de UV a  $\lambda = 205$  nm. Se detectó un pico único a los 8.93 min.

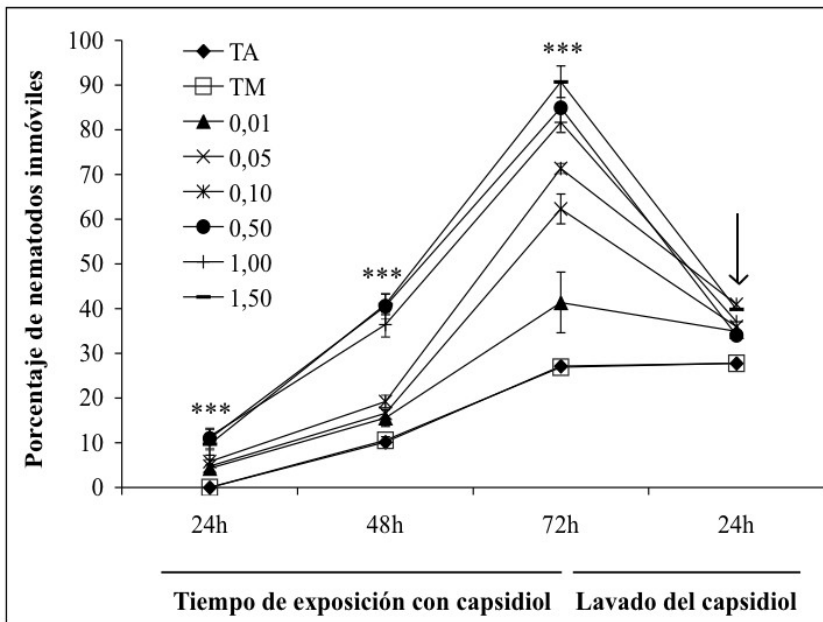
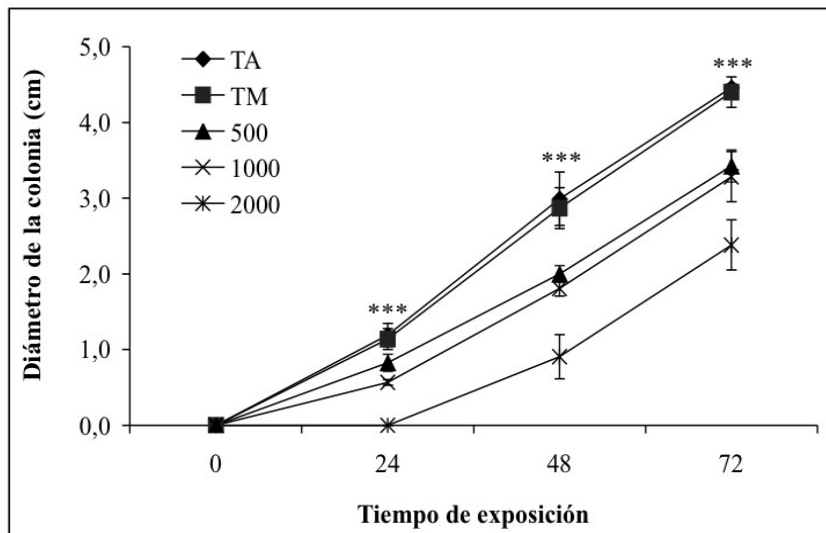


**Fig.2.** Contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas y no infectadas por *N. aberrans* a diferentes tiempos posteriores a la exposición al nematodo. Experimento en cámaras de crecimiento (A) y en invernadero (B). Para cada tiempo, las barras con diferente letra fueron significativamente diferentes  $\alpha = 0.05^*$ ,  $\alpha = 0.01^{**}$  de acuerdo con la prueba de Tukey.

**Efecto del capsidiol sobre *P. capsici* en condiciones *in vitro*.** Con todas las concentraciones probadas se observó una reducción altamente significativa (Tukey,  $\alpha= 0.0001$ ) en el crecimiento micelial del oomiceto desde las 24 h de exposición a la fitoalexina, con respecto a los testigos. Con la concentración mayor de capsidiol la reducción fue de 30 y 53%, a las 48 y 72 h de exposición, respectivamente (Fig. 3). Cuando el micelio se transfirió a medio sin la fitoalexina se reactivó su crecimiento, lo cual indicó que el efecto del capsidiol fue solamente fungistático.

**Efecto del capsidiol en J<sub>2</sub> de *N. aberrans*.** La exposición de los J<sub>2</sub> al capsidiol, afectó su movilidad y el porcentaje de nematodos inmóviles se incrementó a medida que la concentración y el tiempo de exposición a la fitoalexina aumentaron. La inmovilización de los juveniles se observó desde las 24 h de exposición al compuesto; no obstante, el efecto fue más evidente a las 48 y 72 h de exposición. A las 48 h, se encontraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones 0.01, 0.1 y 1.5  $\mu\text{g}$  de capsidiol (Tukey,  $\alpha= 0.0001$ ), y de éstas con respecto a los testigos. A las 72 h, el efecto del capsidiol en los juveniles fue más evidente, encontrándose diferencias altamente significativas entre todas las concentraciones en comparación con los testigos (Tukey,  $\alpha= 0.0001$ ). Los nematodos recobraron su movilidad cuando después de 72 h de exposición al capsidiol, éste se sustituyó por agua destilada (Fig. 4). A las 24 h después de haber retirado el capsidiol, aproximadamente el 87% de los juveniles recobraron su movilidad; esto sugiere, que el efecto del capsidiol fue solo nematostático.

**Fig. 3.** Efecto del capsidiol sobre el crecimiento micelial de *P. capsici* *in vitro*. Para cada tiempo, las diferencias significativas entre las concentraciones probadas y los testigos se indican como  $\alpha=0.0001$ \*\*\* de acuerdo con la prueba de Tukey. (TA), Testigo Absoluto de agua; (TM), Testigo Metanol; (500, 1000 y 2000),  $\mu\text{g}$  de capsidiol/mL.



**Fig. 4.** Porcentaje de  $J_2$  de *N. aberrans* inmovilizados después de su exposición al capsidiol por 12, 24 y 72 h. La flecha indica el porcentaje de nematodos inmovilizados 24 h después de substituir el capsidiol por agua. (\*\*\*) diferencias altamente significativas entre las concentraciones probadas y los testigos ( $\alpha=0.0001$ ), de acuerdo con la prueba de Tukey. (TA), Testigo Absoluto de agua; (TM), Testigo Metanol; (0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, y 1.50),  $\mu\text{g}$  de capsidiol/mL.

capsidiol/mL.

## DISCUSIÓN

En interacciones incompatibles chile-*P. capsici* la fitoalexina capsidiol se acumula en concentraciones tóxicas para el oomiceto (Egea *et al.*, 1996a), tal respuesta fue también confirmada en la interacción chile CM-334-*P. capsici* (Villar-Luna *et al.*, 2009). Aunque en interacciones compatibles también se dispara la acumulación de capsidiol, su síntesis es más lenta y se acumula en menores cantidades (Egea *et al.*, 1996b). Tal es el caso de la interacción compatible CM-334-*N. aberrans*, en donde la acumulación de la fitoalexina siempre fue menor en las plantas infectadas con el nematodo en comparación con las plantas testigo. La reducción en la acumulación del capsidiol en las raíces infectadas por *N. aberrans*, sugiere que el nematodo ha desarrollado estrategias para abatir y sobrepasar las respuestas de defensa de sus plantas hospedantes; tales estrategias pueden consistir en adaptaciones fisiológicas o de comportamiento (Hussey y Glundler, 1998). Los tiempos en que ocurrieron diferencias substanciales entre plantas inoculadas y no inoculadas con respecto al contenido de capsidiol entre ambos experimentos, no fueron los mismos; el diferente comportamiento podría estar relacionado con los tiempos en que ocurre la mayor penetración del nematodo en las raíces. Previamente se observó que cuando plantas CM-334 se inocularon con J<sub>2</sub> el mayor número de nematodos dentro de la raíz se presentó a los 7 días posteriores a la inoculación; mientras que, cuando las plantas fueron expuestas en suelo naturalmente infestado fue hasta los 14 días después del transplante que se registró el mayor número de nematodos dentro de la raíz (Ver pág. 63). En ambos ensayos fue evidente que el contenido de capsidiol en las plantas testigo no inoculadas no se mantuvo a nivel basal, sino que varió en los diferentes tiempos evaluados; de manera similar, Üstün (1995) observó que el contenido de capsidiol en las plantas testigo de diferentes genotipos de chile, incluyendo a CM-334, no se mantuvo constante en los diferentes tiempos que se evaluaron.

Existe evidencia de que *N. aberrans* también podría estar interfiriendo con otras respuestas de defensa en plantas de chile CM-334; por ejemplo, López (2007) reportó que los niveles de fenoles solubles totales y de ácido clorogénico en particular fueron reducidos significativamente en presencia del nematodo. Al respecto, Pegard *et al.* (2005) asociaron la acumulación de ácido clorogénico con la resistencia del chile CM-334 a *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*. Asimismo, recientemente se consignó que la expresión de los genes *Hmg2* y *EAS*, ambos implicados en la síntesis de la fitoalexina capsidiol, fue modificada en las raíces de plantas CM-334 por *N. aberrans* (Godinez-Vidal *et al.*, 2009).

En nuestros ensayos el capsidiol fue tóxico para *P. capsici* confirmando los resultados reportados por Egea *et al.* (1996a). Sin embargo, aún con la concentración mayor probada (2000 µg de capsidiol/mL) solamente observamos un efecto fungistático; mientras que los autores mencionados obtuvieron un efecto fungicida con concentraciones de 1204 µg mL<sup>-1</sup>. Esta aparente discrepancia podría explicarse por las diferencias que existieron entre ambos estudios, respecto al tiempo de exposición del micelio del oomiceto a la fitoalexina; mientras que Egea *et al.* (1996a) lo expusieron por 5 días, antes de transferirlo a medio libre del compuesto, en nuestro caso el tiempo de exposición fue de sólo 3 días. Por otro lado, las cepas de *P. capsici* utilizadas fueron diferentes y no se puede descartar la posibilidad de que entre aislamientos haya variación en su nivel de sensibilidad al efecto tóxico del capsidiol o en su capacidad para detoxificarlo; la cepa 6143 utilizada en el presente estudio, fue seleccionada de entre de 26 aislamientos por Fernández-Pavía (1997) por su alta agresividad y patogenicidad. En relación con lo anterior, se ha reportado que *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* pueden mediante oxidación, convertir al capsidiol en capsenona cuya fungitoxicidad es menor (Ward y Stoessl, 1972; Stoessl *et al.*, 1973). Es interesante resaltar que en contraste con los altos niveles de capsidiol que fueron tóxicos a *P. capsici in vitro*, para *N. aberrans* fueron aproximadamente 1000 veces menores.

Aún cuando el efecto antimicrobiano del capsidiol está ampliamente documentado (Stoessl *et al.*, 1972; Egea *et al.*, 1996a; Egea *et al.*, 1996b; Back *et al.*, 1998; Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008; Villar-Luna *et al.*, 2009); hasta ahora no se contaba con información acerca de su efecto nematológico. Los resultados obtenidos en esta investigación indicaron que la fitoalexina tiene un efecto tóxico sobre los J<sub>2</sub> de *N. aberrans*, siendo de tipo nematostático. Este hallazgo es relevante, pues el abatimiento de la acumulación del capsidiol en las plantas CM-334 infectadas por *N. aberrans*, no solamente resulta ventajoso para el nematodo, sino también podría favorecer el establecimiento de otros patógenos en la raíz del chile. Al respecto, se menciona que plantas CM-334 resistentes a *P. capsici* se comportaron como susceptibles, es decir se rompió su resistencia, cuando el oomiceto se inoculó en plantas infectadas por *N. aberrans* (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). Marley y Hillocks (1994) también encontraron que en genotipos de *Cajanus cajan* resistentes a *Fusarium udum*, hubo decrementos en la acumulación de la fitoalexina cajanol después de que las plantas fueron infectadas por *M. incognita* y *M. javanica*, lo que se asoció con el rompimiento de su resistencia al hongo.

En la presente investigación el contenido de capsidiol en las raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*, fue menor en comparación con las plantas testigo, y este metabolito

afectó negativamente la movilidad de los J<sub>2</sub> del nematodo. El hecho de que el capsidiol tenga un efecto nematostático en condiciones *in vitro* y de que la acumulación de esta fitoalexina en la raíz se reduzca en presencia del nematodo, sugieren que el abatimiento de este mecanismo de defensa en chile CM-334 inducido por *N. aberrans*, puede ser favorable para su establecimiento y desarrollo.

#### LITERATURA CITADA

- Back, K., S. He, K.U. Kim and D.H. Shin. 1998.** Cloning and Bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiology* 39:899-904.
- Candela, M.E., C. Egea, M.D. García-Pérez, J. Costa and M. Candela. 2000.** Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Horticulturae* 522:79-86.
- Castillo, P.G. and N. Marbán-Méndoza. 1984.** Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen 1944 en raíces de *Capsicum annuum* y *C. baccatum*. *Agrociencia* 56:85-93.
- Chávez-Moctezuma, M.P. and E. Lozoya-Gloria. 1996.** Biosynthesis of the sesquiterpenic phytoalexin capsidiol in elicited root cultures of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Reports* 15:360-366.
- Egea, C., M.D. Alcázar and M.E. Candela. 1996a.** Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 98:737-742.
- Egea, C., D. García and M.E. Candela. 1996b.** Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 49:762-764.
- Fernández-Pavía, S. 1997.** Host-Pathogen interactions in the root rot resistant *Phytophthora capsici*/*Capsicum annuum* CM-334 pathosystem. Ph. D. Thesis. New Mexico State University. Las Cruces, New Mexico. 109 p.
- Glosier B.R., E.A. Ogundiwin, G.S. Sidhu, D.R. Sischo and J.P. Prince. 2008.** A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiological races of P. capsici in pepper*. *Euphytica* 162:23-30.
- Godínez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, E.B. Sepúlveda-García, J. Lara-Reyna, R. Rojas-Martínez and E. Zavaleta-Mejía. 2008.** Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology* 120:299-303.
- Godínez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, P. León-Mejía, E. Lozoya-Gloria and E. Zavaleta-Mejía. 2009.** Changes in the mevalonate pathway in chili CM-334 infected by *Nacobbus aberrans*. XII National

- Congress of Biochemistry and Plant Molecular Biology & 6th Symposium México-USA. November 9-13. Guanajuato, México. P\_91.
- Hanawa, F., T. Yamada and T. Nakashima. 2001.** Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytochemistry* 57:223-228.
- Huang, J-S and K.R. Barker. 1991.** Glyceollin I in soybean-Cyst nematode interactions. *Plant Physiology* 96:1302-1307.
- Hussey, R. and F. Grundler. 1998.** Nematode parasitism of plants. Pp. 213-243. *In:* R. Perry and D. Wright ed. *The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes*. CABI Publishing. Oxon, UK.
- Kaplan, D.T., N.T. Keen and I.J. Thomason. 1980.** Association of glyceollin with the incompatible response of soybean roots to *Meloidogyne incognita*. *Physiological Plant Pathology* 16:309-318.
- Kuc, J. and J.S. Rush. 1985.** Phytoalexins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 236:455-572.
- López, M.N. 2007.** Actividad enzimática y fenoles solubles en chile (*Capsicum annuum* L.) 'CM-334' durante la pérdida de resistencia a *Phytophthora capsici* inducida por *Nacobbus aberrans*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 68 p.
- Marley, P.S. and R.J. Hillocks. 1994.** Effect of root-knot nematodes on cajanol accumulation in the vascular tissues of pigeonpea after stem inoculation with *Fusarium udum*. *Plant Pathology* 43:172-176.
- Maldonado-Bonilla, L.D., M. Betancourt-Jiménez and E. Lozoya-Gloria. 2008.** Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *European Journal of Plant Pathology* 121:439-449.
- Manzanilla-López, R.H., M.A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R.N. Inserra, P.S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R.M. Souza and K. Evans. 2002.** The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149-227.
- Moreau, R.A., C.L. Preisig and S.F. Osman. 1992.** A rapid quantitative method for the analysis of sesquiterpene phytoalexins by High Performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis* 3:125-128.
- Pegard, A., G. Brizzard, A. Fazari, O. Soucaze, P. Abad and C. Djian-Caporalino, C. 2005.** Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95:158-165.
- Redondo, E. y R. Rodríguez. 1987.** Mecanismos de infección y patología de las plantas de chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 77:123-137.



- Stoessl, A., C.H. Unwin and E.W.B. Ward. 1972.** Postinfectional inhibitors from plant. I. Capsidiol, an antifungal compound from *Capsicum frutescens*. *Phytopathology* 74:141-152.
- Stoessl, A., C.H. Unwin and E.W.B. Ward. 1973.** Postinfectional fungus inhibitors from plants: fungal oxidation of capsidiol in pepper fruit. *Phytopathology* 63:1225-1231.
- Stoessl, A., J.R. Robinson, G.L. Rock and E.W.B. Ward. 1977.** Metabolism of capsidiol by sweet pepper tissue: some possible implications for phytoalexin studies. *Phytopathology* 67:64-66.
- Trujillo-Viramontes, F., E. Zavaleta-Mejía, R.I. Rojas-Martínez y J. Lara R. 2005.** Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile. *Nematropica* 35:37-44.
- Üstün, A.S. 1995.** Effects of the some elicitors on the capsidiol amount in the leaves of peppers (*Capsicum annuum* L. Having different sensitivities to root rot (*Phytophthora capsici* Leon.). *Journal of Turkish Phytopathology* 24:101-114.
- Vargas, M., E. Zavaleta-Mejía y A.M. Hernández. 1996.** Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en Chile serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26:159-166.
- Villar-Luna, E., B. Reyes-Trejo, R.I. Rojas-Martínez, O. Gómez-Rodríguez, A.M. Hernández-Anguiano y E. Zavaleta-Mejía. 2009.** Respuesta hipersensitiva en el follaje de CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.
- Ward, E.W.B. 1976.** Capsidiol production in pepper leaves in incompatible interactions with fungi. *Phytopathology* 66:175-176.
- Ward, E.W.B. and A. Stoessl. 1972.** Postinfectional inhibitors from plant. III. Detoxification of capsidiol, an antifungal compound from peppers. *Phytopathology* 62:1186-1187.
- Zavaleta-Mejía, E., D. Godínez-Vidal, N. López-Martínez and E. Villar-Luna. 2009.** Changes induced by *Nacobbus aberrans* which could be related to *Phytophthora capsici* breaking of resistance in Chile. II International Congress of Tropical Nematology/XV Annual Meeting. Organization of Nematologists of Tropical America. October 4-8. Maceió Alagoas State, Brazil.

### ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE GENES DE LA RUTA MEVALÓNICA Y ACTIVIDAD DE HMGC<sub>o</sub>A-r Y EAS EN CHILE CM-334 INFECTADO POR *Nacobbus aberrans*

#### RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la acumulación de transcritos de los genes *Hmg* (*Hmg1*, *Hmg2* y *Hmg3*; responsables de la regulación de la biosíntesis de esteroides y fitoalexinas), *FPPS* (farnesil pirofosfato sintasa), *SS* (escualeno sintasa, implicado en la síntesis de esteroides) y *EAS* (5-epiaristológeno sintasa, responsable de la síntesis de fitoalexinas), y la actividad enzimática de 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA-reductasa (HMGC<sub>o</sub>A-r) y EAS en raíces de Chile CM-334 infectadas y no infectadas por *Nacobbus aberrans*. Plantas de CM-334 fueron inoculadas con 2000 J<sub>2</sub> de *N. aberrans* o transplantadas a suelo naturalmente infestado por éste, y se mantuvieron en cámaras de crecimiento e invernadero, respectivamente. A los 0, 2, 7, 14 y 21 días después de la inoculación (ddi) y a los 0, 7, 14, 21 y 28 días después del trasplante (ddt), se analizó por RT-PCR la acumulación de mRNA de los genes mencionados y se determinó la actividad HMGC<sub>o</sub>A-r y EAS. En plantas infectadas por el nematodo, la acumulación de transcritos de *Hmg1* fue menor que *Hmg2* a los 2 ddi; mientras que a los 21 ddi los transcritos de *Hmg1* fueron mayores que *Hmg2* en comparación con las plantas control; la mayor acumulación de *Hmg1* se asoció con un incremento en la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r y la presencia del estadio de hembra inmadura. En raíces infectadas los transcritos de *EAS* se incrementaron a los 7, 14 y 21 ddi, y generalmente se asociaron con un incremento en la actividad de EAS. *Hmg3* y *SS* se acumularon constitutivamente. En presencia del nematodo *FPPS* presentó el mayor incremento a los 21 ddi. Los resultados obtenidos sugieren que *N. aberrans* modifica la expresión de algunos genes de la ruta mevalónica abatiendo la acumulación de capsidiol y propiciando un abastecimiento adecuado de esteroides para proveerse de condiciones favorables para su establecimiento y desarrollo.

## INTRODUCCIÓN

La marchitez de chile (*Capsicum annuum* L.) ocasionada por el oomiceto *Phytophthora capsici* L. es una de las principales enfermedades que limita la producción de esta hortaliza en México, y se considera que la mejor estrategia para su manejo la constituye el uso de materiales resistentes. La línea de chile tipo serrano Criollo de Morelos 334 (CM-334) destaca por el alto grado de resistencia mostrado a las cepas más patogénicas de *P. capsici* (Redondo y Rodríguez, 1987; Fernández-Pavía, 1997; Glosier *et al.*, 2008). Su resistencia a *P. capsici*, se ha asociado con la respuesta hipersensitiva (Fernández-Pavía, 1997; Villar-Luna *et al.*, 2009) y la producción de diferentes metabolitos cuya síntesis se dispara como consecuencia de la interacción con el patógeno (Fernández-Pavía, 1997; Candela *et al.*, 2000; Godinez-Vidal *et al.*, 2008; López-Martínez *et al.*, 2010). La fitoalexina sesquiterpénica capsidiol, uno de los compuestos asociados con la resistencia de CM-334 al oomiceto, se acumula en concentraciones tóxicas en interacciones incompatibles chile-*P. capsici*, mientras que su acumulación en interacciones compatibles es menor (Candela *et al.*, 2000; Villar-Luna *et al.*, 2009). La respuesta de hipersensibilidad invariablemente es acompañada por la acumulación de la fitoalexina (Ward, 1976; Egea *et al.*, 1996); por ejemplo en los genotipos de chile Americano y Smith-5 resistentes a *P. capsici*, el capsidiol se acumuló en las zonas necróticas hipersensitivas de los tallos luego de la inoculación con el oomiceto (Egea *et al.*, 1996).

Se tiene evidencia de que a pesar de la alta resistencia a *P. capsici* mostrada por el material CM-334, las plantas mostraron susceptibilidad al oomiceto cuando fueron previamente infectadas por el nematodo falso agallador *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). Se ha considerado que el rompimiento de resistencia se debe a los cambios metabólicos inducidos por el nematodo en la planta resistente al oomiceto, como incrementos en la cantidad de reguladores de crecimiento, proteínas, ácido aspártico, aminoácidos y ácidos nucleicos, entre otros (Hernández *et al.*, 1992; Williamson y Hussey, 1996; Vargas, 1998). Asimismo, se han observado alteraciones en la actividad de enzimas importantes en diferentes rutas metabólicas como la ruta del ácido shikímico, la de los fenilpropanoides y la mevalónica (Favery *et al.*, 1998, Davis *et al.*, 2000, Godinez-Vidal *et al.*, 2008).

*N. aberrans*, al igual que otros nematodos que inducen en su hospedante la formación de sitios especializados de alimentación, provoca modificaciones morfológicas (Manzanilla-López *et al.*, 2002), celulares (Castillo y Marbán-Méndoza, 1984) y moleculares (Godinez-Vidal *et al.*, 2009) en las raíces de las plantas hospedantes. Estas modificaciones se manifiestan a nivel local y sistémico,

dando lugar a cambios en el patrón de expresión de genes y por tanto en el metabolismo normal de la planta infectada (Oka *et al.*, 1997). La reprogramación de la expresión génica por nematodos fitopatógenos es un área poco estudiada; no obstante, se sabe que en la interacción de *Arabidopsis thaliana*-*H. schachtii* se modifica la expresión de 24 genes en las células destinadas a la formación de la estructura de alimentación (Hermsmeier *et al.*, 2000). De igual manera en la interacción *A. thaliana*-*M. incognita*, 3373 genes muestran una expresión diferencial durante el desarrollo del sitio de alimentación (Jammes *et al.*, 2005). En las interacciones compatibles *A. thaliana*-*M. incognita* y *A. thaliana*-*H. schachtii*, Goddijn *et al.* (1993) observó que la infección por el nematodo resultó en una represión de los genes *PAL* que codifican para la síntesis de PAL (fenilalanina amonio-liasa), enzima importante en la ruta de los fenilpropanoides y a través de la cual se sintetizan distintos metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos y las fitoalexinas, importantes en los mecanismos de defensa de las plantas (Salisbury y Ross, 1996). En contraste, Cramer *et al.* (1993) reportaron que *M. incognita* estimuló la expresión de los genes *Hmg* en *A. thaliana*. Los genes *Hmg*, pertenecientes a una familia multigénica, codifican para la síntesis de HMGC<sub>o</sub>A-r (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa) la cual es el punto de regulación de la biosíntesis de esteroides y fitoalexinas de la ruta mevalónica (MEV) en plantas, y se expresa diferencialmente después del ataque por patógenos (Sun-Hwa *et al.*, 2003). A través de la ruta mevalónica se sintetizan fitoalexinas sesquiterpénicas como el capsidiol, el cual tiene un efecto tóxico sobre juveniles del segundo estadio (J<sub>2</sub>) de *N. aberrans* (Godinez-Vidal *et al.*, 2010; Ver pág. 44). También, por esta ruta se sintetizan los esteroides, metabolitos esenciales para la fisiología y mantenimiento celular y por tanto necesarios para el crecimiento y desarrollo del nematodo (Chitwood y Lusby, 1991; Jain *et al.*, 2000) en virtud de que ellos son incapaces de sintetizarlos. Esto sugiere que la regulación de la ruta MEV por el nematodo, podría ser un prerrequisito para su establecimiento en el hospedante, por un lado reprimiendo la síntesis de capsidiol y por otro favoreciendo la síntesis de esteroides.

Las isoformas de HMGC<sub>o</sub>A-r codificadas por una familia multigénica se han asociado con la síntesis de ciertos metabolitos. Así por ejemplo, *Hmg1* ha sido asociada con la síntesis de esteroides (Ohyama *et al.*, 2007), *Hmg2* con la síntesis de fitoalexinas (Choi *et al.*, 1992) y *Hmg3* con el crecimiento y desarrollo de frutos de chile (Sun-Hwa *et al.*, 2003). Asimismo, aunque el primer punto de la regulación de la ruta MEV es asociado con la HMGC<sub>o</sub>A-r, se considera que FPPS (farnesil difosfato sintasa; Masferrer *et al.*, 2002), SS (escualeno sintasa) y EAS (5-epi-aristolóqueno sintasa), también desempeñan un papel importante en la regulación de las ramificaciones de la ruta; además de generar los precursores para la síntesis de esteroides (Jarsfater *et al.*, 2002) y fitoalexinas

sesquiterpénicas (Takahashi *et al.*, 2005). El FPP (farnesil difosfato) es sustrato de la enzima SS y también de EAS, por lo que se ha sugerido que la regulación coordinada entre SS y EAS permite canalizar el metabolismo de acuerdo con los requerimientos de la planta (Devarenne *et al.*, 1998); esto es, que el FPP se canalice hacia la producción de esteroides o de fitoalexinas. Al respecto, se ha reportado que en respuesta a un patógeno la actividad de SS se suprime, aumentando así la disponibilidad de FPP para la actividad de EAS y por ende ocurra la síntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas (Zook y Kuc, 1991).

Por lo anterior y dado que existe un total desconocimiento de la influencia de *N. aberrans* en la expresión de genes que son clave en la ruta de síntesis de los isoprenoides en sus hospedantes, el objetivo del presente trabajo fue determinar la acumulación de transcritos de los genes *Hmg* (*Hmg1*, *Hmg2* y *Hmg3*), *FPPS*, *SS* y *EAS*, y la actividad enzimática de HMGCoA-r y EAS en raíces de chile CM-334 infectadas y no infectadas por *N. aberrans*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Establecimiento de experimentos.** Se realizaron tres experimentos en cámaras de crecimiento y uno bajo condiciones de invernadero. Se utilizaron plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) CM-334 resistentes a *P. capsici* con seis a ocho hojas verdaderas. En cámaras de crecimiento se establecieron 80 plantas, 40 fueron inoculadas con 2000 juveniles del segundo estadio (J<sub>2</sub>) de *N. aberrans* y las 40 restantes constituyeron los testigos no inoculados. Los juveniles infectivos J<sub>2</sub> del nematodo, se obtuvieron a partir de masas de huevos extraídas de raíces de jitomate agalladas por el nematodo. Las masas se incubaron a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  en cajas Petri con agua destilada y una vez emergidos los J<sub>2</sub>, se cuantificó el número de juveniles por mL de agua. Se inocularon 2000 J<sub>2</sub> en la base del tallo de cada planta y a los 0, 2, 7, 14 y 21 días después de la inoculación (ddi), se colectaron las raíces de ocho plantas para cada tiempo, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

En invernadero se establecieron 74 plantas, 37 fueron transplantadas en suelo naturalmente infestado con el nematodo, y las otras 37 en suelo esterilizado (plantas testigo). A los 0, 7, 14, 21 y 28 días después del transplante (ddt), se colectaron las raíces de siete plantas para cada tiempo, se congelaron y almacenaron.

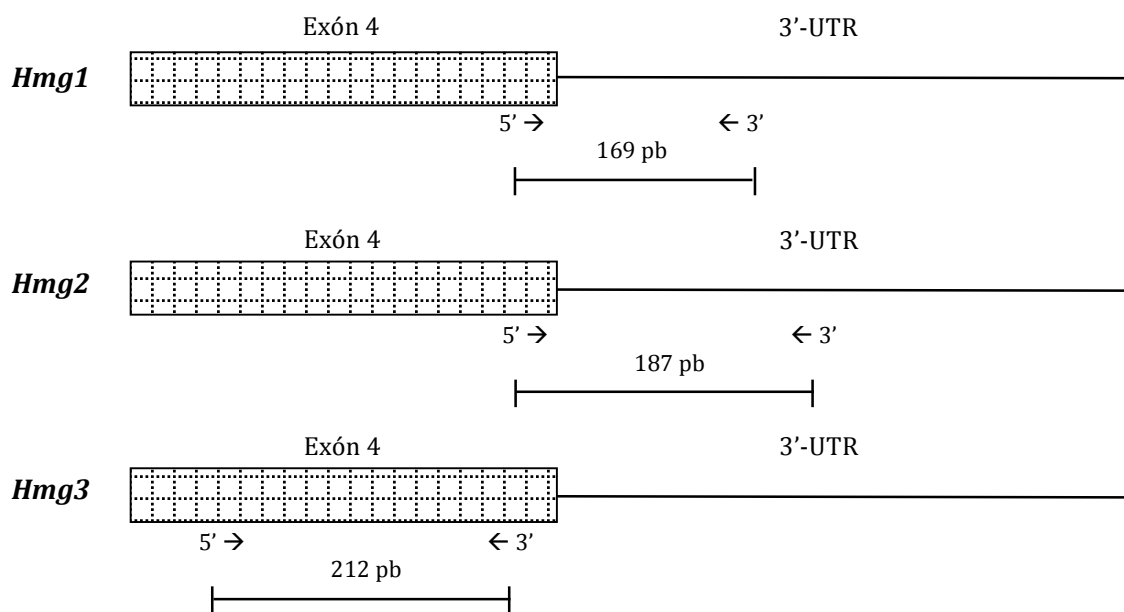
**Infección por *Nacobbus aberrans*.** De cada experimento se tomó una planta por cada tiempo evaluado y las raíces fueron teñidas con fucsina ácida (Hussey, 1987), para identificar los estadios de desarrollo de *N. aberrans* y cuantificar el número de nematodos por gramo de raíz.

**Diseño y validación de oligonucleótidos. Genes *Hmg*.** Se diseñaron tres pares de oligonucleótidos a partir de secuencias parciales de las isoformas 1, 2 y 3 de *C. annuum* L. cv. NockKwang, amablemente facilitadas por la Dra. Ha Sun-Hwa, del Instituto Nacional de Biotecnología Agrícola de Corea del Sur (Anexo II). La identidad de cada una de las isoformas se determinó a partir de su alineamiento con la secuencia de *Hmg* reportada para *C. annuum* (mRNA linear de 2402 pb, No. acceso AF110383). Para *Hmg1*, se encontró identidad del 85% en una región de 51 nucleótidos de un total de 60. Para *Hmg2* se encontraron dos regiones de homología, una de 322 y otra de 129 nucleótidos, ambas con el 100% de identidad. Para *Hmg3*, se encontró identidad del 86% en una región de 296 nucleótidos de un total de 341. Considerando la correspondencia de las tres isoformas de los genes *Hmg* con la secuencia de *Hmg* de Chile, se seleccionaron las secuencias como posibles oligonucleótidos para cada isoforma (Cuadro 1 y 2) (Anexo II). Para *Hmg1* se seleccionó un oligonucleótido de 26 pb para la región 5' (*Hmg1-5*) y otro de 28 pb para la región 3' (*Hmg1-3*) correspondientes al extremo 3'-UTR, con una temperatura óptima de alineamiento ( $T_m$ ) de 63°C. Los oligonucleótidos de *Hmg2* y *Hmg3* tuvieron una longitud de 20 y 21 pb, y una  $T_m$  de 55 y 59°C, respectivamente. La región tomada para el diseño de oligonucleótidos de *Hmg2* correspondió al extremo 3'-UTR, y la región correspondiente al exón 4, zona interna del gen, para *Hmg3* (Fig. 1).

**Cuadro 1.** Características de los oligonucleótidos para *Hmg1*, *Hmg2* y *Hmg3*.

Oligo	Secuencia	Pb	GC%	Harp Δ	Hom Δ	Hete Δ	Tm**	Tm***
<i>Hmg1-5</i>	TA CAA TAG ATC AAG CAA AGA TGT TAC	26	30.8	1.0	-4.62	-5.0	68	63
<i>Hmg1-3</i>	TTT CCA AGA AGT GAT ATC ATA TAA TAA A	28	21.4	0.75	-10.97	-5.0	68	63
<i>Hmg2-5</i>	AA GAT GTC ACC AAG GCA TCC	20	50	-0.69	-5.0	-5.5	60	55
<i>Hmg2-3</i>	CTT GTC TCT ACC CTC TTC TC	20	50	1.52	-1.34	-5.5	60	55
<i>Hmg3-5</i>	GAG GAG GTG GTG AAG AAA GTG	21	52.4	3.69	--	-6.24	64	59
<i>Hmg3-3</i>	ACA GTC TCC ATC ATA GTG ATG CA	21	43.5	-0.1	-7.05	-6.24	64	59

GC%= % de Guanina-Citocina, Δ= Delta G para la formación de harpings (Harp.), homodímeros (Hom.) y heterodímeros (Hete.). Condiciones calculadas para: oligo [0.25 μM], Na+ [50 mM] y DNA [0.5μM]. Tm\*= Temperatura de alineamiento (Tm) dada por el programa Oligo Analyzer. (condiciones calculadas para: oligo [0.25 μM], Na+ [50 mM] y DNA [0.5μM].). Tm\*\*= Tm obtenida mediante la fórmula  $2(A+T) + 4(G+C)$ .



**Fig. 1.** Representación esquemática de la localización de los oligonucleótidos *Hmg1*, *Hmg2* y *Hmg3*.

**Genes farnesilpirofosfato sintasa (FFPS).** Los oligonucleótidos para estos genes se diseñaron con base en la secuencia de *C. annuum* (No. acceso X84695). Se realizó un alineamiento en ClustalW a partir de las secuencias de aminoácidos correspondientes al mRNA de *C. annuum*, *Lycopersicon esculentum* (AF048747), *Nicotiana tabacum* (U97330) y *A. thaliana* (AT5G47770.1). Se identificaron las secuencias codificantes en *C. annuum* tomando como referencia su posición en *A. thaliana*. Se seleccionó el oligonucleótido 5' en el exón 1 y el 3' en el exón 6 (Fig. 2). Ambos oligonucleótidos constaron de 25 pb y de una Tm de aproximadamente 65°C (Cuadro 2). Asimismo, se realizó un alineamiento en Blast con cada uno de los oligonucleótidos, obteniéndose una identidad del 100% con la farnesilpirofosfato sintasa de Chile y un valor de 7e-10 para ambos oligonucleótidos. El tamaño del fragmento de PCR se determinó mediante el programa iPCR<sup>1</sup> obteniéndose un producto de 499 pb.

**Genes escualeno sintasa (SS).** Se diseñó un par de oligonucleótidos a partir del cDNA de CASS (*C. annuum*, No. acceso F124842) con un marco de lectura de 1,233 pb (411 aa). El oligo 5' con 24 pb tuvo un 46% de G-C y el oligo 3' con 25 pb un 52%; ambos con una Tm de 60°C. Las secuencias seleccionadas como posibles oligonucleótidos se denominaron como SS1-5 y SS1-3 y abarcaron el codón de inicio de la traducción (ATG) y una región conservada en Solanáceas, respectivamente; asimismo, poseen un alto por ciento de identidad con los genes SS de *N. tabacum* (91%), *N. bentamiana* (87%) y *A. thaliana* (74%) (Fig. 3).

**Cuadro 2.** Características de los oligonucleótidos para *FFPS*.

Oligo	Secuencia	Pb	GC%	$\Delta$ Harp	$\Delta$ Hom	$\Delta$ Hete	A+T	G+C	Tm*	Tm**
<i>FFP5</i>	5' AATGGGTCGATAAGATGTTGGAGTA 3'	25	40	0.00	-6.76	-1.95	15	10	67	70
<i>FFP3</i>	5' GGGAGGTAAAATGAATAATAAGCAG 3'	25	36	-7.6	-3.14	-3.14	16	9	62	68

GC%= % de Guanina-Citocina,  $\Delta$ = Delta G para la formación de harpings (Harp.), homodímeros (Hom.) y heterodímeros (Hete.). Tm\*= Temperatura de alineamiento (Tm) dada por el programa Oligo Analyzer. (condiciones calculadas para: oligo [0.25  $\mu$ M], Na+ [50 mM] y DNA [0.5 $\mu$ M].). Tm\*\*= Tm obtenida mediante la fórmula  $2(A+T) + 4(G+C)$ .

<sup>1</sup> [http://www.ch.embnet.org/software/iPCR\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/iPCR_form.html)





SS1-5

<i>C. annuum</i>	<b>M</b> GTLRAILK	PDDLYPLIKL	KLAARHA---	--EKQIPPEP	HWGFCYLMLQ	KVSRSFALVI	55
<i>N. tabacum</i>	MGTLRAILK	PDDLYPLIKL	KLAARHA---	--EKQIPPEP	HWGFCYLMLQ	KVSRSFALVI	55
<i>N. benthamiana</i>	MGSLRAILK	PDDLYPLVKL	KLAARHA---	--EKQIPPEP	NWGFCYSMLH	KVSRSFALVI	55
<i>A. thaliana</i>	MGSLGTMRLY	PDDIYPLKLM	KRAIEKA---	--EKQIPPEP	HWGFCYSMLH	KVSRSFALVI	55
Rat	MRFFVK-LGH	PRFFYNLLRF	RMGGRRNFIP	KMDRNSLSNS	LKT-CYKYLD	QTSRSFAAIV	58
Consensus	MG.L...L..	P...Y.L...	K.....	-----	....CY..L.	..SRSEFA.VI	60
<i>C. annuum</i>	QQLPVELRDA	VCIFYLVLRA	LDTVEDDTSI	PTDVKVPILI	SFHQHIYDRE	WHF--SCGTK	113
<i>N. tabacum</i>	QQLPVELRDA	VCIFYLVLRA	LDTVEDDTSI	PTDVKVPILI	SFHQHIYDRE	WHF--SCGTK	113
<i>N. benthamiana</i>	QQLPVELRDA	VCIFYLVLRA	LDTVEDDTSI	PTDVKVPILI	SFHQHIYDRE	WHF--SCGTK	113
<i>A. thaliana</i>	QQLNTELRNA	VCFYLVLRA	LDTVEDDTSI	PTDEKVPILI	AFERHIYDRE	WHY--SCGTK	113
Rat	QALDGDIRHA	VCFYLVLRA	MDTVEDDMAI	SVEKKIPLLR	NFHTFLYEPE	WRP--TESKE	116
Consensus	Q.L..ELR.A	VC.FSLVLR	LDTVEDD.SI	...K.P.L.	.PH...Y...W.F	-----	120
		I	II				
<i>C. annuum</i>	EYKVLMDQPH	HVSTAPLELG	KNYQQAIEDI	TMRMGAGMAK	FI-----CK	EVETDDDYDE	167
<i>N. tabacum</i>	EYKVLMDQPH	HVSTAPLELG	KNYQQAIEDI	TMRMGAGMAK	FI-----CK	EVETDDDYDE	167
<i>N. benthamiana</i>	EYKVLMDQPH	HVSTAPLELR	KNYQQAIEDI	TMRMGAGMAK	FI-----CK	EVETDDDYDE	167
<i>A. thaliana</i>	EYKILMDQPH	HVSAAPLELE	KGYQAIIEI	TRRMGAGMAK	FI-----CQ	EVETDDDYDE	167
Rat	KHRVLEDFP	TISLEFRMLA	EKYQTVIADI	CHRMGCCMAE	FL-----NK	DVTSKQDWDK	170
Consensus	.....F.	..S..F.EL.	..YQ...I..I	T..MG.GMA.	FI-----	.V.T..D.VD.	180
<i>C. annuum</i>	YCHYVAGLVG	LGLSKLPHAS	GKED-LASD-	-SLNSMGLF	LQKTNIIRDY	LEDINEVPKC	224
<i>N. tabacum</i>	YCHYVAGLVG	LGLSKLPHAS	GKED-LASD-	-SLNSMGLF	LQKTNIIRDY	LEDINEVPKC	224
<i>N. benthamiana</i>	YCHYVAGLVG	LGLSKLPHAS	EKED-LASD-	-SLNSMGLF	LQKTNIIRDY	LEDINEVPKC	224
<i>A. thaliana</i>	YCHYVAGLVG	LGLSKLPLAA	GSEV-LTPDW	EASNSMGLF	LQKTNIIRDY	LEDINEVPKC	226
Rat	YCHYVAGLVG	IGLSRLEPAS	EPFEDPIVGD	TECANSMGLF	LQKTNIIRDY	LEDQOEG---	227
Consensus	YCHYVAGLVG	.GLS.LF.A.	..E.....	...NSMGLF	LQKTNIIRDY	LED.....	240
		III	IV				
<i>C. annuum</i>	RMFWPREIWS	KYVNKLELEK	YEENSVKAVQ	CLNDMVTNAL	SHVEDCLIYM	SNLRDPAIFR	284
<i>N. tabacum</i>	RMFWPREIWS	KYVNKLELEK	YEENSVKAVQ	CLNDMVTNAL	SHVEDCLIYM	SNLRDPAIFR	284
<i>N. benthamiana</i>	RMFWPREIWS	KYVNKLELEK	YEDNSAKAVQ	CLNDMVTNAL	PHVEDCLTYM	SALRDPISIFR	284
<i>A. thaliana</i>	RMFWPREIWS	KYADKLEDLK	YEENSVKAVQ	CLNEMVTNAL	MHIEDCLKYM	VSLRDPISIFR	286
Rat	RQFWPQEVWG	KYVKKLEDFV	KPENVDVAVK	CLNELITNAL	QHIDPDIYTL	SRLRNQSVFN	287
Consensus	R-FWP-EIWS	KY--KLE---	--EN---V-	CLN--VTNAL	-H--D-L-Y-	--LR----F-	300
<i>C. annuum</i>	FCAIPQVMAI	GTLAMCYDNI	EVFRGVVVKMR	RGLTAKAIDR	TRTMADVYGA	FFDFSCMLKS	344
<i>N. tabacum</i>	FCAIPQVMAI	GTLAMCYDNI	EVFRGVVVKMR	RGLTAKAIDR	TRTMADVYGA	FFDFSCMLKS	344
<i>N. benthamiana</i>	FCAIPQVMAI	GTLAMCYDNI	EVFRGVVVKMR	RGLTAKVIDR	TRTIADVYGA	FFDFSCMLKS	344
<i>A. thaliana</i>	FCAIPQVMAI	GTLALCYNNE	QVFRGVVVKLR	RGLTAKVIDR	TRTMADVYGA	FFDFSCMLKT	346
Rat	FCAIPQVMAI	ATLAACYNNH	QVFRGVVVKIR	KGQAVTLMMD	ATNMPAVKAI	IYQYIEEYH	347
Consensus	FCAIPQVMAI	.TLA.CY.N.	.VF.GVVVK.	RG.....	T.....V...	F.....	360
		V					
<i>C. annuum</i>	<b>E</b> PTYSPVLIF	VI-----FI	ILAIILAHLS	GNRS			411
<i>N. tabacum</i>	EPTYSPVLIF	VI-----FI	ILAIILAHLS	GNRS			411
<i>N. benthamiana</i>	EPNYSPVLIV	VI-----FI	ILAIILAQLS	GNRS			411
<i>A. thaliana</i>	QPN--SVFII	MV-----VI	LLAIVFAYLR	AN--			410
Rat	SPIYLSFIML	LAALSWQYLS	TLAQVTEYV	QREH			416
Consensus	.P.....	.....	.L.....	.....			454
		VI					

SS1-3

Fig. 3. Comparación de la secuencia de aminoácidos de CASS con los genes SS de *N. tabacum* (U59683), *N. benthamiana* (U46000), *A. thaliana* (U79159) y rata (M95591). Los números romanos indican las regiones conservadas de acuerdo con Robinson *et al.* (1993). La caja morada corresponde al oligo 3' de los oligos SS.

**Extracción de RNA y PCR.** La extracción de RNA total de raíz para cada experimento y tiempo establecido, se realizó de acuerdo con Longeman *et al.* (1987). Cuatro µg de RNA fueron digeridos con DNAsa (Invitrogene®) para eliminar el DNA genómico; la reacción se incubó por 15 min a temperatura ambiente y se detuvo con 4 µL de EDTA 25 mM. La síntesis del cDNA para los genes *Hmg*, se realizó empleando 2 pmoles del oligonucleótido 3' de *Hmg1*, *Hmg2* y *Hmg3* y 2 µg de RNA total. Las condiciones de PCR fueron 30 ciclos a 94°C por 15 seg, 60°C por 15 seg y 72°C por 30 seg. Como gen constitutivo se utilizó actina. La integridad y concentración de los productos de PCR, se determinó en geles de agarosa al 1%, empleando como marcador de peso molecular a λPstI.

La síntesis del cDNA para *FPPS*, *SS* y *EAS* se realizó empleando oligo dt y 2 µg de RNA total; las condiciones de PCR fueron 35 ciclos a 94°C por 15 seg, 60°C por 15 seg y 72°C por 1 min. Para *SS*, se realizó otro PCR bajo las mismas condiciones empleando los oligonucleótidos SSE diseñados por la Dra. Ma. Esther Rivas, los cuales generan un fragmento de 200 pb a partir de cDNA. Para determinar el número de fragmentos obtenidos utilizando los oligonucleótidos SS1 y los SSE, se empleó como templados DNA genómico y cDNA. La extracción de DNA genómico se realizó por el método de CTAB de acuerdo con Ahrens y Seemüller (1992). La integridad y concentración de los productos de PCR, se visualizó y determinó en geles de agarosa al 1%, empleando como marcador de peso molecular a λPstI. Los fragmentos de PCR obtenidos se purificaron del gel mediante la técnica propuesta por Glenn y Glenn (1994).

A partir de cDNA se obtuvo un fragmento de 991 pb con los oligos SS1-SS3 (Anexo II), y de 200 pb con los oligos SSE. La combinación del oligo 5' de SS1 y el oligo 3' de SS generó un fragmento de 1167 pb, mismo que abarcó casi el 100% de la región codificante de los genes *SS* en Chile. Para corroborar la localización de los oligos *SS* se amplificó un fragmento de 800 pb, a partir de DNA genómico de *A. thaliana*, el cual abarcó los exones 10, 12 y 13 de acuerdo con su ortólogo (No. acceso NM119630) (Fig. 4). Para los genes 5-epiaristolóqueno sintasa (*EAS*), se realizó un PCR bajo las condiciones descritas anteriormente utilizando los oligonucleótidos *EAS* diseñados por la Dra. Ma. Esther Rivas, los cuales también generan un fragmento de 200 pb a partir de cDNA.



hibridó. Las membranas se expusieron a películas X OMAT (Kodak-sensibility maximum) a -70°C, el tiempo necesario para detectar la señal.

**Actividad enzimática de HMGCoA-r y EAS.** Para HMGCoA-r se realizó la extracción de proteínas a partir de raíces de chile CM-334 de los experimentos en cámaras de crecimiento e invernadero, y de tubérculo de papa como control positivo. La albúmina de bovino fracción V (BSA) constituyó el control negativo. La extracción se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Stermer y Bostock (1987), con algunas modificaciones. A 0.3 g de tejido se le agregaron 0.5 mL de amortiguador de extracción frío (amortiguador de fosfatos de potasio pH 7.2 [0.2 M], sorbitol [0.35 M], MgCl<sub>2</sub> [5 mM], Na<sub>2</sub>EDTA [10 mM], 2-β-mercaptoetanol [20 mM] y PVP 5%), y 5 µg/mL de inhibidores de proteasas (SIGMA) (Bianchini *et al.*, 1996). La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando BSA como estándar. La cuantificación de la actividad enzimática se determinó siguiendo la técnica de Brooker y Russell (1975), con algunas modificaciones. Se utilizó una solución amortiguadora de fosfatos de potasio pH 7.2 [90 µM]; DTT [10 µmol]; D-HMGCoA [0.15 µmol] y NADPH [0.3 µmol]; la reacción inició cuando se agregó 1 µg de proteína total a 30°C. La velocidad de oxidación del NADPH se estimó 20 minutos después de iniciada la reacción, a partir del cambio de absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-600) (Takahashi *et al.*, 1999).

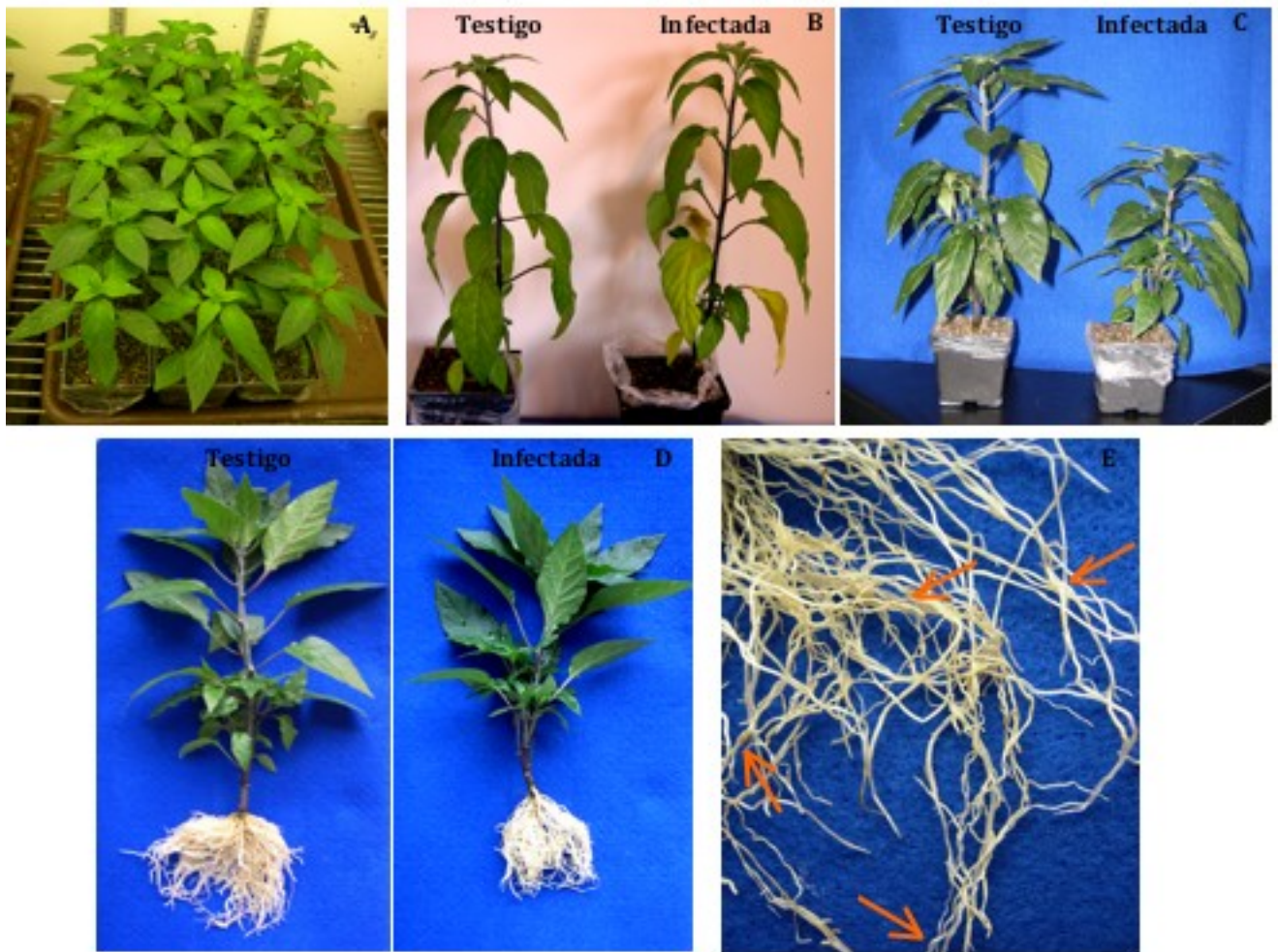
Para la extracción de proteínas y la cuantificación de la actividad enzimática de EAS, se empleó la metodología propuesta por Vögeli *et al.* (1990) modificada por Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria (1996).

**Análisis estadístico.** Todos los experimentos se establecieron en un diseño completamente al azar. Para la acumulación de transcritos la comparación entre tratamientos se realizó con base en la acumulación obtenida para cada uno de los genes analizados, se determinó la relación gen de interés/gen constitutivo, mediante el software ImagenJ 1.43e. Se estimó el área de banda para cada gen y los valores se normalizaron determinando el cociente del valor del área de banda y el valor de banda del marcador de peso molecular más cercana al fragmento amplificado. Para la acumulación de transcritos y la actividad enzimática de HMGCoA-r y EAS, se realizaron los análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de tratamientos entre las raíces testigo de CM-334 y las raíces infectadas por *N. aberrans* para cada uno de los tiempos evaluados, empleando la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.01$ ).

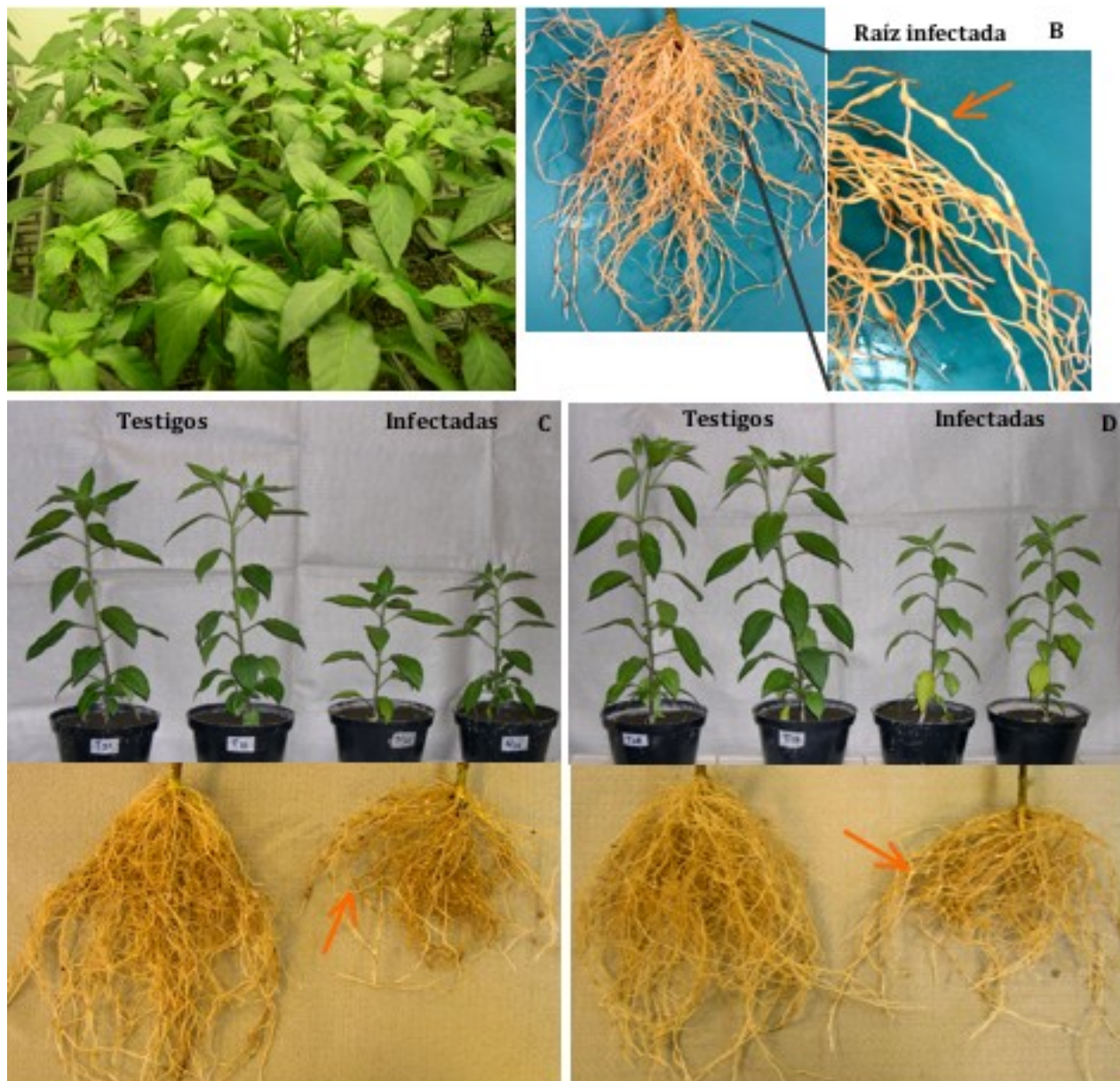
## RESULTADOS

**Interacción de las plantas de chile CM-334 con *N. aberrans*.** En las raíces de plantas infectadas por el nematodo se observaron síntomas de amarillamiento, achaparramiento, reducción del sistema radical y agallas incipientes a los 21 días posteriores de la inoculación con *N. aberrans* (Fig. 5). El mayor número de nematodos dentro de las raíces fue de 253 y 273 a los 7 y 14 ddi, respectivamente. A los 2 y 7 ddi, se encontró el mayor número de juveniles J<sub>2</sub> (138 y 246, respectivamente). A los 14 y 21 ddi el número de J<sub>2</sub> disminuyó (110 y 9, respectivamente), mientras que el número de nematodos del tercer (J<sub>3</sub>) y cuarto estadios (J<sub>4</sub>), se incremento a 156 y 98, respectivamente. A los 21 ddi también se observó la presencia de hembras jóvenes (Fig. 7A).

En las plantas que se transplantaron en suelo naturalmente infestado con *N. aberrans* se observó la presencia de agallas a los 14 ddt, y a los 21 y 28 días las plantas infectadas presentaron síntomas de amarillamiento, achaparramiento y reducción del sistema radical (Fig. 6). A los 7 y 21 ddt se encontró el mayor número de nematodos en la raíz (291 y 287, respectivamente). A los 7 ddt se encontró el mayor número de J<sub>3</sub>-J<sub>4</sub> (83) y de hembras jóvenes (208). A los 14, 21 y 28 ddt, predominó el estadio de hembras adultas, seguido de hembras jóvenes, J<sub>3</sub>-J<sub>4</sub>, masas de huevos y J<sub>2</sub> de la siguiente generación (Fig. 7B).

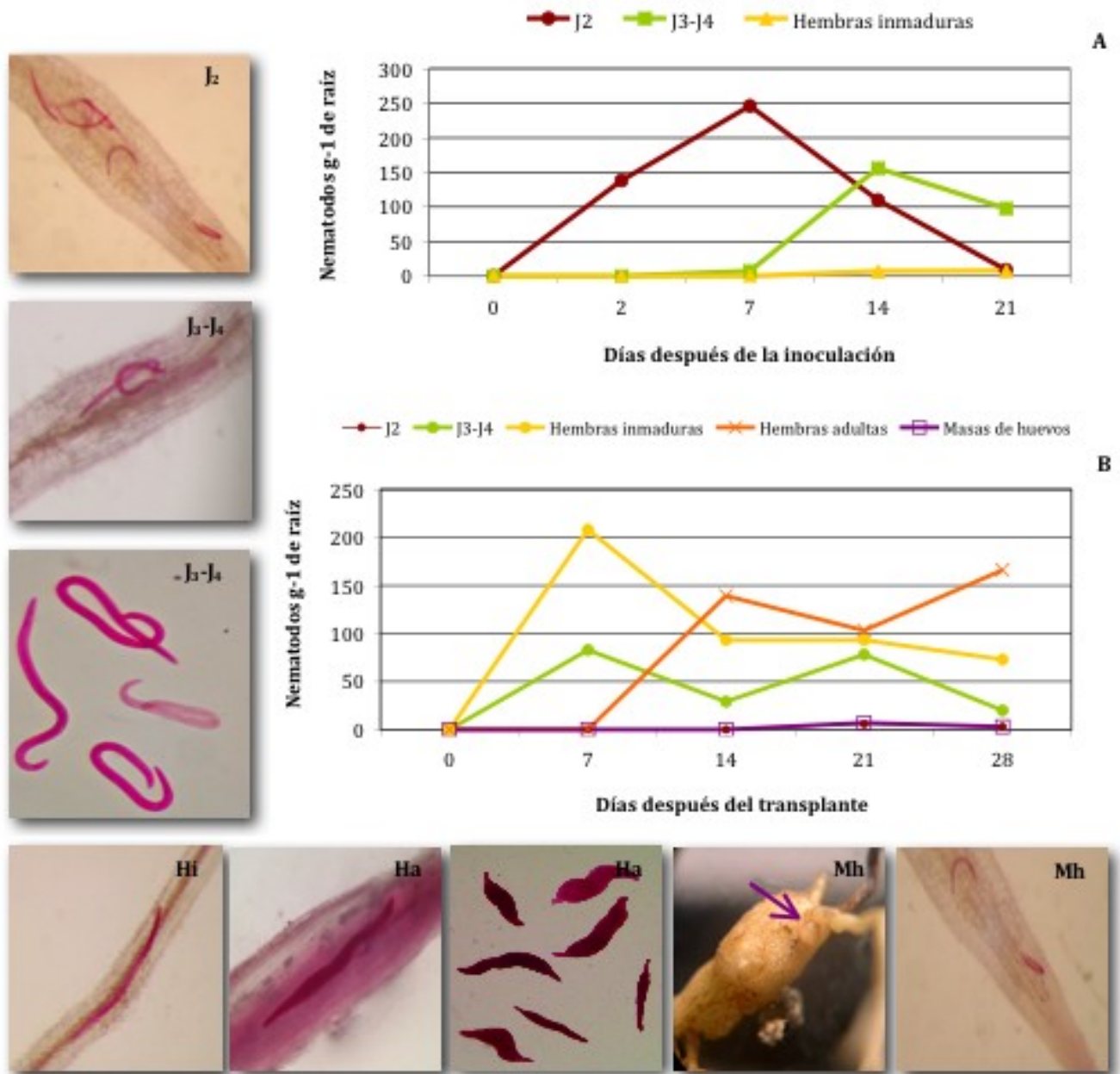


**Fig. 5.** Plantas de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*. Plantas con 6 a 8 hojas verdaderas inoculadas con 2000 J<sub>2</sub> del nematodo, establecidas en cámaras de crecimiento (A). Plantas infectadas a los 21 ddi presentando síntomas de amarillamiento (B) y achaparramiento (C), reducción de la masa radical (D) y ligeros hinchamientos en las raíces (E).



**Fig. 6.** Plantas de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*. Plantas con 6 a 8 hojas verdaderas que fueron transplantadas a suelo naturalmente infestado con el nematodo (A). Raíces de plantas infectadas, 14 días después del transplante (ddt) a suelo infestado con *N. aberrans* (B). Plantas infectadas a los 21 ddt presentando síntomas de achaparramiento y reducción de la masa radical (C). Plantas infectadas a los 28 ddt con síntomas de amarillamiento, achaparramiento y reducción de la masa radical (D).



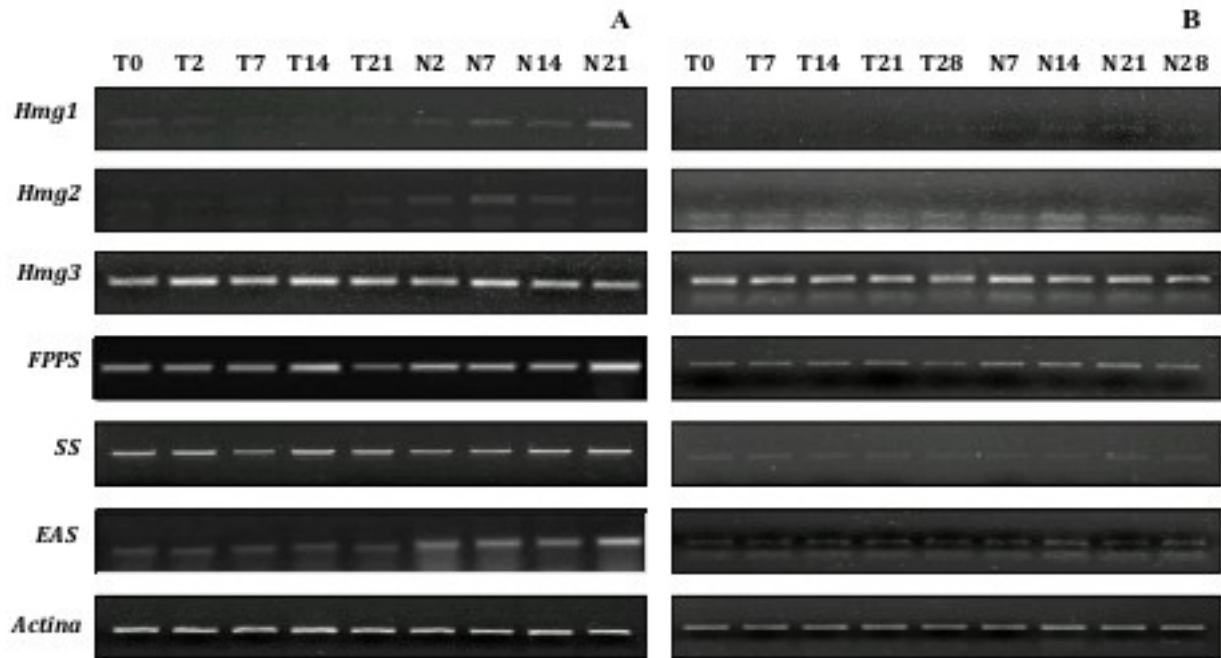


**Fig. 7.** Estadios de desarrollo de *Nacobbus aberrans* en raíces infectadas de chile CM-334. (A) Estadios del nematodo en raíces inoculadas con 2000 J<sub>2</sub> y mantenidas en cámaras de crecimiento. (B) Estadios del nematodo en raíces infectadas de plantas transplantadas a suelo naturalmente infestado por *N. aberrans* y mantenidas bajo condiciones de invernadero. J<sub>2</sub>= Juveniles del segundo estadio, J<sub>3-4</sub>= Juveniles del tercer y cuarto estadio, Hi= Hembra inmadura, Ha= Hembras adultas, Mh= Masas de huevecillos.

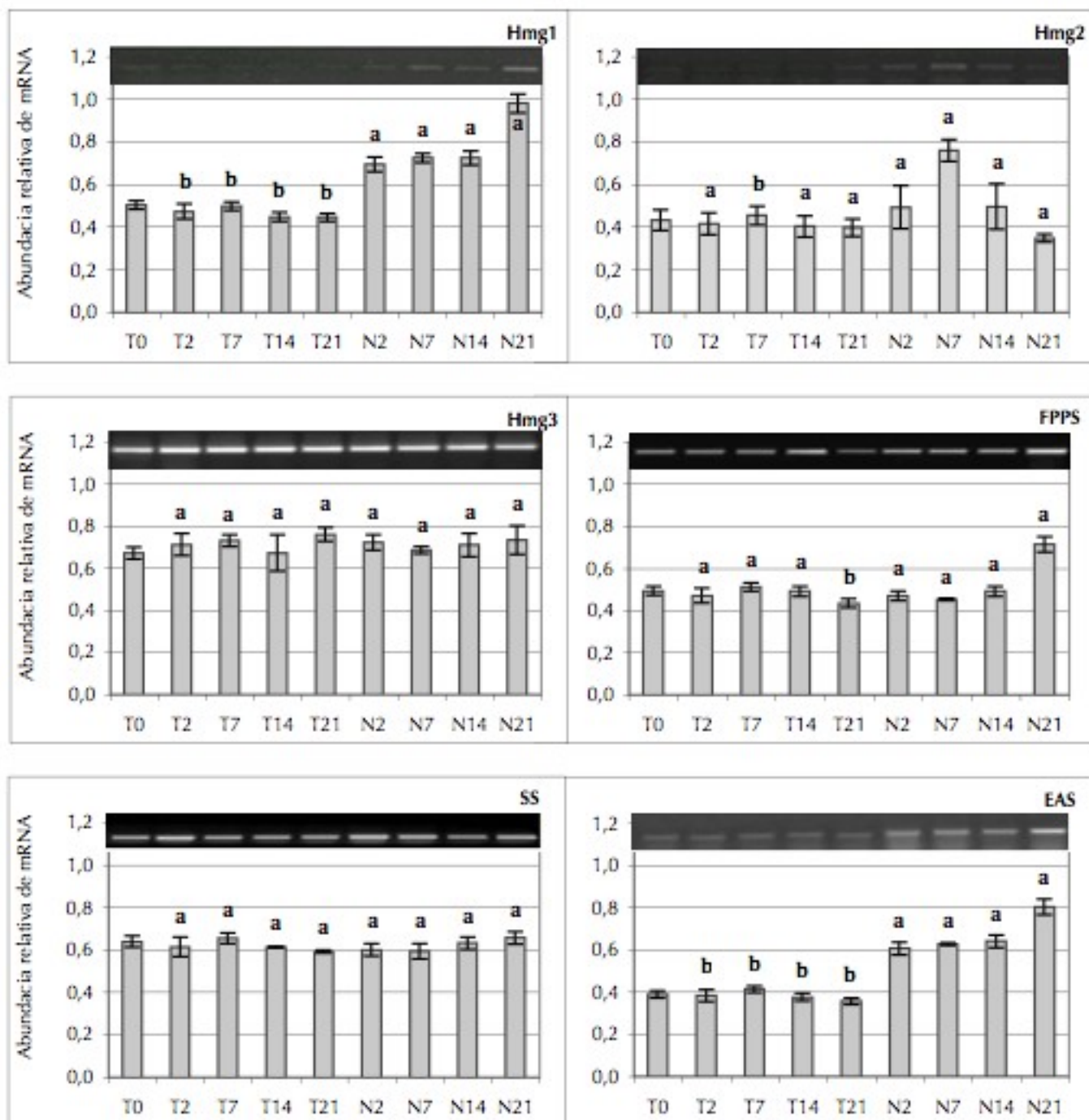
**Acumulación de transcritos de los genes *Hmg1*, *Hmg2*, *Hmg3*, *FPPS*, *SS* y *EAS*.** A los 2 días posteriores a la inoculación del nematodo la acumulación de transcritos de *Hmg1* en raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans* fue menor que *Hmg2*; la acumulación de *Hmg1* se incrementó con el curso del tiempo, mientras que los transcritos de *Hmg2* disminuyeron (Fig. 8A). La mayor diferencia en la acumulación de ambas isoformas se observó a los 21 ddi, tiempo en que los transcritos de *Hmg1* fueron mayores que los de *Hmg2* en comparación con las plantas testigo. Los resultados obtenidos fueron similares tanto en los tres experimentos realizados en cámaras de crecimiento como en el de invernadero.

La mayor acumulación de los transcritos de *FPPS* se observó a los 21 ddi y ddt en comparación con las plantas testigo; mientras que no se observaron diferencias en la acumulación de *Hmg3* y *SS* en las raíces infectadas por el nematodo comparadas con la de las plantas testigo, tanto en los experimentos en cámaras de crecimiento como en invernadero (Fig. 8). En las raíces infectadas por *N. aberrans* provenientes de los experimentos en cámara de crecimiento, los transcritos de *EAS* se incrementaron a los 7, 14 y 21 ddi en comparación con las plantas testigo; mientras que en invernadero *EAS* se incrementó a los 14 y 28 ddt.

Los resultados de la acumulación de transcritos obtenidos mediante el software ImagenJ 1.43e. y los análisis de varianza, indicaron que la acumulación de los transcritos de *Hmg1* fue significativamente mayor (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ) que *Hmg2* a los 2 ddi; y que la acumulación incrementó con el paso del tiempo; en contraste, los transcritos de *Hmg2* fueron disminuyendo. La mayor diferencia en la acumulación de transcritos entre las dos isoformas se observó a los 21 ddi, tiempo en que los transcritos de *Hmg1* fueron significativamente mayores (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ) que los de *Hmg2* en comparación con las plantas testigo. En este tiempo de evaluación, los transcritos de *FPPS* presentaron un incremento significativamente mayor (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ) en comparación con las plantas testigo, mientras que no se observaron diferencias significativas en la acumulación de *Hmg3* y *SS*. Asimismo, la acumulación de transcritos de *EAS* fue significativamente mayor (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ) a los 21 ddi en comparación con las plantas testigo (Fig. 9).

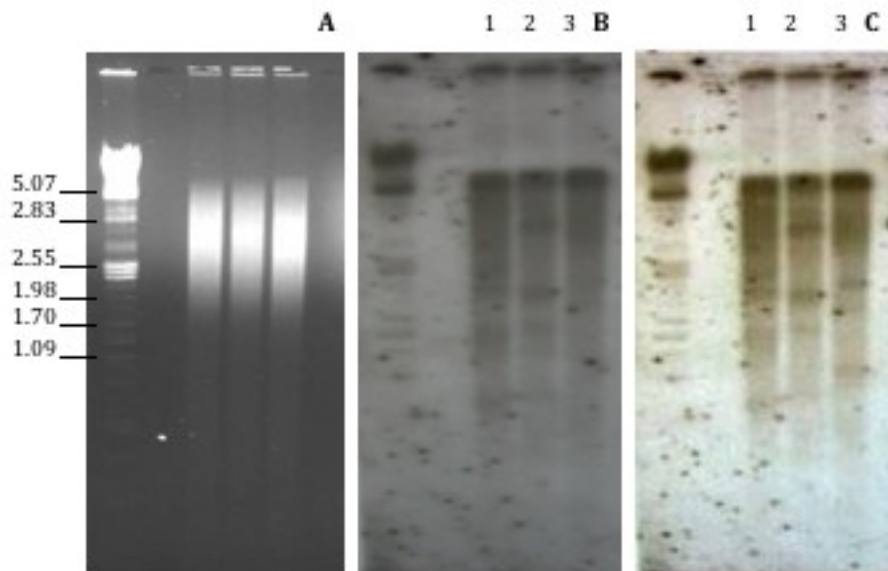


**Fig. 8.** Acumulación de transcritos de los genes *Hmg1*, *Hmg2*, *Hmg3*, *FPPS*, *SS* y *EAS* en raíces de plantas CM-334 infectadas por *N. aberrans*, de experimentos realizados en cámaras de crecimiento (A) y en invernadero (B). Las amplificaciones se realizaron a partir de tres cDNAs generados independientemente. T= Raíces de plantas testigo y N= Raíces de plantas infectadas con *N. aberrans*.



**Fig. 9.** Comparación de la acumulación de transcritos con los datos normalizados de los genes *Hmg1*, *Hmg2*, *Hmg3*, *FPPS*, *SS* y *EAS* en raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos de las raíces testigo de CM-334 y las raíces infectadas por *N. aberrans*, para cada uno de los tiempos evaluados Tukey ( $\alpha = 0.01$ ). Las líneas en cada barra corresponden a la desviación estándar. T= Raíces de plantas testigo y N= Raíces de plantas infectadas con *N. aberrans*.

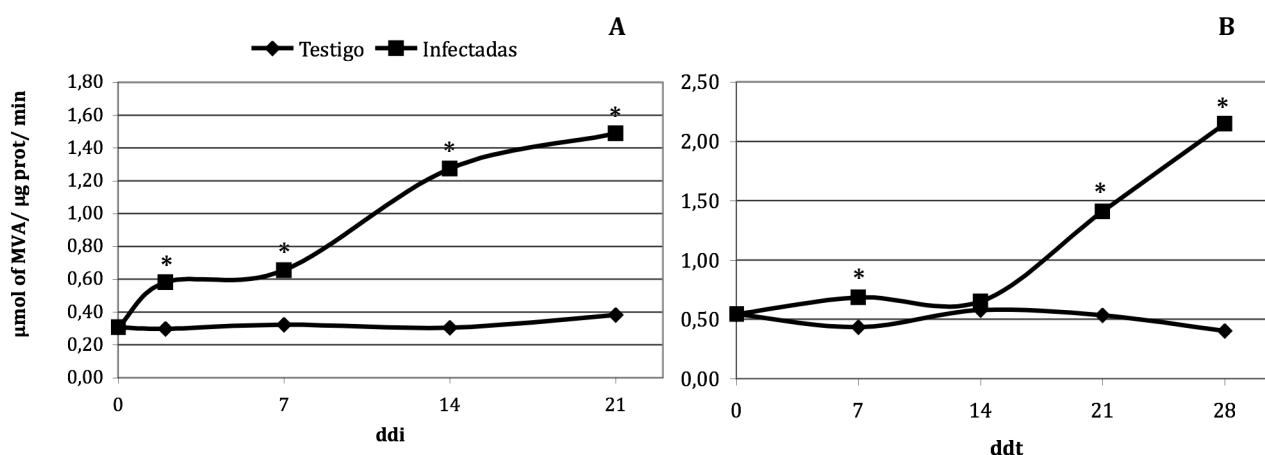
**Número de copias de SS.** Mediante Southern blot se detectaron más de dos señales de hibridación para cada una de las enzimas de restricción empleadas para la digestión del DNA genómico del chile CM-334 (Fig. 10). Se observaron cuatro señales de hibridación para *EcoRI*, tres para *EcoRV* y tres para *HindIII*. Con base en el mapa de restricción reportado por Jung-Hoon *et al.* (2002) para el cDNA de *CASS*, los resultados obtenidos en el Southern blot indican que posiblemente existen más de dos copias de los genes *SS* en el genoma del chile CM-334.



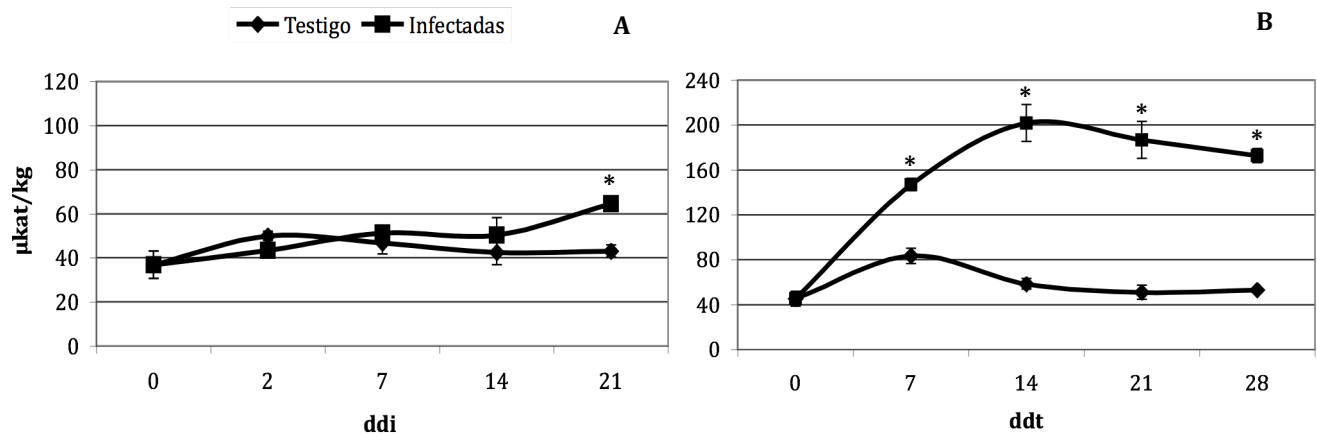
**Fig. 10.** Análisis tipo Southern blot para determinar el número de copias de los genes *SS* en el genoma del chile CM-334. A) Diez  $\mu\text{g}$  de DNA genómico fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* (1), *EcoRV* (2) y *HindIII* (3) y separados en geles de agarosa al 0.7%. La sonda empleada de 1167 pb correspondió a la región interna del fragmento del cDNA de *CASS*. B) Señal de hibridación a los 4 días de exposición a  $-70^\circ\text{C}$ . Considerando el fondo observado en el filme se realizó un lavado con SSC 3x-0.5% SDS a  $55^\circ\text{C}$  y se expuso nuevamente a  $-70^\circ\text{C}$ . C) Señal de hibridación a los 7 días de exposición. Marcador molecular  $\lambda\text{PstI}$  en kb.

**Actividad enzimática de HMGC<sub>o</sub>A-r y EAS.** En las raíces infectadas por *N. aberrans* hubo generalmente un incremento significativo (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ) en la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r en comparación con la de las raíces de plantas testigo, tanto en los experimentos en cámaras de crecimiento como en invernadero. En cámaras de crecimiento, el mayor incremento se observó a los 14 y 21 ddi (Fig. 11A); mientras que en invernadero el mayor incremento de la actividad se observó a los 21 y 28 ddt (Fig. 11B).

En general en raíces infectadas por *N. aberrans* se detectaron incrementos significativos en la actividad de EAS (Fig. 12), la mayor actividad de la enzima, tanto en las raíces de plantas de los experimentos en cámaras de crecimiento como en las de invernadero se registró de los 14 a los 21 días posteriores a la exposición de las plantas al nematodo (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ).



**Fig. 11.** Actividad enzimática de HMGC<sub>o</sub>A-r en raíces de chile infectadas por *N. aberrans*. Experimentos en cámaras de crecimiento (A) y en invernadero (B). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos de raíces testigo de CM-334 y las raíces infectadas por el nematodo, para cada tiempo (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ). Los datos de cada punto muestran el promedio de tres ensayos independientes de actividad realizados por triplicado. En los ensayos de actividad de los tres experimentos establecidos en cámaras de crecimiento, se obtuvieron resultados similares. ddi= días después de la inoculación, ddt= días después del transplante.



**Fig. 12.** Actividad enzimática de EAS en raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*. Experimentos en cámaras de crecimiento (A) y en invernadero (B). Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tratamientos de raíces testigo de CM-334 y las raíces infectadas por el nematodo, para cada tiempo (Tukey,  $\alpha=0.01$ ). Los datos de cada punto muestran el promedio de tres ensayos independientes de actividad realizados por triplicado. En los ensayos de actividad de los tres experimentos establecidos en cámaras de crecimiento, se obtuvieron resultados similares. ddi= días después de la inoculación, ddt= días después del transplante.

## DISCUSIÓN

De los genes que codifican para la HMGC<sub>o</sub>A-r en chile, se han reconocido al menos tres subfamilias y se ha demostrado su regulación diferencial a nivel transcripcional y postranscripcional luego del ataque por patógenos (Crane y Korth, 2002; Sun-Hwa *et al.*, 2003). La acumulación de transcritos de *Hmg1* y *Hmg2* obtenida en la interacción compatible chile CM-334-*N. aberrans*, indica que también este nematodo modifica el patrón de expresión de los genes *Hmg* en las células infectadas. La mayor acumulación de transcritos de *Hmg1*, asociado con la síntesis de esteroides (Ohyama *et al.*, 2007), y la disminución en la acumulación de *Hmg2* (asociados con la síntesis de capsidiol) a los 21 posteriores a la inoculación de las plantas CM-334 con *N. aberrans*, sugieren la existencia de una posible regulación coordinada de las isoformas de *Hmg* en beneficio del nematodo. La acumulación de *Hmg1* podría estar implicada en la síntesis de los esteroides necesarios para el desarrollo de *N. aberrans*, mientras que la menor acumulación de los transcritos de *Hmg2* estaría asociada con una reducción en la síntesis de capsidiol, ambas acciones podrían proveer de condiciones favorables para el establecimiento del nematodo. Con frecuencia se ha consignado que los transcritos de *Hmg2* se acumulan en respuesta a la infección por patógenos; por ejemplo, en *Solanum lycopersicon* la infección por *M. incognita* o *M. hapla* indujo la expresión de *Hmg2* (Cramer *et al.*, 1993). En *C. annuum* cv. NocKwang también se observó la inducción de los

genes *Hmg2* una hora después de la inoculación con *P. capsici* (Sun-Hwa *et al.*, 2003). La expresión diferencial de las isoformas *Hmg1*, *Hmg2* y *Hmg3* de *S. tuberosum* se observó en discos de tubérculos inoculados con razas incompatibles de *P. infestans* o tratados con ácido araquidónico; mientras que *Hmg2* y *Hmg3* fueron fuertemente inducidas después de los tratamientos, *Hmg1* fue suprimida en la misma magnitud (Choi *et al.*, 1992).

El incremento en la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r observado en raíces infectadas por *N. aberrans*, podría estar asociado con el incremento de los transcritos de *Hmg1* obtenido en el presente estudio. En plantas la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r es regulada a nivel de transcripción y traducción de los genes *Hmg*, mediante la degradación de la enzima pre-existente y por la modulación de su actividad (Panda y Amutha, 2004). A nivel de transcripción, se ha reportado que altos niveles en la expresión de los genes *Hmg* inducen la síntesis de la HMGC<sub>o</sub>A-r; mientras que bajos niveles de expresión inhiben su síntesis (Stermer *et al.*, 1994; Ohyama *et al.*, 2007). Estos cambios en la expresión de los genes *Hmg* que en consecuencia regulan la síntesis de la enzima, también se reflejan en la acumulación de los diferentes isoprenoides de la ruta, desde las fitoalexinas sesquiterpénicas (Stermer y Bostock, 1987) hasta compuestos más complejos como los esteroides triterpénicos (Crane y Korth, 2002). Así, es posible que en la interacción Chile CM-334-*N. aberrans*, exista también una asociación entre la expresión de los genes *Hmg1* y la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r.

Asociaciones específicas entre las isoformas de un gen y las enzimas correspondientes para la síntesis de un producto final en particular, en una determinada ruta, han sido denominadas como “canalizaciones metabólicas”, proceso que implica la canalización de sustratos comunes hacia una enzima específica (Stafford, 1974; Winkel, 2004). Estudios en un amplio rango de especies han mostrado una coordinación entre la expresión de genes y la síntesis de las enzimas correspondientes, para la canalización de los intermediarios que darán lugar a la formación de un producto final específico (Winkel, 2004). Por ejemplo, se ha descrito que en *A. thaliana* las ramificaciones de la ruta de los fenilpropanoides están organizadas como metabolones individuales (Rasmussen y Dixon, 1999; Winkel, 2004). Tres formas distintas de la enzima 4CL (4-cumarato:CoA ligasa), codificadas por tres diferentes isoformas del gen, se asocian físicamente con un sustrato específico; de este modo cada enzima 4CL se asocia con una isoforma específica de las enzimas PAL y C4H (cinamato 4-hidroxilasa), que darán lugar a una clase particular de fenilpropanoides (Ehltig *et al.*, 1999; Winkel, 2004). En el caso particular de la ruta de síntesis de compuestos isoprenoides, Leivar *et al.* (2005) mencionan que todas las especies de plantas hasta ahora estudiadas tienen



varias isoformas de HMGC<sub>o</sub>A-r, que probablemente son críticas para encausar el flujo de intermediarios de la ruta MEV hacia la producción de compuestos isoprenoides específicos. Desde el 2001, Rupasinghe *et al.* (2001) indicaron que resultados obtenidos por varios investigadores dan sustento a la hipótesis de que diferentes isoformas de HMGC<sub>o</sub>A-r, podrían estar involucradas en rutas subcelulares separadas para producir isoprenoides finales específicos a través de “metabolones”; esto es, arreglos izoenzimáticos que son regulados de manera independiente. Con base en lo anterior, es posible sugerir que en la interacción chile CM-334-*N. aberrans* exista una asociación entre la acumulación de la isoforma *Hmg1* y la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r para canalizar la ruta hacia la síntesis de metabolitos específicos que son benéficos para el desarrollo del nematodo.

La acumulación de *Hmg1* y la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r, podrían estar asociadas con la acumulación de transcritos de *FPPS* encontrada a los 21 ddi en las raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*. En virtud de que el FPP (farnesilpirofosfato) es el sustrato que conduce a la síntesis de una gran variedad de productos finales en la ruta MEV, se ha sugerido que incrementos en *FPPS* deben ir acompañados por incrementos en la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r para prevenir efectos deletéreos en el crecimiento y desarrollo de la planta (Manzano *et al.*, 2004). Asimismo, la expresión constante de los transcritos de *Hmg3* encontrada en las raíces de chile CM-334 infectadas por el nematodo, podría de igual modo asociarse con la acumulación de *FPPS*. Es posible que la expresión coordinada de estos tres genes junto con la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r, aseguren la disponibilidad continua de intermediarios para la síntesis de FPP que darán lugar a la formación de los diversos isoprenoides necesarios para el mantenimiento celular de la planta y del nematodo. Con base en lo anterior, no se descarta la posibilidad de que en la ruta MEV pueda existir una asociación física entre las enzimas HMGC<sub>o</sub>A-r y *FPPS* con otras enzimas de la ruta para constituir ese metabolón específico que generará los isoprenoides requeridos.

La acumulación de los genes *Hmg1* y *FPPS*, y la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r, también podrían estar relacionadas con la expresión constante de los genes *SS* encontrada en las raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*. Los genes *SS* codifican para la escualeno sintasa, enzima clave en la síntesis de esteroides que son esenciales para la fisiología celular de todos los organismos eucarióticos. La importancia de la expresión constitutiva de los genes *SS* en el metabolismo celular fue demostrada por Devarenne *et al.* (2002), quienes al exponer cultivos celulares de tabaco a ácido araquidónico para disparar la acumulación de fitoalexinas, encontraron que a pesar de que se incrementó la actividad de EAS no hubo un decremento en los niveles de transcritos de *SS* aún

cuando la actividad de la enzima correspondiente se redujo. Se sabe que los nematodos fitoparásitos son incapaces de realizar síntesis nueva de esteroides (Chitwood y Lusby, 1991), por lo que son totalmente dependientes de los esteroides producidos por sus hospedantes para satisfacer sus requerimientos nutricionales. Este hecho sugiere la posibilidad de que en las raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*, la expresión constante de los genes *SS* se lleva a cabo para asegurar un suplemento adecuado de esteroides tanto para la planta como para el crecimiento y desarrollo del nematodo. Sin embargo, el no haber detectado diferencias en la expresión de los genes *SS* en las raíces infectadas por el nematodo, pudiera también explicarse por la presencia de diferentes isoformas del gen en el genoma del chile CM-334, como lo sugirió el análisis de Southern blot. Por ejemplo, en *A. thaliana* se detectaron dos isoformas del gen *SS*, el *SQS1* y el *SQS2*, las cuales se expresaron en diferentes tejidos y etapas fenológicas del desarrollo; así *SQS1* se expresó en todos los tejidos en desarrollo, mientras que *SQS2* se expresó en cotiledones, hipocótilos y en el tejido vascular de hojas (Busquets *et al.*, 2008).

La acumulación de transcritos de *EAS* en las raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans* generalmente se relacionó con un incremento en la actividad de *EAS*, aunque el incremento en la actividad no fue directamente proporcional; la mayor actividad de *EAS*, tanto en las raíces de plantas de los experimentos en cámaras de crecimiento como en las de invernadero, se registró de los 14 a los 21 días posteriores a la exposición de las plantas al nematodo. *EAS* está implicada en la síntesis de capsidiol, fitoalexina con efectos deletéreos en diversos patógenos como oomicetos (Egea *et al.*, 1996) y juveniles J<sub>2</sub> de *N. aberrans* (Godinez-Vidal *et al.*, 2010); por consiguiente se le considera una enzima importante en la resistencia a patógenos (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008). La acumulación de *EAS* en las raíces de chile infectadas por el nematodo pone de manifiesto su importancia en los mecanismos de defensa de la planta, ya que los tiempos en donde se detectó la mayor acumulación de transcritos correspondieron también a aquellos donde se registró el mayor número de juveniles J<sub>2</sub> dentro de las raíces (7 ddi), y con la presencia del estadio de hembra inmadura (21 ddi). Este último estadio, es considerado el responsable de iniciar la inducción del sitio especializado de alimentación en la raíz (Manzanilla-López *et al.*, 2002) y por tanto el mayormente implicado en la reprogramación de la expresión génica en las células hospedantes. Por otra parte, en chile se ha reportado la presencia de cinco a ocho isoformas de los genes *EAS*, de las cuales sólo el gen *PEAS1* ha sido inducido en plantas expuestas a *P. capsici* (Zavala-Páramo *et al.*, 2000). Este hecho permite especular que la acumulación de transcritos de *EAS* en las raíces infectadas por el nematodo, también podría deberse a la posible existencia de diferentes

isoformas del gen, que pudieran estar involucradas en la producción de otros metabolitos sesquiterpénicos diferentes al capsidiol.

En un trabajo previo se encontró que el contenido de capsidiol en plantas de Chile CM-334 infectadas por *N. aberrans* fue menor en comparación con las plantas testigo (Godinez-Vidal *et al.*, 2010; Ver pág. 42). Tal información es un tanto incongruente con los resultados obtenidos en la presente investigación, puesto que se esperaría que a una mayor acumulación de transcritos y de actividad enzimática de EAS hubiese la correspondiente acumulación de la fitoalexina capsidiol. Esta contraposición, nos lleva a especular que el nematodo posiblemente ha desarrollado estrategias para en este caso, manipular a nivel postraducciona el metabolismo de sesquiterpenos para abatir y sobrepasar las respuestas de defensa de sus plantas hospedantes, tal y como ha sido sugerido por otros investigadores (Hussey y Glundler, 1998; Henkle-Dührsen y Kampkötter, 2001; Bellafiore *et al.*, 2008). El abatimiento de las respuestas de defensa de la planta no solamente sería ventajoso para el nematodo, sino también podría favorecer el establecimiento de otros patógenos en la raíz del Chile. Se sabe que plantas CM-334 resistentes a *P. capsici* se comportaron como susceptibles, es decir se rompió su resistencia, cuando el oomiceto se inoculó en plantas infectadas por *N. aberrans* (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). También en genotipos de *Cajanus cajan* resistentes a *Fusarium udum*, la reducción en la acumulación de la fitoalexina cajanol en plantas infectadas por *M. incognita* y *M. javanica* se asoció con el rompimiento de su resistencia al hongo (Marley y Hillocks, 1994).

La falta de relación entre el contenido de capsidiol encontrado en las raíces de Chile infectadas por *N. aberrans*, con los niveles de transcritos y de actividad enzimática de EAS, podría ser explicada mediante los mecanismos de detoxificación que los nematodos fitoparásitos poseen para protegerse de compuestos xenobióticos; compuestos apolares lipofílicos que incluyen a los metabolitos secundarios, así como compuestos de la respuesta de defensa y contaminantes ambientales (Precious y Barret, 1989). Bellafiore *et al.* (2008) reportaron que nematodos fitoparásitos como *M. incognita* producen compuestos detoxificadores o bien tienen la capacidad de detoxificar compuestos que les son nocivos. Se ha propuesto que la detoxificación puede consistir en modificaciones al compuesto xenobiótico, ya sea mediante cambios no enzimáticos como la exposición del compuesto a pH alto al pasar por el intestino; o bien por cambios enzimáticos mediante la producción de enzimas (como la citocromo P-450) encargadas de eliminar a ciertos grupos funcionales (como radicales OH) que confieren la toxicidad al compuesto (Precious y Barret,

1989). El análisis del secretoma de los nematodos *M. incognita* y *Brugia malayi*, reveló que ambos patógenos comparten un grupo conservado de 26 proteínas que incluyen aquellas implicadas en la detoxificación (e.g. SODs) (Hewitson *et al.*, 2008). En *Botrytis cinerea* y *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* se ha reportado la detoxificación del capsidiol mediante oxidación, convirtiéndolo en capsenona que posee menor fungitoxicidad (Ward y Stoessl, 1972; Stoessl *et al.*, 1973). En general estos reportes dan sustento a la posibilidad de que exista un proceso de detoxificación del capsidiol en chile CM-334, por *N. aberrans*.

En la presente investigación hubo una acumulación diferencial de los transcritos de *Hmg1* y *Hmg2* a los 21 ddi en las raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*. La acumulación de *Hmg1* y la actividad de HMGC<sub>o</sub>A-r posiblemente estén asociadas con la expresión constitutiva de los genes *SS* para la síntesis de los esteroides necesarios para el crecimiento y desarrollo del nematodo. Asimismo, la falta de relación entre el contenido de capsidiol con los niveles de transcritos y de actividad enzimática de EAS, sugieren que el nematodo podría manipular los mecanismos de síntesis de la fitoalexina o al mismo metabolito, con el fin de evitar su efecto negativo. La acumulación de los transcritos de *Hmg1* y la expresión constante de *Hmg3*, más el incremento de *FPPS* a los 21 ddi, complementarían la manipulación génica al proveer de un ininterrumpido suplemento de intermediarios de la ruta MEV para la síntesis de isoprenoides importantes en el mantenimiento de la célula hospedante y de *N. aberrans*. Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que *N. aberrans* modifica la expresión de algunos genes de la ruta mevalónica, abatiendo la acumulación de capsidiol y propiciando un abastecimiento adecuado de esteroides para proveerse de condiciones favorables para su establecimiento y desarrollo.

## LITERATURA CITADA

- Ahrens, U. and E. Seemûler. 1992.** Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by a polymerase reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Bellafiore, S., Z. Shen, M.N. Rosso, P. Abad, P. Shih and S.P. Briggs. 2008.** Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS Pathogens* 4:e1000192.
- Bianchini, G., B. Stermer and N. Paiva. 1996.** Induction of early mevalonate pathway enzymes and biosynthesis of end products in potato (*Solanum tuberosum*) tubers by wounding and elicitation. *Phytochemistry* 42:1563-1571.
- Bradford, M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Brooker, J. and D. Russell. 1975.** Properties of Microsomal 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Pisum sativum* seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 167:723-729.
- Busquets, A., V. Keim, M. Closa, A. del Arco, A. Boronat, M. Arró and A. Ferrer. 2008.** *Arabidopsis thaliana* contains a single gene encoding squalene synthase. *Plant Molecular Biology* 67:25-36.
- Candela, M.E., C. Egea, M.D. García-Pérez, J. Costa and M. Candela. 2000.** Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Horticulturae* 522:79-86.
- Castillo, P.G. and N. Marbán-Méndoza. 1984.** Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen 1944 en raíces de *Capsicum annuum* y *C. baccatum*. *Agrociencia* 56:85-93.
- Chávez-Moctezuma, M.P. and E. Lozoya-Gloria. 1996.** Biosynthesis of the sesquiterpenic phytoalexin capsidiol in elicited root cultures of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Reports* 15:360-366.
- Chitwood, D. and W. Lusby. 1991.** Metabolism of plant sterols by nematodes. *Lipids* 26:619-627.
- Choi, D., B. Ward and R. Bostock. 1992.** Differential induction and suppression of potato 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* 4:1333-1344.
- Cramer, C., D. Weissenborn, C. Cottingham, C. Denbow, J. Elsenback, D. Radin and X. Xu. 1993.** Regulation of defense-related gene expression during plant-pathogen interactions. *Journal of Nematology* 25:507-518.

- Crane, Y.M. and K.L. Korth. 2002.** Regulated accumulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase protein in potato cell cultures: effects of calcium and enzyme inhibitors. *Journal of Plant Physiology* 159:1301-1307.
- Davis, E., R. Hussey, T. Baum, J. Bakker, A. Schots, M. Rosso and P. Abad. 2000.** Nematode parasitism genes. *Annual Review of Phytopathology* 38:365-396.
- Devarenne, T.P., D.H. Shin, K. Back, S. Yin and J. Chappell. 1998.** Molecular characterization of tobacco squalene synthase and regulation in response to fungal elicitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 349:205-215.
- Devarenne, T.P., A. Ghosh and J. Chappell. 2002.** Regulation of squalene synthase, a key enzyme of sterol biosynthesis, in tobacco. *Plant Physiology* 129:1095-1106.
- Egea, C., M.D. Alcázar and M.E. Candela. 1996.** Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 98:737-742.
- Ehltling, J., D. Buttner, Q. Wang, C.J. Douglas, I.E. Somssich and E. Kombrink. 1999.** Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily distinct classes in angiosperms. *The Plant Journal* 19:9-20.
- Favery, B., P. Lecomte, N. Gil, N. Bechtold, D. Bouchez, A. Dalmasso and P. Abad. 1998.** RPE, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. *The EMBO Journal* 17:6799-6811.
- Fernández-Pavía, S. 1997.** Host-Pathogen interactions in the root rot resistant *Phytophthora capsici*/*Capsicum annum* CM-334 pathosystem. Ph. D. Thesis. New Mexico State University. Las Cruces, New Mexico. 109 p.
- Glenn, T. and S. Glenn. 1994.** Rapid elution of DNA from agarose gels using polyester plug spin inserts (PEPSIs). *Trends in Genetics (TIG)* 10(10).
- Glosier B.R., E.A. Ogundiwin, G.S. Sidhu, D.R. Sischo and J.P. Prince. 2008.** A differential series of pepper (*Capsicum annum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiological races of P. capsici in pepper. Euphytica* 162:23-30.
- Goddijn, M., K. Lindsey, F. Van der Lee, J. Klap and P. Sijmons. 1993.** Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harboring promoter-gusA fusion constructs. *Plant Journal* 4:863-873.
- Godinez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, E.B. Sepúlveda-García, J. Lara-Reyna, R. Rojas-Martínez and E. Zavaleta-Mejía. 2008.** Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology* 120:299-303.

- Godínez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, P. León-Mejía, E. Lozoya-Gloria and E. Zavaleta-Mejía. 2009.** Changes in the mevalonate pathway in chili CM-334 infected by *Nacobbus aberrans*. XII National Congress of Biochemistry and Plant Molecular Biology & 6th Symposium México-USA. November 9-13. Guanajuato, México. P\_91.
- Godínez-Vidal, D. M. Soto-Hernández, M. Rocha Sosa, E. Lozoya-Gloria, R.I. Rojas-Martínez and E. Zavaleta-Mejía. 2010.** Capsidiol accumulation in chilli CM-334 infected by *Nacobbus aberrans* and its effect on second stage juveniles. *Nematropica* (*in press*).
- Henkle-Dührsen, K. and A. Kampkötter. 2001.** Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Molecular & Biochemical Parasitology* 114:129-142.
- Hermsmeier, D., J. Hart, M. Byzova, S. Rodermel and T. Baum. 2000.** Changes in mRNA abundance within *Heterodera schachtii*-infected roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:309-315.
- Hernández, A., E. Zavaleta-Mejía y G. Carrillo. 1992.** Efecto de *Nacobbus aberrans* (Thorne y Allen, 1994) en la infección de *Phytophthora capsici* Leo. en Chile. *Revista Mexicana de Fitopatología* 10:166-174.
- Hewitson, J.P., Y.M. Harcus, R.S. Curwen, A.A. Dowle, A.K. Atmadja, P.D. Ashton, A. Wilson and R.M. Maizels. 2008.** The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: Proteomic profile of adult excretory-secretory products. *Molecular and Biochemical Parasitology* 160:8-21.
- Hussey, S.R. 1987.** Tinción de nematodos en tejidos vegetales. Pp. 231-234. *In*: B.M. Zuckerman, W.F. Mai y M.B. Harrison, eds. *Fitonematología. Manual de laboratorio*. CATIE, Costa Rica.
- Hussey, R. and F. Grundler. 1998.** Nematode parasitism of plants. Pp. 213-243. *In*: R. Perry and D. Wright, eds. *The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes*. CABI Publishing. Oxon, UK.
- Jain, K., R. Vincent and C. Nessler. 2000.** Molecular characterization of a hydroxy methylglutaryl-CoA reductase gene from mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Molecular Biology* 42:559-569.
- Jammes, F., P. Lecomte, J. de Almeida-Engler, F. Bitton, M.L. Martin-Magniette, J.P. Renou, P. Abad and B. Favery. 2005.** Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 44:447-58.
- Jarsfater, M.B., D.L. Zhang and C.D. Poulter. 2002.** Recombinant squalene synthase. Synthesis of non-head-to-tail isoprenoids in the absence of NADPH. *Journal of the American Chemical Society* 124:8834-8845.

- Jung-Hoon L., Y. Yong-Hwi, K. Hak-Yoon, S. Dong-Hyun, K. Dal-Ung, L In-Jung Lee and K. Kil-Ung. 2002.** Cloning and Expression of Squalene Synthase cDNA from Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Molecules and Cells* 13: 436-443.
- Lee, J.H., Y.H. Yoon, H.Y. Kim, D.H. Shin, D.U. Kim, I.J. Lee and K.U. Kim. 2002.** Cloning and expression of squalene synthase cDNA from hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Molecules and Cells* 13:436-443.
- Leivar, P. V.M. González, S. Castel, R.N. Trelease, C. López-Iglesias, M. Arró, A. Boronat, N. Campos, A. Ferrer and X. Fernández-Busquets. 2005.** Subcellular localization of Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase. *Plant Physiology* 137:57-59.
- Longeman J., J. Schell and L. Willmitzer. 1987.** Improved method for the isolation of RNA from plants tissues. *Analytical Biochemistry* 163:16-20.
- López-Martínez, N., M.T. Colinas-León, C.B. Peña-Valdivia, Y. Salinas-Moreno, P. Fuentes-Montiel, M. Biesaga and E. Zavaleta-Mejía. 2010.** Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant Soil* DOI 10.1007/s11104-010-0553-5.
- Maldonado-Bonilla, L.D., M. Betancourt-Jiménez and E. Lozoya-Gloria. 2008.** Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *European Journal of Plant Pathology* 121:439-449.
- Manzanilla-López, R.H., M.A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R.N. Inserra, P.S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R.M. Souza and K. Evans. 2002.** The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149-227.
- Manzano, D., X. Fernández-Busquets, H. Schaller, V. González, A. Boronat, M. Arró and A. Ferrer. 2004.** The metabolic imbalance underlying lesion formation in *Arabidopsis thaliana* overexpressing farnesyl diphosphate synthase (isoform 1S) leads to oxidative stress and is triggered by the developmental decline of endogenous HMGR activity. *Planta* 219:982-992.
- Marley, P.S., and R.J. Hillocks. 1994.** Effect of root-knot nematodes on cajanol accumulation in the vascular tissues of pigeonpea after stem inoculation with *Fusarium udum*. *Plant Pathology* 43:172-176.
- Masferrer, A., M. Arró, D. Manzano, H. Schaller, X. Fernández-Busquets, P. Moncaleán, B. Fernández, N. Cunillera, A. Boronat and A. Ferrer. 2002.** Overexpression of *Arabidopsis*



- thaliana* farnesyl diphosphate synthase (FPS1S) in transgenic *Arabidopsis* induces a cell death/senescence-like response and reduced cytokinin levels. *The Plant Journal* 30:123-132.
- Ohyama, K., M. Suzuki, K. Masuda, S. Yoshida and T. Muranaka. 2007.** Chemical phenotypes of the *hmg1* and *hmg2* mutants of *Arabidopsis* demonstrate the *in-plant* role of HMG-CoA reductase in triterpene biosynthesis. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 55:1518-1521.
- Oka, Y., I. Chet and Y. Spiegel. 1997.** Accumulation of lectins in cereal roots invaded by the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51:333-345.
- Panda, T. and D. Amutha. 2004.** Regulation and degradation of HMGCo-A reductase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66:143-152.
- Precious W.Y. and J. Barret. 1989.** Xenobiotic metabolism in helminths. *Parasitology Today* 5:156-160.
- Rasmussen, S. and R.A. Dixon. 1999.** Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell* 11:1537-51.
- Redondo, E. y R. Rodríguez. 1987.** Mecanismos de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 77:123-137.
- Robinson G. W., Y. H. Tsay, B.K. Kienzle, C.A. Smith-Montroy and R.W. Bishop. 1993.** Conservation between human and fungal squalene synthetases: similarities in structure, function, and regulation. *Molecular and Cell. Biology*.13: 2706-2717.
- Rupasinghe, H.P.V., K.C. Almquist, G. Paliyath and D.P. Murr. 2001.** Cloning of *hmg1* and *hmg2* cDNAs encoding 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase (HMGR) and their expression and activity in relation to  $\alpha$ -farnesene synthesis in apple. *Plant Physiology and Biochemistry* 39:933-947.
- Salisbury, F. and C. Ross. 1996.** *Plant Physiology*. 4a edition. Wadsworth Publishing. California, USA. 759 p.
- Sambrook J. E. Fritsch and T. Maniatis. 1989.** *Molecular Cloning. A laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor, Laboratory Press. USA. Vol. 1, 2 y 3.
- Stafford, H.A. 1974.** Possible multienzyme complexes regulating the formation of C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> phenolic compounds and lignins in higher plants. *Recent Advances in Phytochemistry* 8:53-79.
- Stermer B. and R. Bostock. 1987.** Involvement of 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the regulation of sesquiterpenoid phytoalexin synthesis in potato. *Plant Physiology* 84:404-408.

- Stermer B.A. G.M. Bianchini and K. L. Korth. 1994.** Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *Journal of Lipid Research* 35: 1133-1140.
- Stoessl, A., C.H. Unwin and E.W.B. Ward. 1973.** Postinfectious fungus inhibitors from plants: fungal oxidation of capsidiol in pepper fruit. *Phytopathology* 63:1225-1231.
- Sun-Hwa, H., K. Jong-Bum, H. Young-Soo and L. Shin-Woo. 2003.** Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced *Hmg2* from pepper (*Capsicum annum*). *Biochemica et Biophysica Acta* 1625:253-260.
- Takahashi, S.T. Kusumaya and H. Seto. 1999.** Purification, characterization and cloning of a Eubacterial 3-hidroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, a key enzyme involved in biosynthesis of terpenoid. *Journal of Bacteriology* 181:1256-1263.
- Takahashi, S., Y. Zhao, P.E. O'Maille, B.T. Greenhagen, J.P. Noel, R.M. Coates and J. Chappell. 2005.** Kinetic and molecular analysis of 5-*epi*-aristolochene 1,3-dihydroxylase, a cytochrome P450 enzyme catalyzing successive hydroxylation of sesquiterpenes. *The Journal of Biological Chemistry* 280:3686-3696.
- Trujillo-Viramontes, F., E. Zavaleta-Mejía, R.I. Rojas-Martínez y J. Lara R. 2005.** Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile. *Nematropica* 35:37-44.
- Vargas, M., E. Zavaleta-Mejía y A.M. Hernández. 1996.** Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en Chile serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26:159-166.
- Vargas, M. 1998.** Cambios inducidos por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen en la actividad de fenilalanina amonio-liasa (PAL) en plantas de Chile (*Capsicum annum* L.) serrano CM-334 resistentes a *Phytophthora capsici* Leo. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 41 p
- Villar-Luna, E., B. Reyes-Trejo, R.I. Rojas-Martínez, O. Gómez-Rodríguez, A.M. Hernández-Anguiano y E. Zavaleta-Mejía. 2009.** Respuesta hipersensitiva en el follaje de CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.
- Ward, E.W.B. 1976.** Capsidiol production in pepper leaves in incompatible interactions with fungi. *Phytopathology* 66:175-176.
- Ward, E.W.B. and A. Stoessl. 1972.** Postinfectious inhibitors from plant. III. Detoxification of capsidiol, an antifungal compound from peppers. *Phytopathology* 62:1186-1187.
- Williamson, M. and R. Hussey. 1996.** Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8:1735-1745.

- Winkel, B. 2004.** Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 55:85-107.
- Zavala-Páramo, G., M.P. Chavez-Moctezuma, E. Garcia-Pineda, S. Yin, J. Chappell and E. Lozoya-Gloria. 2000.** Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene synthase gene (*gPEAS1*) from chili pepper (*Capsicum annuum*). *Physiologia Plantarum* 110:410-418.
- Zook, M.N. and J.A. Kuc. 1991.** Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase-activity in elicitor-treated or fungal-infected potato-tuber tissue. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:377-390.

---

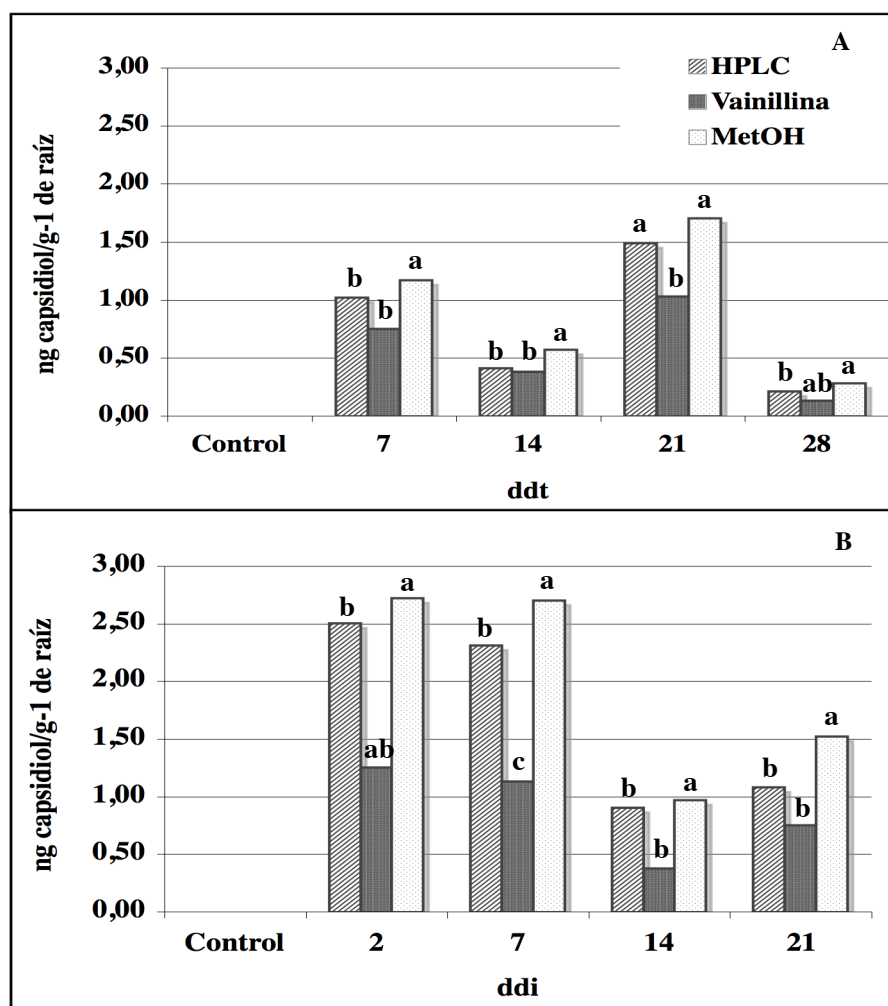
## LA ESPECTROFOTOMETRÍA COMO MÉTODO ALTERNATIVO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CAPSIDIOL

Los métodos comúnmente empleados para el estudio de fitoalexinas como el capsidiol, han sido la cromatografía en capa fina, de gases (CG) y la de líquidos (HPLC). Estos dos últimos métodos permiten determinar de manera precisa la concentración de capsidiol; sin embargo, ambos son costosos y requieren de una gran infraestructura. La espectrofotometría por su parte, aunque no goza de la misma fama que un GC o un HPLC, es un método eficiente, rápido y barato que también permite conocer la concentración de esta fitoalexina. Con base en esto, se planteó a la espectrofotometría como un método alternativo al HPLC, para el análisis de la concentración de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*. Ver metodología en Capítulo 2.

En los extractos de las raíces de chile infectadas por *N. aberrans*, el contenido de capsidiol siempre fue menor en comparación con el de las plantas testigo no infectadas. En el experimento realizado en cámaras de crecimiento, el contenido de la fitoalexina se redujo significativamente en un 86 y 85% a los 7 (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ) y a los 14 días (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ), respectivamente (Fig. 2A; Ver pág. 43); mientras que, en el experimento en invernadero las reducciones fueron de 96 y 77% a los 14 (Tukey,  $\alpha= 0.01$ ) y a los 21 días (Tukey,  $\alpha= 0.05$ ) después del trasplante en suelo infestado con el nematodo, respectivamente (Fig. 2B; Ver pág. 43). Las determinaciones de capsidiol por HPLC, vainillina y metanol, aunque con valores distintos, mostraron una tendencia similar, tanto en el experimento bajo condiciones de invernadero como en las cámaras de crecimiento (Fig. 1). Con base en el análisis estadístico realizado, la cuantificación de capsidiol mediante el método espectrofotométrico utilizando vainillina no fue estadísticamente diferente al método convencional (HPLC), indicando con ello, que la determinación del compuesto en cuestión puede ser obtenida indistintamente por cualquiera de ambos métodos sin detrimento del resultado. En las raíces provenientes del experimento en invernadero este hecho fue evidente y consistente en todos los tiempos analizados, no así en el caso de las raíces provenientes de cámaras de crecimiento, donde las diferencias no fueron significativas sólo en dos de los cuatro tiempos analizados (14 y 21 días posteriores a la inoculación). Mención aparte es la determinación por espectrofotometría utilizando metanol, ya que en la mayoría de los tiempos analizados, e independientemente del origen del

material (invernadero o cámaras de crecimiento), la determinación de capsidiol fue mayor en comparación con los otros dos métodos.

Con base en los resultados obtenidos, se sugiere que la espectrofotometría puede considerarse como un método alternativo para la cuantificación de capsidiol si se toma en cuenta que la determinación de éste es similar a la de un método convencional como el HPLC, además de ser menos costosa y relativamente rápida para su ejecución.



**Fig. 1.** Concentración de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*. Experimento en invernadero (A) y en cámaras de crecimiento (B). ddt= días después del transplante, ddi= días después de la inoculación.

## SECUENCIAS PARCIALES DE LOS GENES ANALIZADOS

Cuadro 2. Secuencias seleccionadas como oligonucleótidos para *Hmg1*, *Hmg2* y *Hmg3*.

<b><i>Hmg1</i></b>								
Oligo	No.	Secuencia	Pb	Tm*	A+T	G+C	Tm**	Tm***
5'	A	CAA TAG ATC AAG CAA AGA TGT	21	49	14	7	56	51
	B	CAATAGATCAAGCAAAGATGT TAC	24	50	16	8	64	59
	C	TA CAATAGATCAAGCAAAGATGT TAC	26	52	18	8	68	63
3'	A	TTT CCA AGA AGT GAT ATC	18	44	12	6	48	43
	B	TTTCCAAGAAGTGATATC ATA TAA	24	48	18	6	60	55
	C	TTTCCAAGAAGTGATATC ATA TAA TAAA	28	50	22	6	68	63
Los oligos que se usaron para la PCR fueron: OLIGO 5' C + OLIGO 3' C → Amplicón de 169 pb (Tm de 63°C).								
<b><i>Hmg2</i></b>								
Oligo	No.	Secuencia	Pb	Tm*	A+T	G+C	Tm**	Tm***
5'	A	GAT GTC ACC AAG GCA TCC	18	54	8	10	56	51
	B	AA GAT GTC ACC AAG GCA TCC	20		10	10	60	55
3'	A	CTT GTC TCT ACC CTC TTC TC	20	52	10	10	60	55
Los oligos que se usaron para la PCR fueron: OLIGO 5' B + OLIGO 3' A → Amplicón de 187 pb (Tm de 55°C).								
<b><i>Hmg3</i></b>								
Oligo	No.	Secuencia	Pb	Tm*	A+T	G+C	Tm**	Tm***
5'	A	GAG GAG GTG GTG AAG AAA GTG	21	56	10	11	64	59
3'	A	ACA GTC TCC ATC ATA GTG ATG CA	21	56	12	9	60	55
Los oligos que se usaron para la PCR fueron: OLIGO 5' + OLIGO 3' → Amplicón de 212 pb (Tm de 57°C).								

Tm\*= Temperatura de alineamiento (Tm) dada por el programa Oligo Analyzer. Tm\*\*= Tm obtenida mediante la fórmula  $2(A+T) + 4(G+C)$ . Tm\*\*\*= Tm menos 5 grados, tomando la Tm obtenida con la fórmula como referencia.

***Hmg1*. Región 3'-UTR**

GTTAACAGTAACATGAAATACAATAGATCAAGCAAAGATGTTACATAGGAATCCTCCTAATGGACAGCTAATTCCTCT  
GATCAAGCAATGTGATCAGTATGTTGACTGAAGTGCTTTGTTAGTTAAAATACAATGGTTGTATTGATTGTTAA  
TAAAATTTTATTATATGATATCACTTCTTGGAATTTTTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

***Hmg2*. Región 3'-UTR**

AGATCTACCAAAGATGTCACCAAGGCATCCTCCTAAGCCGGGAATACAATCCATTCCCCACCTTGTATTTGAAGCTG  
TACACAGATGCTCCAGCAAGTAGCTTCCATTTAAGAATGATCAGTATTAGGAATAAATAAATATATAAAGCAAAA  
TGAAAAAAGAAAACATAAAAAATAAGAGAAGAGGGTAGAGACAAGTTTGAACAACCTGTTGGAAGCTGAAAAAAGG  
GAAGTCTGGAGAAAGATCAGAAGACAAATACATCCAACCTTCTTTTTCTTTGTGAAGATGGTAGGGGTCTCTCAG  
TGATCTTGATGACATCTGTTAGCTGCCAACCTTAGTATCATCAATGTGCCAAATGAGATACCCTTTTCGTTCTTTT

GTATTGTTACTTTGTTTGTAAATTTGTCATTTCTTTGTAATTTCTGTTGGTGGGGTTGTCTGGATCTGATTGCAAA  
GAGTGTGTTCTTGTATATGAAAATGAGTTCCTTTTATTCAAATGAATTGTTGCGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

### **Hmg3. Región interna del exón 4**

GATAAGAAGCCTGCAGCAGTCAATTGGATTGAGGGGAGAGGAAAATCAGTAGTTTGGGAGGCAATAATCAAGGAGGA  
GGTGGTGAAGAAAGTGTGAAAACAGAGGTTGCTTCTCTAGTGGAGCTGAACATGCTTAAAAACCTTACTGGTTC  
AGCCATGGCTGGTGCTCTTGGTGGCTTCAATGCTCATGCCAGCAACATTGTCTCTGCTGTATATTTGGCCACTGGC  
CAAGACCCTGCTCAGAATGTTGAGAGCTCTCACTGCATCACTATGATGGAGACTGTAAATGATGGCAAGGACCTCC  
ATGTTTCTGTAACAATGCCATGCATCGAAGTGGGTACA

### **Secuencias de oligonucleótidos para los genes SS a partir del cDNA de CASS.**

**\*ATGGGGACTTTGAGAGCGATTTTG**AAGAATCCAGATGATTTGTATCCATTGATAAAGCTAAAACCTAGCGGCTCGA  
CATGCCGAAAAGCAGATCCC GCCGGAGCCACATTGGGGATTCTGTTACTTAATGCTTCAAAAAGTCTCTCGTAGTTTT  
GCTCTCGTCATTTCAACAGCTTCTGTGCGAGCTTCGTGATGCTGTATGCATATTCTATTTGGTCTTAGAGCACTTGACA  
CTGTGAGGATGATACCAGCATTCCCACGGATGTTAAAGTACCTATTCTGATCTCTTTTCATCAGCATATCTATGATC  
GTGAATGGCACTTTTCATGTGGTACAAAGGAGTACAAGTTCTCATGGACCAGTTCCATCATGTCTCAACTGCTTTTC  
TGAAACTTGAAAAAATTATCAGCAAGCAATTGAGGATATTACCATGAGGATGGGTGCAGGAATGGCAAAATTTATA  
TGCAAGGAGGTGGAAACAACCGATGATTATGACGAATATTGTCACTACGTAGCTGGGCTTGTGGGCTAGGATTGTCA  
AAACTGTTCCATGCATCTGGGAAAAGAAGATCTGGCTTCAAGATTCTCTCCAACCTCCATGGGTTTATTTCTTCAGAAA  
ACAAACATCATTAGAGATTATCTGGAAGACATAAATGAAGTACCAAGTGCCGTATGTTTTGGCCCCGTGAGATTTGG  
AGTAAATATGTTAACAAGCTTGAGGAGTTAAAGTATGAGGAGAAGTCCGGTCAAGGCAGTGCAATGTCTTAATGACAT  
GGTACCAATGCTTTGTACATGTAGAAGATTGTTTGATTTACATGTCCAATTTGCGTGATCCTGCCATCTTTGATT  
CTGTGCTATTCCACAGGTCATGGCAATTGGGACTTTAGCTATGTGCTATGACAACATTGAAGTCTTCAGAGGAGTGGT  
TAAAATGAGACGTGGTCTGACAGCTAAGGCCATT**GACCGGACTAGAACTATGGCTGATG**\*TATATGGTGCTTTTTTT  
GACTTCTTTGTATGCTGAAATCCAAGGTTAATAATAATGATCCAAATGCAACAAAAACTTTGAAGAGGCTTGAAGCA  
ATCCTGAAAACCTGCGAGAGACTCGGGAACCTTGAATAAAAAGGAAATCTTACGTAATCAAGAGCGAGCCTACTTACAGT  
CCAGTTCTGATCTTTGTCATCTTCATCATACTGGCTATTATTCTTGACACCTATCTGGAAACCGCTCTTAG

**“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y  
la energía atómica: la voluntad”**

Albert Einstein