



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE DEFENSA *EAS*,
HMG2, *WRKY-a*, *PR-1* Y *POX*, Y ACUMULACIÓN DE CAPSIDOL EN LA
INTERACCIÓN COMPATIBLE CM334-*Nacobbus aberrans* E INCOMPATIBLE
CM334-*Meloidogyne incognita***

HERNÁN VILLAR LUNA

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

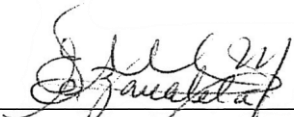
2014

La presente tesis titulada: **“COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE DEFENSA EAS, HMG2, WRKY-a, PR-1 Y POX, Y ACUMULACIÓN DE CAPSIDIOL EN LA INTERACCIÓN COMPATIBLE CM334-Nacobbus aberrans E INCOMPATIBLE CM334-Meloidogyne incognita”** realizada por el alumno: **HERNÁN VILLAR LUNA** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

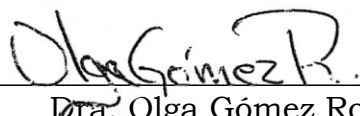
**MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA


Dra. Emma Zavaleta Mejía

ASESORA


Dra. Olga Gómez Rodríguez

ASESOR


Dr. Benito Reyes Trejo

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2014

COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE DEFENSA EAS, HMG2, WRKY-a, PR-1 Y POX, Y ACUMULACIÓN DE CAPSIDIOL EN LA INTERACCIÓN COMPATIBLE CM334-*Nacobbus aberrans* E INCOMPATIBLE CM334-*Meloidogyne incognita*

Hernán Villar Luna, MC.

Colegio de postgraduados, 2014

La línea de chile serrano CM334 es altamente resistente al oomiceto *Phytophthora capsici* y a las tres principales especies de nematodos agalladores (*Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*), pero susceptible a *M. enterolobii* y *Nacobbus aberrans*. Su resistencia a *Meloidogyne spp* se asocia con la sobre-expresión de genes que codifican para los factores de transcripción WRKY2 y WRKY-a y con la acumulación de ácido clorogénico, y en el oomiceto con la sobre-expresión de varios genes de defensa y una elevada acumulación de la fitoalexina capsidiol. El objetivo de este trabajo fue estimar mediante qPCR los niveles de expresión de los genes de defensa *EAS*, *HMG2*, *WRKY-a*, *PR-1* y *POX*, en la interacción compatible CM334/*N. aberrans* y en la incompatible CM334/*M. incognita*; y comparar los niveles de acumulación de la fitoalexina capsidiol en ambas interacciones. Todos los genes de defensa se sobre-expresaron en las dos interacciones, pero, tanto la sobre-expresión como la acumulación de capsidiol siempre fue mayor en las plantas inoculadas con *M. incognita*, en comparación con la interacción compatible CM334/*N. aberrans*; aunque las diferencias en la sobreexpresión no siempre fueron significativas ($P= 0.05$). Los mayores incrementos inducidos por *M. incognita*, se relacionaron con la restricción en su establecimiento y reproducción, como lo indica el hecho de que solamente el 0.1% de los juveniles se encontrara dentro de la raíz a los 21 días después de haber realizado la inoculación.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, qPCR, factores de transcripción, nematodos agalladores, ruta mevalónica.

COMPARISON OF EXPRESSION OF DEFENSE GENES *EAS*, *HMG2*, *WRKY-a*, *PR-1* AND *POX*, AND ACCUMULATION OF CAPSIDIOL IN THE COMPATIBLE INTERACTION CM334-*Nacobbus aberrans* AND INCOMPATIBLE CM334-*Meloidogyne incognita*.

Hernán Villar Luna, MC.

Colegio de postgraduados, 2014

The line chili pepper CM334 is highly resistant to the oomycete *Phytophthora capsici* and the three major species of root-knot nematodes (*Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica*), but susceptible to *M. enterolobii* and *Nacobbus aberrans*. Resistance to *Meloidogyne spp* is associated with the overexpression of genes encoding the transcription factors WRKY and WRKY2-a and the accumulation of chlorogenic acid, and in the oomycete with the overexpression of several genes of defense and high accumulation of the phytoalexin capsidiol. The objective of this study was to estimate by qPCR the expression levels of the defense genes *EAS*, *HMG2*, *WRKY-a*, *PR-1* and *POX* in the compatible interaction CM334 / *N. aberrans* and the incompatible CM334 / *M. incognita*; and to compare the accumulation of capsidiol in both interactions. All defense genes were overexpressed in the two interactions, but in both overexpression and the accumulation of capsidiol was always higher in plants inoculated with *M. incognita* compared to the compatible interaction CM334 / *N. aberrans*; although overexpression differences were not always significant ($P=0.05$). The highest increases induced by *M. incognita* were associated with the restriction in its establishment and reproduction, indicated by the fact that only 0.1% of the juveniles were found within the root at 21 days after inoculation.

Keywords: *Capsicum annuum*, qPCR, transcription factor *WRKY-a*, root-knot nematodes, mevalonic pathway.

Dedico esta tesis:

A mis padres **José** y **María**:

Por todo el esfuerzo realizado para sacar adelante día a día a nuestra familia,
por la confianza y apoyo que me brindaron para alcanzar mis sueños.

A mis hermanos **Gris** y **Edgar** por todo el apoyo y su grandiosa amistad.

AGRADECIMIENTOS

A todos los mexicanos que mediante sus impuestos, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el Colegio de Postgraduados, financiaron e hicieron posible la obtención del presente grado.

A mi consejo particular integrado por los Doctores: Emma Zavaleta Mejía, Olga Gómez Rodríguez y Benito Reyes Trejo; por todos los conocimientos compartidos, la paciencia otorgada y la amistad brindada. Particularmente a la Dra. Emma Zavaleta Mejía por dirigir con tenacidad y entrega este trabajo, por su calidad humana y profesionalismo.

Al Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304 por el apoyo financiero otorgado.

A mi hermano Edgar por compartir sus conocimientos, tiempo y experiencia para mi formación académica.

NOTA

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

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
Genes de defensa de las plantas	5
Nematodos endoparásitos sedentarios	6
<i>Meloidogyne incognita</i>	7
<i>Nacobbus aberrans</i>	10
Sitios especializados de alimentación	12
Reprogramación génica inducida por nematodos.....	14
Respuestas de defensa del chile “Criollo de Morelos-334” (CM334)	15
Respuestas de defensa inducidas por <i>N. aberrans</i> en chile CM334.	17
Biosíntesis de isoprenoides (Ruta Mevalónica).....	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
Material vegetal	23
Inoculación con <i>N. aberrans</i> y con <i>M. incognita</i>	23
Establecimiento del Experimento	23
Extracción de RNA total y síntesis de cDNA	24
PCR en tiempo real	25
Extracción y cuantificación del contenido de capsidiol	26
Análisis estadístico	27
IV. RESULTADOS	28

Infección de raíces de chile CM334 por <i>N. aberrans</i> y por <i>M. incognita</i>	28
Acumulación de transcritos en raíces de plantas CM334 infectadas por nematodos agalladores.	31
Acumulación de capsidiol en raíces de plantas CM334 inoculadas con nematodos agalladores.	33
V. DISCUSIÓN	34
VI. LITERATURA CITADA	39

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados.	26
Cuadro 2. Acumulación de capsidiol en raíces de plantas de chile CM334 a 7 días posteriores a la inoculación con el nematodo. <i>Control</i> : sin nematodo; <i>Na</i> : inoculadas con <i>Nacobbus aberrans</i> ; <i>Mi</i> : inoculadas con <i>M. incognita</i>	33

LISTA DE FIGURAS

Página

Fig. 1. Ruta biosintética de capsidiol en tabaco. Pirofosfato de isoprenilo (IPP), difosfato de farnesilo (FPP), pirofosfato (OPP), 5-epiaristoloueno sintasa (EAS), epiaristoloueno (EA), 5-epiaristoloueno dihidroxilasa (EAH).
..... 22

Fig. 2. Número de nematodos que ingresaron en raíces de chile CM334. Na, *Nacobus aberrans*; Mi, *Meloidogyne incognita*. Cada barra representa el promedio de cuatro raíces analizadas, y la línea en cada barra la desviación estándar. El experimento se repitió una vez. 29

Fig. 3. A) *Nacobus aberrans*. **B)** *Meloidogyne incognita*. Invasión de raíces de chile CM334 a 2 días posteriores a la inoculación (dpi) **(a)** y **(d)**; 7 dpi **(b)** y **(e)** y 21 dpi **(c)** y **(f)**. 30

Fig. 4. Niveles relativos de transcritos de los genes *EAS*, *HMG2*, *PR-1*, *POX* y *WRKY-a* en raíces de chile CM334 resistente a *Meloidogyne incognita*. Na: inoculadas con *Nacobus aberrans*; Mi: inoculadas con *M. incognita*. Cada barra representa el promedio de tres réplicas y la línea en cada barra la desviación estándar. Los niveles de transcritos se expresaron como cambios en veces en respuesta al tratamiento con relación al nivel basal de transcritos en las plantas testigo (1x) y se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008), utilizando como referencia interna el gen que codifica para 3-fosfato Gliceraldehído deshidrogenasa (*GAPDH*) para normalizar la expresión, y las plantas testigo para calibrar los niveles de expresión del gen de interés. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). El experimento se repitió una vez. 32

I. INTRODUCCIÓN

La línea de chile serrano “Criollo de Morelos” CM334 es altamente resistente a las tres principales especies de nematodos agalladores: *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, y *M. javanica* (Pegard *et al.*, 2005); pero susceptible a los nematodos agalladores *Nacobbus aberrans* (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005) y *M. enterolobii* (Villar-Luna, 2013). En relación con la resistencia de CM334, se conoce que la respuesta de hipersensibilidad (HR) de CM334 se desarrolla a los 3 días posteriores a la inoculación con *M. incognita* (Pegard *et al.*, 2005). Los mecanismos moleculares asociados con la resistencia a *Meloidogyne* spp en algunos genotipos de chile involucran la sobre-expresión de genes que codifican para factores de transcripción WRKY2 y WRKY-a y la acumulación de ácido clorogénico (Pegard *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). Los factores de transcripción WRKY son una familia multigénica de proteínas (Eulgem y Somssich, 2007) asociadas con la respuesta a estrés biótico y abiótico que se unen a elementos promotores de genes relacionados con la defensa y regulan su expresión (Eulgem, 2005). El gen *WRKY-a*, se indujo en una interacción incompatible entre chile pimiento y *Tobacco mosaic virus* (TMV) o *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) (Park *et al.*, 2006); los autores asociaron la sobre-expresión de dicho gen con rutas de señalización relacionadas con defensa. La sobre-expresión de los genes *WRKY-a* y *WRKY 2* también se reporta en interacciones incompatibles entre chile y *M. incognita* (Li *et al.*, 2008).

El genotipo de Chile CM334 muestra además resistencia al oomiceto *Phytophthora capsici* que se manifiesta como una HR a nivel de raíz, tallo y follaje (Gil-Ortega *et al.*, 1991, Fernández-Pavía, 1997; Candela *et al.*, 2000; Ueeda *et al.*, 2006; Glosier *et al.*, 2007). Los mecanismos moleculares asociados con su resistencia al oomiceto implican la sobre-expresión de genes de defensa que codifican para la 5-*epi*-aristolóqueno sintasa (*EAS*) y proteínas relacionadas con patogénesis [PR1 (*PR-1*) y peroxidasas (*POX*)]; y la acumulación de compuestos con propiedades antimicrobianas, como el ácido trans-cinámico (Candela *et al.*, 1995; Fernández-Pavía, 1997; Zavala-Paramo *et al.*, 2000) y la fitoalexina sesquiterpénica capsidiol, frecuentemente utilizada como marcador de resistencia (Candela *et al.*, 1995). La biosíntesis de esta fitoalexina, es regulada por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) específica de la ruta del mevalonato, vía biosintética de fitoalexinas sesquiterpénicas (Ha *et al.*, 2003). La HMGR es codificada por una familia multigénica y en Chile se encuentran los genes *HMG1*, *HMG2* y *HMG3* involucrados en la biosíntesis de diversos tipos de isoprenoides, tanto esteroides como fitoalexinas sesquiterpénicas (Ha *et al.*, 2003; Chappell *et al.*, 1991). El gen *HMG1* probablemente está asociado con la síntesis de esteroides mientras que *HMG2* con las respuestas de defensa (Weissenborn *et al.*, 1995); por ejemplo, al comparar una interacción incompatible entre *Solanum tuberosum*/*Phytophthora infestans* con una compatible, se encontró que en la primera se suprimió la expresión de *HMG1* mientras que la de *HMG2* y *HMG3* se incrementó en comparación con la interacción compatible (Choi *et al.*, 1992).

La enzima clave para la biosíntesis del capsidiol es la 5-*epi*-aristoloqueno sintasa codificada por el gen *EAS*. En chile y tabaco la expresión del gen *EAS* se induce por el ataque de patógenos o tratamiento con elicitores abióticos (Zavala-Paramo *et al.*, 2000; Bohlmann *et al.*, 2002). En chile inoculado con *P. capsici*, la sobre-expresión de *EAS* se asocia con una acumulación elevada de capsidiol (Zavala-Paramo *et al.*, 2000).

La respuesta de defensa de las plantas también incluye a las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) que podrían modificar a la pared celular y proporcionar resistencia a la invasión por patógenos (Benhamou *et al.*, 1991) o mostrar actividad antifúngica (Niderman *et al.*, 1995). La expresión de los genes *PR-1* y de *POX* (peroxidasas) también se asocia con los mecanismos de defensa de CM334 frente a *P. capsici* (Fernández-Pavía, 1997; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Melillo *et al.*, (2006) mencionan que durante una interacción incompatible planta-nematodo, las peroxidasas juegan un papel fundamental en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se asocian con el desarrollo de la HR. Las peroxidasas brindan protección, fortaleciendo la pared celular mediante la deposición de lignina y suberina o contratacando con una alta producción de ROS (Croft *et al.*, 1990; Passardi *et al.*, 2005; Cavalcanti *et al.*, 2006).

Por otra parte, durante la formación del sitio especializado de alimentación inducido por nematodos endoparásitos sedentarios, ocurre una alteración drástica en la expresión de genes (Kyndt *et al.*, 2013; Rodiuc *et al.*, 2014). En la interacción compatible de chile CM334/*N. aberrans* se redujo la acumulación

de transcritos de genes relacionados con defensa, como *EAS*, *POX*, *GLU* y *PR-1* (Fernández-Herrera *et al.*, 2012) y en presencia del nematodo la expresión de la HR de CM334 se retrasó (Villar-Luna *et al.*, 2009). De igual forma, Sandoval-Luna (2011) observó que en plantas de CM334 infectadas por *N. aberrans* e inoculadas con *P. capsici*, la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) y el contenido de fenoles solubles totales se redujo en presencia del nematodo.

La escasa información que a la fecha se tiene en relación con las respuestas de defensa del chile CM334 en interacciones compatibles e incompatibles que involucren a los nematodos agalladores *N. aberrans* y *M. incognita*, motivó la realización de la presente investigación que tuvo por objetivos:

1. Estimar mediante qPCR los niveles de expresión de los genes de defensa *EAS*, *HMG2*, *WRKY-a*, *PR-1* y *POX*, en la interacción compatible CM334/*N. aberrans* y en la incompatible CM334/*M. incognita*.
2. Comparar los niveles de acumulación de la fitoalexina capsidiol durante la interacción compatible y la incompatible.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Genes de defensa de las plantas

Las plantas han desarrollado diversos mecanismos para defenderse del ataque de patógenos, la eficacia de las respuestas de defensa dependerá de la velocidad y magnitud con la que la planta responda al ataque (Glazebrook, 2001). La máxima expresión de defensa se expresa como una muerte celular programada, conocida como respuesta de hipersensibilidad (RH) (McDowell y Woffenden, 2003); las células sacrificadas durante este fenómeno pueden limitar el avance del patógeno causándole la muerte. La RH involucra numerosas respuestas bioquímicas y acumulación de sustancias antimicrobianas producto de una reprogramación génica de las células hospedantes (Agrios, 2005). Entre las respuestas tempranas está la acumulación de moléculas señal como el ácido salicílico (AS), el etileno (ET) y ácido jasmónico (AJ). El AS promueve la sobre-expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) (Shah, 2003), involucradas en la defensa de las plantas (Antoniw, 1980). En la biosíntesis del ET es clave la enzima ácido-1-carboxílico 1-aminociclopropano sintasa (ACC sintasa) regulada por una familia multigénica (genes ACC) (Mathooko, 1996), mientras que la acumulación del AJ se induce a partir de la expresión del gen *OPR3* que codifica para la enzima 12-Oxofitodienoato reductasa 3 necesaria para su biosíntesis (Schaller *et al.*, 2000). En plantas atacadas por patógenos se incrementa la ruta de biosíntesis

de los fenilpropanoides a través de la cual se generan diversos compuestos antimicrobianos como fenoles y fitoalexinas, entre otros (Hammond-Kosack y Jones, 1996); tal incremento es posible gracias a la sobre-expresión de los genes *PAL* que codifican para la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). También la ruta mevalónica, a través de la cual se sintetizan fitoalexinas sesquiterpénicas, se incrementa debido a la sobre-expresión de los genes *HMG* (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, HMGR) (Chappell *et al.*, 1991). Por otro lado los factores de transcripción conocidos como proteínas WRKY codificadas por una familia multiétnica (genes *WRKY*), se unen a elementos promotores de genes relacionados con defensa para regular su expresión (Eulgem, 2005; Eulgem y Somssich, 2007; Pandey y Somssich, 2009).

Nematodos endoparásitos sedentarios

Todos los nematodos parásitos de plantas son patógenos biotróficos obligados, estos organismos provocan cambios drásticos en la morfología y fisiología de sus hospedantes (Williamson y Gleason, 2003); los géneros de nematodos endoparásitos sedentarios de mayor importancia económica comprenden a los que se enquistan *Heterodera* y *Globodera*, y a los que inducen la formación de agallas *Meloidogyne* sp y *Nacobbus aberrans* (Sijmons *et al.*, 1994; Williamson y Gleason, 2003). Estos nematodos se caracterizan por tener la capacidad de inducir la formación de sincitios o células gigantes, respectivamente, que constituyen los sitios especializados de alimentación a partir de los cuales obtienen los nutrientes necesarios para completar su ciclo de vida (Sijmons *et*

al., 1994; Baum *et al.*, 2007). Los nematodos agalladores provocan la nodulación de las raíces de sus hospedantes, debido a la hipertrofia e hiperplasia que sufren las células de la raíz (Karssen y Moens, 2013).

El género *Meloidogyne* es el de mayor importancia económica a nivel mundial, con más de 90 especies que parasitan a más de 3000 especies de plantas (Abad *et al.*, 2003; Moens *et al.*, 2009). Las especies de mayor importancia son cuatro: *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, y *M. hapla* (Sikora y Fernández, 2005). Sin embargo, recientemente ha emergido una especie altamente agresiva, *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*) (Brito *et al.*, 2007) capaz de reproducirse e inducir agallas en la raíz de cultivares de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y pimiento (*Capsicum annuum* L.) que poseen genes de resistencia a los nematodos *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (Kiewnick *et al.*, 2009). Actualmente se le considera como una de las especies más patogénicas (Kiewnick *et al.*, 2008).

Para el género *Nacobbus*, conocido como “falso agallador”, solamente se han reportado dos especies: *N. aberrans* y *N. dorsalis*. *N. aberrans* es la más importante y parasita a más de 80 especies de plantas (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

Meloidogyne incognita

Es una especie cosmopolita ampliamente distribuida en el mundo, considerada como la de mayor importancia económica por las grandes pérdidas que ocasiona en los cultivos (Sasser, 1980).

La clasificación de *Meloidogyne* más actual descrita por Decraemer y Hunt (2013), se muestra a continuación:

PHYLUM: Nematoda

CLASE: Chromadorea

ORDEN: Rhabditida

Suborden: Tylenchina

Infraorden: Tylenchomorpha

SUPERFAMILIA: Tylenchoidea

FAMILIA: Hoplolaimidae

Subfamilia: Meloidogyninae

Género: *Meloidogyne*

El ciclo de vida inicia con la etapa de huevecillo, seguido de cuatro estadios juveniles y finaliza con la etapa adulta (Abad *et al.*, 2009); el primer estadio juvenil o J₁, permanece dentro del huevecillo, donde se lleva a cabo la primera muda que va de J₁ a J₂. Los J₂ emergen de los huevecillos cuando las condiciones de temperatura y humedad son adecuadas e invaden la raíz en la parte cercana al ápice. La penetración y migración en los tejidos la realizan mediante mecanismos físicos (estilete) y bioquímicos (secreción de enzimas pectinolíticas y celulolíticas). La migración es intercelular y se alojan cerca del cilindro vascular donde inducen la formación de células gigantes e inician su etapa sedentaria. Después de aproximadamente 14 días ocurre la segunda muda, pasando de J₂ a J₃ y al poco tiempo muda a J₄. Los estadios J₃ y J₄

carecen de un estilete funcional por lo tanto no se alimentan, el nematodo J₄ pasa al estado adulto (Moens *et al.*, 2009; Abad y Williamson, 2010). La hembra adulta puede o no ser fertilizada y sus huevecillos son depositados en una matriz gelatinosa compuesta principalmente de una glicoproteína producida en las glándulas rectales del nematodo, es visible en la superficie de las agallas y protege a los huevecillos de condiciones ambientales adversas y depredadores (Moens *et al.*, 2009). Existe un marcado dimorfismo sexual, los machos adultos permanecen vermiformes y las hembras se hinchan adquiriendo una forma globosa, en especies partenogénicas los machos se pueden desarrollar cuando las condiciones no son favorables para el desarrollo de hembras (Moens *et al.*, 2009). Dependiendo de las condiciones ambientales y del hospedante, el ciclo puede completarse entre 21 y 42 días (Baicheva *et al.*, 2002; Abad y Williamson, 2010).

Todas las especies del género *Meloidogyne* establecen una interacción muy compleja y sofisticada con sus hospedantes, que les permite obtener los nutrimentos necesarios para su supervivencia (Gheysen y Mitchum, 2009). En las raíces de sus hospedantes inducen la formación de agallas que contienen a las células gigantes multinucleadas, hasta con 80 núcleos polinucleolados cada una y con un aumento de hasta ocho veces el número de cromosomas (Moens *et al.*, 2009).

En la planta hospedante agallada se alteran sus funciones vitales como absorción, transporte de nutrientes y transporte de agua, provocando

enanismo, clorosis, marchitez y en algunas ocasiones la muerte de la planta (Sikora y Fernández, 2005; Moens *et al.*, 2009).

Nacobbus aberrans

Comúnmente conocido como el nematodo “falso agallador”, es un nematodo endoparásito sedentario cuya hembra madura induce la formación de agallas en las raíces de sus hospedantes. Se considera un nematodo económicamente importante ya que provoca pérdidas principalmente en los cultivos tropicales y subtropicales como chile, jitomate, frijol, papa y remolacha azucarera; las plantas afectadas expresan síntomas como: reducción del sistema radical, clorosis, enanismo y marchitez (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Scurrah *et al.*, 2005). El nematodo se encuentra en Norteamérica (México y Estados Unidos) y en Sudamérica (Argentina, Chile, Perú, Bolivia y Ecuador) (Manzanilla-López *et al.*, 2002). La clasificación más actual es la propuesta por Decraemer y Hunt (2013):

PHYLUM: Nematoda

CLASE: Chromadorea

ORDEN: Rhabditida

Suborden: Tylenchina

Infraorden: Tylenchomorpha

SUPERFAMILIA: Tylenchoidea

FAMILIA: Pratylenchidae

Subfamilia: Nacobbinae

Género: *Nacobbus*

El ciclo de vida de *N. aberrans* inicia en la etapa de huevecillo, el primer estadio (J₁) se desarrolla en el interior del huevo, muda y pasa a J₂; el J₂ eclosiona e invade a través de los ápices de las raíces y el nematodo puede permanecer dentro o salir de la raíz con frecuencia; la migración es intracelular y la muda de J₂ a J₃ puede ocurrir en el suelo o dentro de la raíz; el J₃ muestra menos actividad y tiende a permanecer en forma de “C” o espiral en la corteza de la raíz (Clark, 1967; Manzanilla-López *et al.*, 2002). La muda de J₃ a J₄ y a hembra inmadura también puede llevarse a cabo dentro o fuera de la raíz (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

Una vez dentro de la raíz, la hembra inmadura se aloja cerca del cilindro vascular e inicia la formación del sitio especializado de alimentación (sincitio), esta estructura también puede ser inducida por la hembra J₄ (Manzanilla-López *et al.*, 2002); los sincitios formados por la fusión de varias células pueden llegar a medir de 2 a 8 mm (Finetti, 1990). La hembra adopta un estado sésil y posteriormente alcanza la madurez; es fecundada y oviposita los huevecillos en una matriz gelatinosa que es visible en la superficie de las agallas (Scurrah *et al.*, 2005; Manzanilla-López *et al.*, 2002), el ciclo completo de *N. aberrans* concluye entre 28 y 95 días, dependiendo de las condiciones ambientales y el hospedante (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

N. aberrans durante su ciclo de vida combina hábitos parasíticos que son característicos de miembros de la familia Pratylenchidae y de las subfamilias Meloidogyninae y Heteroderinae; el hábito migratorio de todos los estadios juveniles, hembras inmaduras y machos son característicos de la familia

Pratylenchidae; y de las subfamilias Meloidogyninae y Heteroderinae el establecimiento de un sitio especializado de alimentación; en *N. aberrans* la hembra J₄ y la hembra inmadura son las responsables de inducir la estructura (Manzanilla-López *et al.*, 2002), mientras que en los nematodos que se enquistan y en las especies de *Meloidogyne* el J₂ es el inductor (Sobczak y Golinowski, 2009; Abad *et al.*, 2009).

Sitios especializados de alimentación

Los nematodos pertenecientes al grupo de endoparásitos sedentarios, son considerados los de mayor importancia por el grado de daño que causan en los cultivos (Williamson y Gleason, 2003; De Waele y Elsen, 2007). En este grupo se incluye a los que se enquistan y a los agalladores, estos nematodos establecen una interacción muy compleja y sofisticada con sus hospedantes (Gheysen y Mitchun, 2009) y para completar su ciclo de vida de manera exitosa han desarrollado la capacidad de inducir la diferenciación de sitios especializados de alimentación, conocidos como células gigantes y sincitios (Gheysen y Fenoll, 2002).

Las especies del género *Meloidogyne* inducen la formación de células gigantes, muy similares para todas las especies del género (Jones y Goto, 2011); los J₂ son los principales inductores del sitio especializado de alimentación (Berg *et al.*, 2009; Abad *et al.*, 2009). El nematodo penetra y migra intercelularmente hasta llegar al cilindro vascular y su cabeza queda embebida en la periferia del tejido vascular (Berg *et al.*, 2009). Cada J₂ induce la rediferenciación de cinco a

siete células del parénquima (Abad *et al.*, 2009), transformándolas en células gigantes multinucleadas, resultantes de divisiones nucleares repetidas sin citocinesis (Abad *et al.*, 2003) y cuya función es la de proveer al nematodo los nutrientes necesarios para su desarrollo y reproducción (Abad *et al.*, 2009). Las células son metabólicamente activas, poseen un citoplasma muy denso con numerosos plastidios, ribosomas, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico liso, la vacuola central es modificada, desapareciendo y dando lugar a un gran número de vacuolas de menor tamaño; tales cambios generan hiperplasia e hipertrofia en las células vecinas, induciendo la formación de agallas (Abad *et al.*, 2003).

Los nematodos que se enquistan (*Globodera* y *Heterodera*) al igual que *N. aberrans* inducen la formación de sitios especializados de alimentación conocidos como sincitios (Baum *et al.*, 2007); pero en el caso de los nematodos que se enquistan únicamente el J₂ es el que penetra la raíz del hospedante, migra de forma intracelular y se aloja cerca del cilindro vascular, elige a una sola célula y comienza a modificarla (Williamson y Gleason, 2003; Sobczak y Golinowski, 2011). En esta célula ocurre el ensanchamiento progresivo de los plasmodesmos que la conectan con las células vecinas, iniciando así la fusión de los protoplastos (Grundler *et al.*, 1998). Las paredes de las células involucradas se desintegran de manera gradual durante la formación del sincitio, que proveerá al nematodo de los nutrientes necesarios para completar su ciclo de vida (Turner y Rowe, 2006).

El sincitio se caracteriza por el incremento de citoplasma, reducción del volumen de las vacuolas, hipertrofia del núcleo y nucléolo, incremento del retículo endoplásmico, ribosomas, plastidios, mitocondrias, microtúbulos y microfilamentos (Sobczak y Golinowski, 2011).

El género *Nacobbus* presenta algunas similitudes con *Meloidogyne* spp y con los nematodos que se enquistan. *Nacobbus* induce la formación de un sincitio y como consecuencia de la hiperplasia e hipertrofia de la células vecinas se desarrollan las agallas en las raíces hospedantes, el sincitio es inducido por la hembra J₄ o por la hembra inmadura (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

Reprogramación génica inducida por nematodos

Las plantas cuando son atacadas por nematodos poseen la capacidad de responder y activar los mecanismos de defensa; esta respuesta se puede dar durante una interacción compatible e incompatible, caracterizándose por ser más rápidas y de mayor intensidad en la interacción incompatible, mientras que en la interacción compatible se da de manera lenta y débil (Gheysen y Fenoll, 2002). En la interacción compatible, la reprogramación génica de la célula hospedante, inducida por el nematodo, implica la sobre-expresión de genes que favorecen la formación del sitio especializado de alimentación y la represión de aquellos implicados en la síntesis de moléculas que pueden restringir el establecimiento y reproducción del nematodo (Jammes *et al.*, 2005). Durante la formación de los sitios especializados de alimentación ocurren cambios en la arquitectura de la pared celular, producto de la sobre-

expresión de genes que codifican para enzimas como las endoglucanasas y poligalacturonasas las cuales degradan paredes celulares (Williamson y Gleason, 2003). La represión de genes que podrían interferir con el establecimiento exitoso del nematodo ha sido consignada. Caillaud *et al.*, (2008) mencionan que de los genes involucrados en defensa en *Arabidopsis thaliana*, el 70% de ellos fueron reprimidos localmente por *M. incognita*. Las enzimas corismato mutasas secretadas por los nematodos endoparásitos sedentarios, suprimen mecanismos de defensa al interferir con la síntesis de flavonoides, ácido salicílico y fitoalexinas (Caillaud *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2010). En *Globodera rostochiensis* la secreción de proteínas con dominio SPRY (SPRYSEC19) por la glándula esofágica dorsal, se asocia con la regulación de respuestas de defensa del hospedante (Sacco *et al.*, 2009). En sincitios inducidos por *Heterodera glycines* y *Heterodera schachtii*, las proteínas efectoras con dedos de zinc 10A06 secretadas por el nematodo, interaccionan con la espirmidina sintasa 2 generando un ambiente protector antioxidante (Hassan *et al.*, 2010). Nematodos como *Meloidogyne incognita* y *Globodera rostochiensis* producen peroxidorróxina codificada por los genes *prx*, proteína que elimina el peróxido de hidrógeno, y que los protege contra la explosión oxidativa generada por el hospedante (Dubreuil *et al.*, 2011).

Respuestas de defensa del chile “Criollo de Morelos 334” (CM334)

El genotipo de chile tipo serrano conocido como Criollo de Morelos 334 (CM334), destaca por su alto nivel de resistencia hacia una de las

enfermedades de mayor importancia en el cultivo de Chile, la “marchitez” inducida por *Phytophthora capsici*. CM334 es altamente resistente a aislamientos del oomiceto de diferentes partes del mundo (Gil-Ortega *et al.*, 1991; Glosier *et al.*, 2007) y a otros patógenos como los potyvirus: *Pepper mottle virus* (PepMoV) y varios aislamientos del *Potato virus Y* (PVY) (Janzac *et al.*, 2009), *Ecuadorian rocoto virus* (ERV) y el *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Dogimont *et al.*, 1996; Janzac *et al.*, 2009). La resistencia de CM334 a las tres especies de nematodos fitoparásitos agalladores más importantes *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica* también ha sido consignada (Pegard *et al.*, 2005).

La resistencia hacia el oomiceto *P. capsici* se manifiesta a nivel de raíz, tallo y follaje como una RH (Fernández-Pavía, 1997; Ueeda *et al.*, 2006), asociada con una serie de cambios en la expresión de genes involucrados en defensa (Silvar *et al.*, 2008), como aquellos responsables de la síntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas incluyendo al capsidiol (Zavala-Páramo *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2003; Silvar *et al.*, 2008). Los genes clave para la síntesis del capsidiol son: *EAS* que codifica para la enzima 5-*epi*-aristolóqueno sintasa (Zavala-Páramo *et al.*, 2000), *HMG2* para 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A reductasa (Ha *et al.*, 2003), y *SC* para sesquiterpeno ciclasa (Silvar *et al.*, 2008). Otros genes que también se sobre-expresan son los que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) como: *PR-1* (proteína relacionada con patogénesis 1), *POX* que codifica para peroxidasas, y *GLU* para β -1, 3-glucanasas (Silvar *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012); y aquellos involucrados en las rutas de

señalización como el óxido nítrico (Requena *et al.*, 2005), ácido salicílico (Ueeda *et al.*, 2006) y el gen *OPR-3* que codifica para la 12-oxofitodienoato reductasa que se asocia con la biosíntesis del ácido jasmónico (Ueeda *et al.*, 2006). Además del capsidiol, en respuesta al ataque por el oomiceto también se acumulan otros compuestos con propiedades antimicrobianas como el ácido trans-cinámico (Candela *et al.*, 1995).

La resistencia del chile CM334 a virus también implica una reacción de hipersensibilidad, la cual inhibe o imposibilita la replicación del virus, la resistencia esta conferida por la presencia del gen dominante *Pvr4*. Del mismo modo, su resistencia a nematodos se debe a una RH asociada con el gen *Me7* (Pegard *et al.*, 2005). En particular la resistencia de CM334 a *Meloidogyne* spp involucra la sobre-expresión de genes que codifican para los factores de transcripción *WRKY2* y *WRKY-a*, así como una marcada acumulación de ácido clorogénico (Pegard *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008).

Respuestas de defensa inducidas por *N. aberrans* en chile CM334.

Dentro de los cambios que *N. aberrans* induce en la planta está la modificación en los niveles de transcritos de genes relacionados con defensa, los cuales se reprimen, como es el caso de los genes *EAS*, *POX*, *GLU* y *PR-1* (interacción compatible), en contraste en plantas inoculadas con *P. capsici* (interacción incompatible) estos genes se sobre-expresan (Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Villar-Luna *et al.*, (2009) observaron que la RH se retrasó en plantas de chile CM334 inoculadas con *N. aberrans*. La reprogramación génica que el nematodo

induce provoca importantes cambios en los mecanismos de defensa de la planta reduciendo la actividad de las peroxidasas (Fernández-Herrera *et al.*, 2012), el contenido de capsidiol (Godínez-Vidal *et al.*, 2010), el contenido de fenoles solubles totales y la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) (López-Martínez *et al.*, 2011) en comparación con plantas inoculadas únicamente con *P. capsici*.

Recientemente se evidenció que CM334 es susceptible al nematodo agallador *Meloidogyne enterolobii* (Villar-Luna, 2013), el cual induce una reprogramación génica similar a la inducida por *N. aberrans* para abatir los mecanismos de defensa. En plantas CM334 inoculadas con *N. aberrans* o con *M. enterolobii*, los niveles de transcritos de los genes de la ruta mevalónica (*HMG2*, *HMG3*, *EAS* y *SS*) y la acumulación de capsidiol fueron significativamente reducidos, en comparación con aquellas inoculadas con el oomiceto (Godínez-Vidal *et al.*, 2010; Villar-Luna, 2013). Godínez-Vidal *et al.*, (2010) demostraron que el capsidiol es tóxico para los J₂ de *N. aberrans*.

Todos estos antecedentes demuestran que tanto *N. aberrans* como *M. enterolobii* abaten los mecanismos de defensa de la planta, lo cual les permite establecerse y completar su ciclo de vida exitosamente (Godínez-Vidal *et al.*, 2010; López-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Herrera *et al.*, 2012; Villar-Luna, 2013).

Biosíntesis de isoprenoides (Ruta Mevalónica)

Los isoprenoides, son un grupo de metabolitos secundarios con una gran diversidad estructural y funcional, siendo las plantas los organismos que presentan la mayor variedad (Rodríguez-Concepción, 2014). Estos metabolitos se dividen en metabolitos primarios y secundarios; dentro de los primeros se ubican a los esteroides, carotenoides, reguladores del crecimiento, quinonas y proteínas, entre otros, y en los secundarios aquellos que juegan un papel muy importante en la defensa de las plantas e incluyen a los monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}) y triterpenos (C_{30}) (Chappell, 1995; Kirby y Keasling, 2009). A pesar de la gran diversidad estructural y funcional que presentan, todos los isoprenoides se derivan a partir de dos bloques de construcción de cinco carbonos (C_5) conocidos como unidades isoprénicas, el pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) (Rodríguez-Concepción, 2014). Estos precursores pueden ser producidos por dos rutas diferentes, la del mevalonato (MVA) que tiene lugar en el citosol y la del 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulosa (DXP) que se localiza en los plastidios (Kirby y Keasling, 2009).

Para la síntesis de isoprenoides en el citosol (vía mevalónica) la biosíntesis inicia cuando dos moléculas de Acetil CoA reaccionan para formar acetoacetyl-CoA, posteriormente por adición de una tercer molécula de acetil CoA se da la formación de β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) catalizada por la HMG-CoA sintasa. Enseguida, el grupo carboxilo esterificado de HMG-CoA es reducido por dos moléculas de NADPH a un grupo hidroxilo, así el mevalonato

se sintetiza en una reacción irreversible catalizada por la HMG-CoA reductasa (Heldt y Piechulla, 2011); éste tiene tres fosforilaciones sucesivas, las primeras dos son directas y ocurren por reacciones de sustitución nucleofílica en el fósforo terminal del ATP, de esta forma el mevalonato es convertido a fosfomevalonato en una reacción catalizada por la mevalonato cinasa (MK), posteriormente el fosfomevalonato reacciona con un segundo ATP para generar difosfomevalonato, reacción catalizada por la fosfomevalonato quinasa (PMK) y a continuación la mevalonato difosfato descarboxilasa (MDD) cataliza la descarboxilación del difosfomevalonato para dar lugar a la formación del pirofosfato de isopentenilo (IPP). En seguida el IPP es isomerizado a pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP) mediante reacción catalizada por la isopentenil pirofosfato isomerasa (IPPI); después, se da la condensación del IPP y DMAPP para formar pirofosfato de geranilo (GPP) (C₁₀), reacción catalizada por la geranil pirofosfato sintasa (GPPS), enseguida por acción de la farnesil pirofosfato sintasa (FPPS) ocurre la adición de una molécula de IPP al GPP para dar lugar a la formación del pirofosfato de farnesilo (FPP), que es el precursor principal para la formación de esteroides, triterpenos y sesquiterpenos (Miziorko, 2011; Heldt y Piechulla, 2011).

Los esteroides son de suma importancia en las células vegetales, ya que forman parte de los componentes básicos de la membrana celular, además regulan la fluidez y permeabilidad de ésta (Dufoure, 2008). En las plantas los más comunes son el sitosterol, campesterol y estigmasterol (Benveniste, 2004).

La biosíntesis de los esteroides parte de la condensación de dos moléculas de pirofosfato de farnesilo (FPP) para formar escualeno, dicha reacción es catalizada por la escualeno sintasa (SS), considerada como la enzima clave en la regulación de la biosíntesis de esteroides (Busquets *et al.*, 2008). Posteriormente otra enzima conocida como escualeno epoxidasa (SE) cataliza la oxidación del escualeno a 2, 3-oxidoescualeno, para finalmente, después de una ciclización, convertirse en cicloartenol por acción de la cicloartenol sintasa (CAS) (Bouvier *et al.*, 2005; Suzuki y Muranaka, 2007). El metabolismo del cicloartenol conduce a la síntesis de los fitoesteroides, principalmente el β -sitosterol, estigmasterol y campesterol (Arnqvist *et al.*, 2003). La acumulación de campesterol y β -sitosterol es determinada por la actividad de las esteroil metil transferasas 1 y 2 (SMT1 y SMT2), la primera cataliza la metilación del cicloartenol para formar 24-metil-cicloartenol, que después de una serie de modificaciones es convertido en 24-metil lofenol, pasando a 24-metil colesterol, precursor inmediato del campesterol. La SMT2 es la responsable de la metilación de 24-metil lofenol generando 24-etiliden lofenol, que será canalizado a la formación de β -sitosterol, a partir del cual se deriva el estigmasterol (Benveniste, 2004).

La biosíntesis de la fitoalexina sesquiterpénica capsidiol está regulada principalmente por la enzima 5-epiaristoliqueno sintasa (EAS) (Fig. 1), que cataliza la ciclización del difosfato de farnesilo (FPP) para formar el intermediario bicíclico 5-epiaristoliqueno (EA), que es regio- y estereo-específicamente hidroxilado en los carbonos 1 y 3 por una segunda enzima la

epi-aristoloxeno dihidroxilasa (EAH) para dar lugar a la formación de capsidiol (Takahashi *et al.*, 2005).

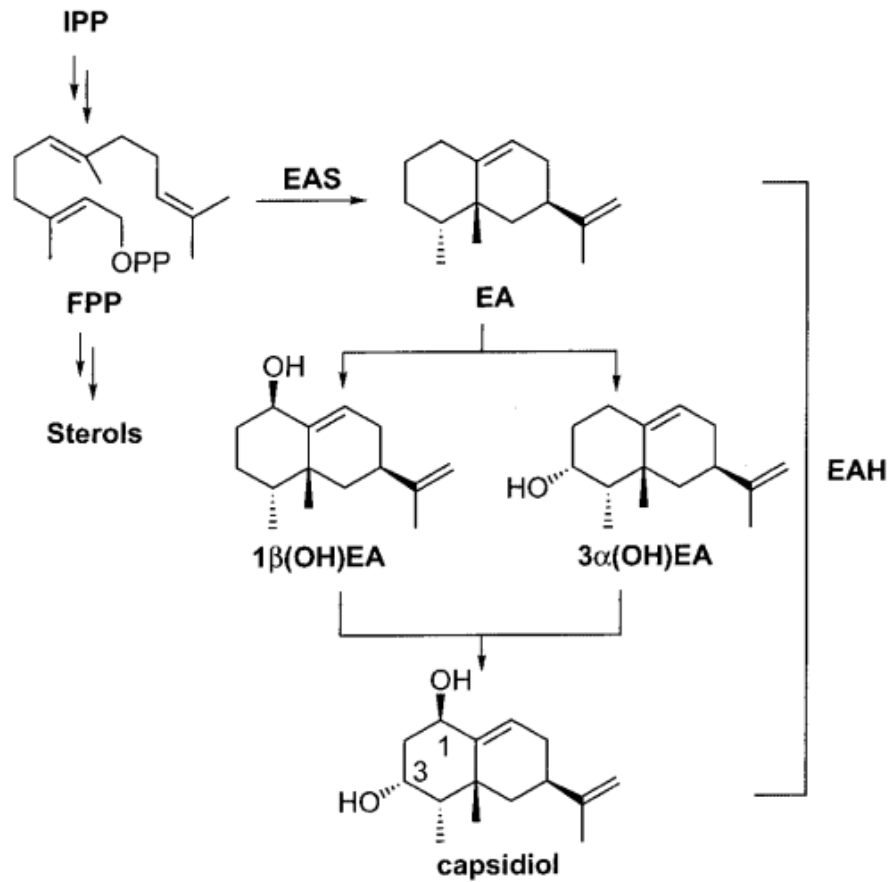


Fig. 1. Ruta biosintética de capsidiol en tabaco. Pirofosfato de isopentilo (IPP), difosfato de farnesilo (FPP), pirofosfato (OPP), 5-epiaristoloxeno sintasa (EAS), epiaristoloxeno (EA), 5-epiaristoloxeno dihidroxilasa (EAH).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Semillas de chile “tipo serrano” CM334, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (1% p/v), y se germinaron a $28\pm 1^\circ\text{C}$. Las plántulas se trasplantaron en macetas conteniendo 25 mL de arena estéril (una plántula por maceta) y se mantuvieron en cámaras de crecimiento a $26\pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 14 h a una intensidad luminosa de 6768 lux (luz fluorescente) y 10 h de oscuridad. Los riegos se realizaron cada 24 h con agua estéril y semanalmente se fertilizó aplicando una solución nutritiva (3.15 g de Nitrofoska® 12-12-12 disuelto en un litro de agua estéril).

Inoculación con *N. aberrans* y con *M. incognita*. El inóculo se obtuvo de raíces agalladas de jitomate (*Solanum lycopersicum*). La extracción de huevecillos se efectuó según Vrain (1977) y para la obtención del inóculo (juveniles del segundo estadio, J₂) los huevecillos se incubaron a $28\pm 1^\circ\text{C}$ en cajas Petri conteniendo agua destilada estéril. Cuando las plantas presentaron entre cuatro y cinco hojas verdaderas, se inocularon con una suspensión de 500 J₂ por planta del nematodo correspondiente.

Establecimiento del experimento. El experimento constó de tres tratamientos: 1) plantas de CM334 inoculadas con *N. aberrans*, 2) plantas de CM334 inoculadas con *M. incognita* y 3) plantas de CM334 sin nematodo (Testigo), para cada tratamiento se establecieron 48 plantas. A los 2, 7 y 21 días

posteriores a la inoculación (dpi) se tomaron 12 plantas/tratamiento/tiempo para evaluar la expresión génica; y 12 plantas/tratamiento a los 7 dpi para determinar el contenido de capsidiol. Se separó la raíz, se congeló con N₂ líquido y se mantuvo a -80° C hasta su utilización. El experimento se repitió una vez más.

En los tratamientos que involucraron nematodos se incluyeron plantas adicionales para verificar la invasión de raíces a los 2, 7 y 21 dpi (4 plantas/tiempo), las raíces se tiñeron por el método hipoclorito de sodio-fucsina acida (Bybd *et al.*, 1983). El número de individuos por raíz se contabilizó bajo un microscopio óptico.

Extracción de RNA total y síntesis de cDNA. El RNA total de raíces de CM334 se extrajo utilizando el RNeasy® Plant mini kit (Qiagen), de acuerdo al protocolo del fabricante y en seguida se mantuvo bajo una digestión con DNasa (Qiagen). La pureza e integridad del RNA se verificó por espectrofotometría (ND-1000, Nanodrop Technologies) y por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante a 1.2%, respectivamente. La síntesis de cDNA se desarrolló a partir de 2 µg de RNA total utilizando oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen) y la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Promega). Dos µg de RNA total se mezclaron con 0.5 µl de oligo dT₁₂₋₁₈ aforando a un volumen de 12 µl con agua libre de RNasas y DNasas y la mezcla se incubó a 65°C por 10 min; a esta reacción se le adicionaron 8 µl de una segunda mezcla, que contenía 6 µl de buffer 5x para retrotranscripción, 1 µl de dNTP mix (10 mM) y 1 µl de la retrotranscriptasa. La

mezcla resultante se incubó en un termociclador (TC-3000 Techne) durante 60 min a 37 °C y 10 min a 70 °C. El cDNA generado se utilizó para medir los niveles de expresión génica relativa, mediante PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real. La PCR cuantitativa se desarrolló en un sistema ABI7500 (Applied Biosystems). La mezcla de reacción de un volumen final de 25 μ L, consistió de buffer 10X, MgCl₂ 1.5 mM, de cada oligonucleótido 0.4 μ M, de dNTPs 0.2 mM, amplificasa (Biotecmol), SYBR Green I (1:75000) (Molecular Probes, Eugene, OR) como fluoróforo, fluoresceína 10 nM como referencia pasiva, y 2 μ L de cDNA. Las características de los oligonucleótidos utilizados se muestran en el Cuadro 1.

Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 95° C por 4 min, seguida de 35 ciclos a 95° C por 15 s, alineamiento a 60° C (55°C para *WRKY- α*) por 35 s, y extensión a 72° C por 35 s. Los datos se colectaron durante el paso de extensión. Adicionalmente se incluyó una curva de disociación para descartar la formación de productos inespecíficos. La expresión relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen y Livak, 2008), utilizando como referencia interna el gen que codifica para 3-fosfato Gliceraldehido deshidrogenasa (*GAPDH*) para normalizar la expresión del gen de interés, y las plantas testigo para calibrar los niveles de expresión. Los niveles de transcritos del gen de interés se expresaron en número de “veces” en respuesta al tratamiento y en relación al nivel basal de transcritos en las plantas testigo (1X).

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados.

Proteína	Gen	Número de acceso [†]	‡Oligonucleótido		Producto de PCR (pb)
			Secuencia (5' → 3')		
GAPDH	<i>GAPDH</i>	AJ246011	‡Fw	GGCCTTATGACTACAGTTCCTCC	217
			Rv	GATCAACCACAGAGACATCCACAG	
EAS	<i>EAS</i>	AJ005588	‡Fw	GCTCAAGAAATTGAACCGCCGAAG	200
			Rv	TCTTCATTATAGACATCGCCCTCG	
WRKY-a	<i>WRKY-a</i>	AY391747	‡Fw	CATTACCGTCAACCATCTCA	377
			Rv	TCAACATCCTCATCTCCAAA	
HMG2	<i>HMG2</i>	AF110383	‡Fw	ATTACCTTCAGAATGAATACGCT	316
			Rv	CTCTCTATGTTTTGTGCTGGGT	
POX	<i>POX</i>	AF442386	‡Fw	CCAGTACGTGCCCAAGAGCTG	560
			Rv	GGATGCGTCGATTGAAGGGTC	
PR-1	<i>PR-1</i>	AF053343	ΔFw	GTTGTGCTAGGGTTCGGTG	301
			Rv	CAAGCAATTATTTAAACGATCCA	

[†]NCBI (National Center for Biotechnology Information); GAPDH: 3-fosfato gliceraldehido deshidrogenasa; EAS: 5-epiaristoloxeno sintasa. HMGR: hidroximetilglutaril-CoA reductasa. POX: peroxidasa. PR-1: proteína relacionada con patogénesis 1. [‡]Diseñados por nuestro grupo de trabajo. ^ΔGayoso *et al.*, (2007).

Extracción y cuantificación del contenido de capsidiol. La extracción se efectuó a partir de 1 g de tejido de raíces de plantas de CM334, siguiendo la metodología descrita por Egea *et al.*, (1996). El tejido se maceró en un mortero conteniendo N₂ líquido, el macerado se transfirió a tubos de vidrio y se le agregó una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH (2:1). Cada extracto se filtró y evaporó a sequedad a temperatura ambiente, posteriormente se disolvió con la mezcla antes mencionada para separar las fracciones mediante cromatografía en capa delgada (placas cromatográficas de sílica gel 60 F₂₅₄, Merck®) utilizando una mezcla de hexano:acetato de etilo (1:6). Para cada tratamiento, las muestras se

cromatografiaron en banda y eluyeron conjuntamente con una muestra de capsidiol puro extraído y purificado por nuestro grupo de trabajo. Se recortó la porción correspondiente al estándar, la cual se reveló con una disolución de sulfato cérico amoniacal 2N en H₂SO₄ y se confrontó físicamente con la porción eluída y no revelada de cada tratamiento. Las regiones correspondientes al R_f=0.28 característico del capsidiol se rasparon, se extrajeron con CH₂CL₂, filtraron y evaporaron a sequedad. Las determinaciones del contenido de capsidiol se efectuaron siguiendo la metodología descrita por Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria (1996) con algunas modificaciones. Las muestras se redisolviéron en metanol, preparándose una mezcla de reacción en la proporción 1:1, extracto:vainillina al 2% en ácido sulfúrico. Las muestras tratadas se incubaron por 1h a temperatura ambiente y se cuantificaron por espectrofotometría (ND-1000, Nanodrop Technologies) a una longitud de onda de 640 nm, utilizando una curva de calibración previamente elaborada con capsidiol puro. Los datos obtenidos se expresaron en µg g⁻¹ de tejido fresco de raíz.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos de todas las variables evaluadas se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a un análisis de comparación de medias con el método de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

IV. RESULTADOS

Infección de raíces de chile CM334 por *N. aberrans* y por *M. incognita*. En todos los tiempos posteriores a la inoculación se encontró que el porcentaje de individuos que penetraron las raíces de CM334 siempre fue mayor para *N. aberrans* (30.9-57.9 %) en comparación con *M. incognita* (0.1-10 %) (Fig. 2). A los 21 dpi, en raíces infectadas por *N. aberrans*, se observaron nematodos con la forma de “C” o de espiral (Fig. 3 c), típica de los juveniles del tercer estadio (J₃). La mayor invasión de raíces por J₂ de *M. incognita* se registró a los 2 dpi (50.5 J, 10.1%) y a los 7 y 21 dpi el número de individuos descendió a 10.5 (2.1%) y 0.5 (0.1%) individuos por planta (Fig.2).

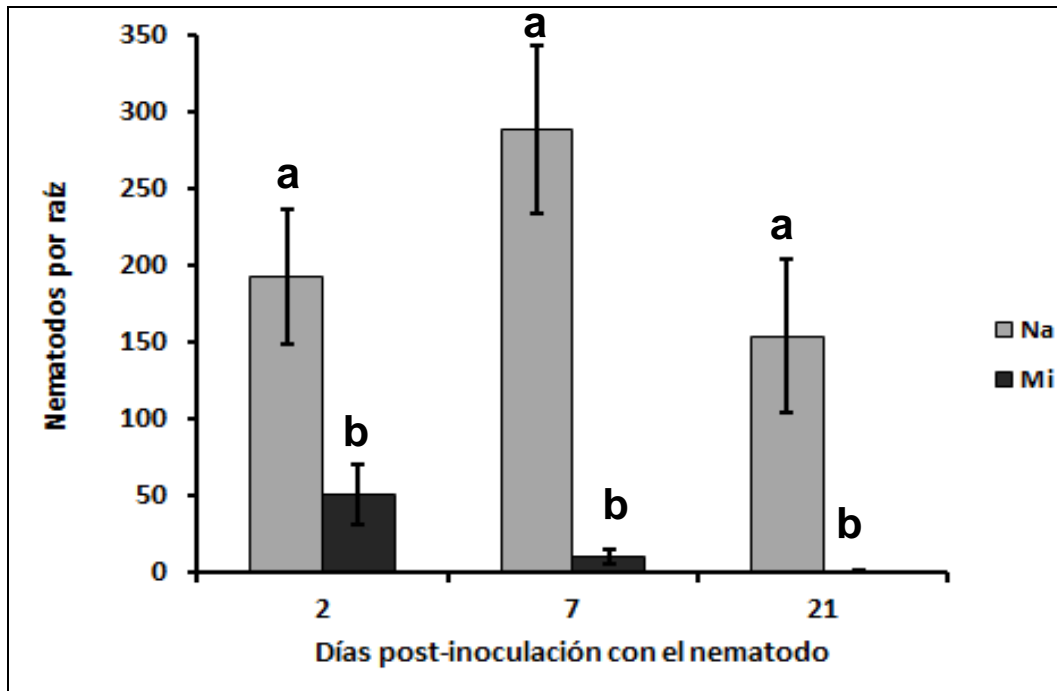


Fig. 2. Número de nematodos que ingresaron en raíces de chile CM334. Na, *Nacobus aberrans*; Mi, *Meloidogyne incognita*. Cada barra representa el promedio de cuatro raíces analizadas y la línea en cada barra la desviación estándar. El experimento se repitió una vez.

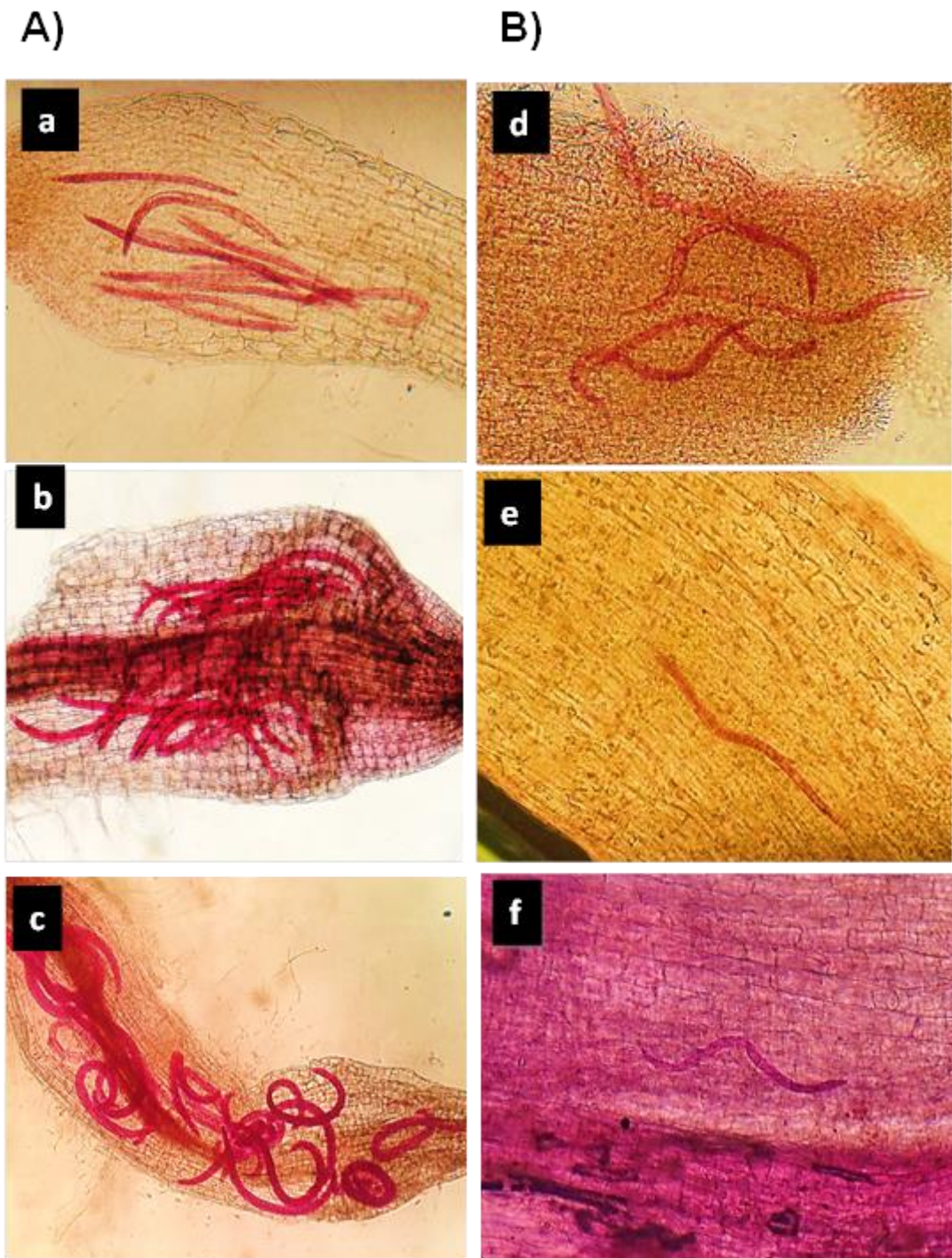


Fig. 3. A) *Nacobbus aberrans*. **B)** *Meloidogyne incognita*. Invasión de raíces de chile CM334 a 2 días posteriores a la inoculación (dpi) **(a)** y **(d)**; 7 dpi; **(b)** y **(e)** y 21 dpi **(c)** y **(f)**.

Acumulación de transcritos en raíces de plantas CM334 infectadas por nematodos agalladores. En las dos interacciones y a los tres tiempos posteriores a la inoculación, todos los genes se sobre-expresaron en las raíces de las plantas de chile CM334 (Fig. 4); sin embargo, la sobre-expresión invariablemente fue mayor en las raíces de plantas inoculadas con *M. incognita*, aunque las diferencias entre la interacción compatible (CM334-Na) y la incompatible (CM334-Mi), no siempre fueron significativas ($P \leq 0.05$).

Para ambos nematodos la mayor acumulación de los genes *EAS* y *HMG2* se registró a los 7 dpi, siendo significativamente mayor en la interacción incompatible; el incremento de *EAS* fue de 5.03 y 7.14 veces y el de *HMG2* de 2.02 y 3.20 veces en los tratamientos CM334-Na y CM334-Mi, respectivamente. El gen *WRKY-a* presentó los niveles de acumulación más altos a los 2 dpi en ambos tratamientos (CM334-Na 1.85 y CM334-Mi 2.95 veces) y el incremento también fue significativamente mayor en la interacción incompatible; a los 7 y 21 dpi las diferencias entre tratamientos no fueron significativas.

Los incrementos en los niveles de transcritos del gen *PR-1* en la interacción incompatible (CM334-Mi) fueron muy similares en los tres tiempos evaluados (2.39, 2.32 y 2.08 veces a los 2, 7 y 21 dpi, respectivamente) y fueron significativamente diferentes a los de CM334-Na (1.63 veces) sólo a los 7 dpi, para los días 2 y 21 no hubo diferencias significativas (1.39 y 1.73 veces). La sobreexpresión del gen *POX* en CM334-Mi (2.82, 2.28 y 2.27 veces) a los 2, 7 y 21 dpi, fue significativamente mayor que en CM334-Na (1.73, 1.75 y 1.66, respectivamente) en los tres tiempos evaluados. La mayor acumulación de

transcritos se registró a los 2 dpi en la interacción incompatible, mientras que en la compatible (tratamiento CM334-Na) los niveles fueron muy parecidos en los tres tiempos.

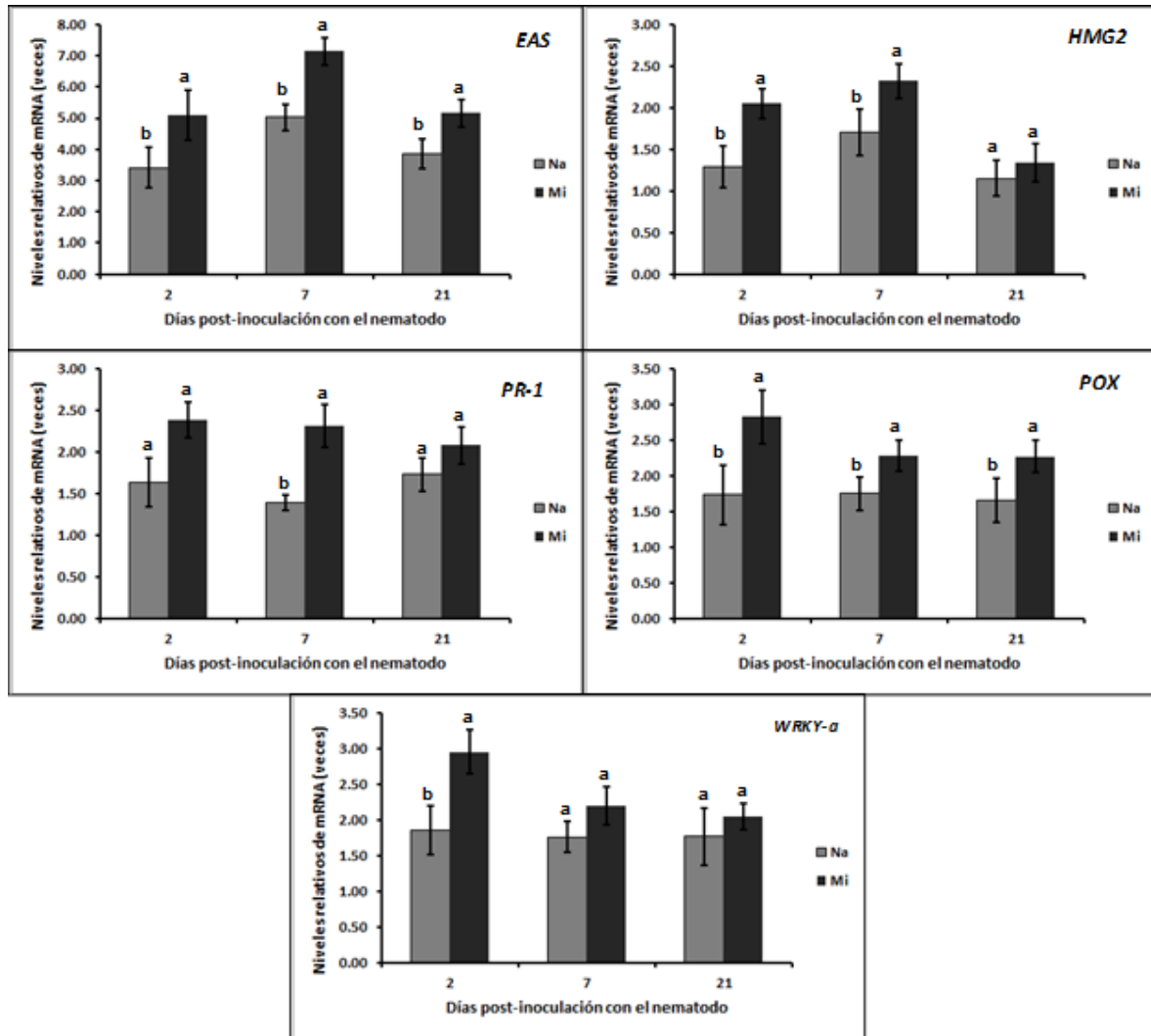


Fig. 4. Niveles relativos de transcritos de los genes *EAS*, *HMG2*, *PR-1*, *POX* y *WRKY-a* en raíces de chile CM334 resistente a *Meloidogyne incognita*. Na: inoculadas con *Nacobbus aberrans*; Mi: inoculadas con *M. incognita*. Cada barra representa el promedio de tres réplicas y la línea en cada barra la desviación estándar. Los niveles de transcritos se expresaron como cambios en veces en respuesta al tratamiento con relación al nivel basal de transcritos en las plantas testigo (1x) y se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008), utilizando como referencia interna el gen que codifica para 3-fosfato Glicereraldehído deshidrogenasa (*GAPDH*) para normalizar la expresión, y las plantas testigo para calibrar los niveles de expresión del gen de interés. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$). El experimento se repitió una vez.

Acumulación de capsidiol en raíces de plantas CM334 inoculadas con nematodos agalladores. En la interacción incompatible el contenido de capsidiol fue mayor ($2.73 \mu\text{g g}^{-1}$ de tejido fresco de raíz), en comparación al encontrado en la interacción compatible ($1.97 \mu\text{g g}^{-1}$ de tejido fresco de raíz) (Cuadro 2). Las diferencias en el contenido de la fitoalexina fueron significativas ($P \leq 0.05$).

Cuadro 2. Acumulación de capsidiol en raíces de plantas de Chile CM334 resistentes a *Meloidogyne incognita*. Control: sin nematodo; *Na*: inoculadas con *Nacobbus aberrans*; *Mi*: inoculadas con *M. incognita*. A 7 dpi con el nematodo.

Tratamiento	Capsidiol ($\mu\text{g g}^{-1}$ de raíz)
Control	$1.90 \pm 0.10^{\text{b}}$
<i>Na</i>	$1.97 \pm 0.26^{\text{b}}$
<i>Mi</i>	$2.73 \pm 0.29^{\text{a}}$

Cada valor representa el promedio de tres extracciones, valores con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). El experimento se repitió una vez.

V. DISCUSIÓN

El genotipo de chile CM334 es resistente a las tres principales especies de nematodos agalladores (*Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*) y su resistencia se manifiesta como una reacción de hipersensibilidad asociada con incrementos en los niveles de ácido clorogénico (Pegard *et al.*, 2005). Sin embargo, CM334 es susceptible al nematodo falso agallador *Nacobbus aberrans* y en plantas infectadas por este nematodo se han reportado niveles reducidos de ácido clorogénico, en comparación con las inoculadas con *M. incognita* (López-Martínez, *et al.*, 2011). En la presente investigación, los máximos niveles de expresión de los genes de defensa *EAS*, *HMG2*, *WRKY-α*, *PR-1* y *POX*, y se registraron en raíces de CM334 inoculadas con *M. incognita* (interacción incompatible), en comparación con las inoculadas con *N. aberrans* (interacción compatible).

En *C. annuum* los genes *EAS* y *HMG2*, codifican para las enzimas 5-epi aristoloqueno sintasa e hidroximetilglutaril-CoA reductasa 2, respectivamente, implicadas en la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas como el capsidiol (Zavala-Páramo *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2003). La mayor sobre-expresión de estos genes en la interacción incompatible (CM334-*Mi*) estuvo asociada con un mayor incremento en la acumulación de capsidiol, lo cual contrastó con los cambios registrados en la interacción compatible (CM334-*Na*), donde los niveles de expresión y el contenido de la fitoalexina fueron bajos. El efecto tóxico de esta fitoalexina sobre juveniles del segundo estadio de *N. aberrans* fue demostrado

por Godínez-Vidal *et al.* (2010). En interacciones incompatibles chile-*P. capsici*, los incrementos en el contenido de este metabolito se asocian frecuentemente con la resistencia (Egea *et al.*, 1996; Candela *et al.*, 2000). La sobre-expresión de *HMG2* ocurre cuando las plantas son atacadas por patógenos, así Ha *et al.* (2003) observaron la activación de este gen en plantas de *C. annuum* en respuesta al ataque por el oomiceto; de igual forma Villar-Luna, (2013) registró altos niveles de transcritos del gen *EAS* en plantas de chile CM334 inoculadas con *P. capsici*. Se tiene evidencia de que *N. aberrans* reduce la expresión de genes implicados en la defensa de la planta abatiendo y retrasando las respuestas de defensa, para proveerse de condiciones adecuadas que le permitan establecerse y completar su ciclo exitosamente (Fernández-Herrera *et al.*, 2012; Villar-Luna *et al.*, 2009; Godínez-Vidal *et al.*, 2013). Los niveles de expresión de los genes *EAS* y *HMG2* fueron reducidos en plantas de chile CM334 inoculadas con *N. aberrans* tanto a nivel local (Fernández-Herrera *et al.*, 2012) como sistémico (Villar-Luna, 2013).

En el presente trabajo los niveles de transcritos del gen *WRKY-a*, fueron significativamente mayores en la interacción incompatible (CM334-*Mi*), en comparación con la compatible (CM334-*Na*). Diversos miembros de la familia multigénica de factores de transcripción *WRKY*, asociados con defensa, se sobre-expresan en respuesta a patógenos. Se menciona que la sobre-expresión del gen *WRKY-a* se asoció con la respuesta de hipersensibilidad en plantas de *C. annuum* inoculadas con el *Tobacco mosaic virus* (TMV) y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Park *et al.*, 2006). También en la interacción

incompatible *C. annuum*/*M. incognita* los niveles de expresión de los genes *WRKY-a* y *WRKY2* se elevaron (Li *et al.*, 2008). En Chile CM334 la sobre-expresión de *WRKY-a* fue superior en la interacción incompatible CM334-*P. capsici* en comparación con la compatible CM334-*N. aberrans* (Villar-Luna, 2013).

En la interacción incompatible (CM334-*Mi*), la mayor sobre-expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis como *PR-1* y *POX* (peroxidasas) contrastó con los niveles inferiores registrados en raíces de plantas CM334 infectadas por *N. aberrans*. La implicación de estas proteínas en respuesta al ataque por patógenos está bien documentada (Van Loon *et al.*, 2005). Fernández-Herrera *et al.*, (2012) encontraron que en plantas de Chile CM334, los niveles de acumulación de transcritos del gen *POX* se incrementaron significativamente desde las 6 hpi con *P. capsici* dándose una mayor acumulación a las 48 hpi; esto podría contribuir a la restricción del patógeno durante la reacción de hipersensibilidad en raíces de CM334 (Fernández-Pavía, 1997), dado que las peroxidasas participan en el reforzamiento de paredes celulares (Passardi *et al.*, 2005). Además, las peroxidasas están involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos durante todo el ciclo de vida de la planta, debido posiblemente al elevado número de isoformas (isoenzimas) y a la versatilidad de las reacciones que catalizan. Están involucradas en el metabolismo de las auxinas, lignina, especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), así como en la formación de suberina y en la síntesis de fitoalexinas (Almagro *et al.*, 2009). En

interacciones incompatibles entre cultivares resistentes de Caupí (*Vigna unguiculata*) a *M. incognita*, se registraron niveles más elevados de actividad de peroxidasa en comparación con las compatibles (Oliveira *et al.*, 2012). De igual manera, en la interacción compatible CM334-*N. aberrans* los niveles de expresión de *POX* se redujeron (Villar-Luna, 2013).

Niveles bajos de transcritos de otros genes asociados con defensa también se han reportado en la interacción Chile CM334-*N. aberrans*. Fernández-Herrera *et al.*, (2012) encontró que en plantas CM334 inoculadas con este nematodo, los niveles de transcritos de los genes *GLU* y *PR-1* fueron más bajos, en comparación con las inoculadas con *P. capsici*. La sobre-expresión de *PR-1* se asocia con los mecanismos de defensa en Chile; por ejemplo la acumulación del gen *CABPR-1*, que codifica para una proteína PR-1, fue mayor en la interacción incompatible Chile cv. Hanbyul-*Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria* (aislamiento Bv5-4a), en comparación con la registrada en la interacción compatible Chile cv. Hanbyul-*X. campestris* pv. *vesicatoria* (aislamiento Ds1) (Kim y Hwang, 2000). La relación de PR1 con resistencia a nematodos fitoparásitos también se ha consignado; por ejemplo en plantas de tomate resistentes a *M. incognita*, se incrementó la expresión del gen *PR-1* cuando se inocularon con el nematodo (Molinari *et al.*, 2013). Todo lo anterior sugiere que la modulación de la expresión del gen *PR1* llevada a cabo por *N. aberrans* podría estar favoreciendo su establecimiento exitoso.

Los resultados obtenidos prueban que tanto en presencia de *N. aberrans* como de *M. incognita*, se incrementó la sobre-expresión de los diversos genes de

defensa evaluados y el contenido de capsidiol en plantas de chile CM334; sin embargo, los incrementos fueron mayores en la interacción incompatible (CM334-*M. incognita*). Los altos incrementos inducidos por *M. incognita*, se relacionaron con la restricción de su establecimiento y reproducción, como lo indica el hecho de que solamente el 0.1% de los juveniles se encontrara dentro de la raíz a los 21 días después de haber realizado la inoculación.

VI. LITERATURA CITADA

- Abad, P., and V. M. Williamson. 2010. Plant nematode interaction: a sophisticated dialogue. *Advances in Botanical Research*. 53:147-192.
- Abad, P., B. Favery, M. N. Rosso, and P. Castagnone-Sereno. 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*. 4:217-224.
- Abad, P., P. Castagnone-Sereno, M. N. Rosso, E. J. de Almeida, and B. Favery. 2009. Invasion, feeding and development. *In: Perry, R. N., M. Moens y J. L. Starr, (Eds.). Root-knot nematodes*. CAB International, Wallingford, UK. pp: 163-181.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology* 5th ed. Elsevier Academia Press. Oxford. 922 p.
- Almagro, L., L. G. Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. R. Barceló, and M. A. Pedreño. 2009. Class III peroxidases in plant defense reactions. *Journal of Experimental Botany*. 60:377-390.
- Antoniw, J. F., C. E. Ritter, W. S. Pierpointn, and L. C. Van Loon. 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology*. 47: 79-87.
- Arnqvist, L., P. C. Dutta, L. Jonsson, and F. Sitbon. 2003. Reduction of cholesterol and glycoalkaloid levels in transgenic patato plants by overexpression of a type 1 sterol methyltransferase cDNA. *Plant Physiology*. 131:1792-1799.

- Baicheva, O., D. Salkova, and G. Palazova. 2002. Root-knot nematodes (*Meloidogyne*, Goeldi, 1887) species composition, pathogenicity, some problems for investigation. *Experimental Pathology and Parasitology*. 5:21-24
- Baum, T. J., R. S. Hussey, and E. L. Davis. 2007. Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism. *In*: Setlow, J. K. (Ed). *Genetic Engineering* 28. Springer Science+Business. Media, LLC. pp: 17-43.
- Benhamou, N., J. Grenier, and A. Asselin. 1991. Immunogold localization of pathogenesis-related protein P14 in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 38:237-253.
- Benveniste, P. 2004. Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annual Review of Plant Biology*. 55: 429–57.
- Berg, R. H., T. Fester, and C. G. Taylor. 2009. Development of the root-knot nematode feeding cell. *In*: Berg, R. H., y C. G. Taylor (Eds.). *Cell biology of plant nematode parasitism*. Plant Cell Monographs. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp: 115-152.
- Bohlmann, J., E. J. Stauber, B. Krock, N. J. Oldham, J. Gershenzon and I. T. Baldwin. 2002. Gene expression of 5-*epi* aristolochene synthase and formation of capsidiol in roots of *Nicotiana attenuate* and *N. sylvestris*. *Phytochemistry*. 60:109-116.
- Bouvier, F., A. Rahier, and B. Camara. 2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in Lipid Research*. 44: 357–429.
- Brito, J. A., J. D. Stanley, R. Kaur, R. Cetintas, M. Di Vito, J. A. Thies, and D. W. Dickson. 2007. Effects of the *Mi-1*, *N* and *Tabasco* genes on infection

- and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. *Journal of Nematology*. 39:327-332.
- 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
- Bybd Jr, D. W., T. Kirkpatrick, and K. R. Barker 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*. 15:142.
- Caillaud, M. C., G. Dubreuil, M. Quentin, L. Perfus-Barbeoch, P. Lecomte, J. de A. 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., 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.
- Candela, M. E., M.D. Alcazar, A. Espin, C. Egea, and L. Almela. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*. 44:116-123.
- Cavalcanti, F. R., M. L. V. Resende, C. P. S. Carvalho, J. A. G. Silveira and J. T. A. Oliveira. 2006. Induced defense responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis pernicioso*. *Biological Control*. 39:408-417.
- Chappell, J. 1995. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. *Plant Physiology*. 107: 1-6.
- Chappell, J., C. VonLanken, and U. Vögeli. 1991. Elicitor-inducible 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity is required for

- sesquiterpene accumulation in tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiology*. 97: 693-698.
- 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.
- Choi, D., B. L. Ward, and R. M. 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.
- Clark, S. A. 1967. The development and life history of the false root-knot nematode, *Nacobbus serendipiticus*. *Nematologica*. 13:91-101.
- Croft, K. P. C., C. R. Voisey, and A. J. Slusarenko. 1990. Mechanism of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* L) inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 36:49-62.
- De Waele, D., and A. Elsen. 2007. Challenges in tropical nematology. *Annual Review of Phytopathology*. 45:457-485.
- Decraemer, W., and D. J. Hunt. 2013. Structure and classification *In*: Perry, R. N., y M. Moens (Eds.). *Plant nematology*. 2nd Edition. CAB International. Wallingford, UK. pp: 3-37.
- Dogimont, C., A. Palloix, A. M. Daubze, G. Marchoux, K. G. Selassie, and E. Pochard. 1996. Genetic analysis of broad spectrum resistance to potyviruses using doubled haploid lines of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica*. 88:231-239.
- Dubreuil, G., E. Deleury, M. Magliano, M. Jaouannet, P. Abad, and M. N. Rosso. 2011. Peroxiredoxins from the plant parasitic root-knot nematode,

- Meloidogyne incognita* are required for successful development within the host. *International Journal for Parasitology*. 41:385-396.
- Dufoure, E. J. 2008. Sterols and membrane dynamics. *Journal of Chemical Biology*. 1:63-77.
- Egea, C., D. García, and M. E. Candela. 1996. Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*. 49:762-764.
- Eulgem, T. 2005. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Science*. 10:71-78.
- Eulgem, T., and I. E. Somssich. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 10: 366-371.
- Fernández-Herrera, E., R. I. Rojas-Martínez, L. Guevara-Olvera, M.E. Rivas-Dávila, E. Valadez-Moctezuma, y E. Zavaleta-Mejía. 2012. Defensa en chile CM-334 inoculado con *phytophthora capsici* e infectado por *nacobbus aberrans*. *Nematropica*. 42:96-107.
- Fernández-Pavia, S. 1997. Host pathogen interaction in the root *Phytophthora capsici*-*Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph.D. Thesis. New Mexico State University. 109 p.
- Finetti, S. M. 1990. Histopathological changes induced by *Nacobbus aberrans* in resistant and susceptible potato roots. *Revue de Nematologie*. 13:155-160.
- Gayoso, C., de Ilárduya, O. M., Pomar, F., and F. M. de Cáceres. 2007. Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. *European Journal of Plant Pathology*. 118: 199-209.

- Gheysen, G. and C. Fenoll. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology*. 40:191-219.
- Gheysen, G., and M. G. Mitchum. 2009. Molecular insights in the susceptible plant response to nematode infection. *In: Berg, R. H., y C. G. Taylor (Eds.). Cell biology of plant nematode parasitism. Plant Cell Monographs. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp: 45-81.*
- Gil-Ortega, R., E. C. Palazon, and Z. J. Cuartero. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line "SCM-334". *Plant breeding*. 107:50-55.
- Glazebrook, J. 2001. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*-2001 status. *Current Opinion in Plant Biology*. 4: 301-308.
- Glosier, B. R., E. A. Ogundiwin, G. S. Sidhu, D. R. Sischo, and J. P. Prince. 2007. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiologica races of P. capsici of pepper. Euphytica*. 162:23-30.
- Godínez-Vidal D, M. Soto-Hernández, M. Rocha-Sosa, E. Lozoya-Gloria, R. I. Rojas-Martínez, L. Guevara Olvera, y E. Zavaleta-Mejía. 2010. Contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por *Nacobbus aberrans* y su efecto en juveniles del segundo estadio. *Nematropica*. 40:227-237.
- Godínez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, E. B. Sepulveda-Garcia, E. Lozoya-Gloria, R. I. Rojas-Martínez, L. Guevara-Olvera, and E. Zavaleta-Mejía. 2013. Transcript accumulation of the mevalonate pathway genes and enzymatic activity of HMGCoA-r and EAS in chilli CM-334 infected by the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. *Plant Soil*. 372:339-348.
- Grundler, F. M. W., M. Sobczak, and W. Golinowski. 1998. Formation of wall openings in root cells of *Arabidopsis thaliana* following infection by the

- plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *European Journal of Plant Pathology*. 104:545-551.
- Ha, S. H., J. B. Kim, Y. S. Hwang, and S. W. Lee. 2003. Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced *Hmg2* from pepper (*Capsicum annuum*). *Biochimica Biophysica Acta*. 1625:253-260.
- Hammond-Kosack, K. E., and J. D. Jones. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*. 8:1773-1791.
- Hassan, S., C. Behm, and U. Mathesius. 2010. Effectors of plant parasitic nematodes that reprogram root cell development. *Functional Plant Biology*. 37:933-942.
- Heldt, H. W. and B. Piechulla. 2011. *Plant biochemistry*. Academic Press Germany. 656 p.
- Jammes F, P. Lecomte, J. A. Engler, F. Bitton, M. L. Martin-Magniette, J. P. Renou, P. Abad, and B. Favery. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 44:447-458.
- Janzac, B., M. F. Fabre, A. Palloix, and B. Moury. 2009. Phenotype and spectrum of action of the *Pvr4* resistance in pepper against potyviruses, and selection for virulent variants. *Plant pathology*. 58:443-449.
- Jones, M. G. K., and D. B. Goto. 2011. Root-knot nematodes and giant cells. *In: Jones, J., G. Gheysen, C. Fenoll. (Eds.). Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer Dordrecht Heidelberg. pp: 83-100.
- Karssen, G., and M. Moens. 2013. Root-knot nematodes. *In: Perry, R. N., y M. Moens (Eds.). Plant nematology*. CAB International. Wallingford, UK. pp: 73-108.

- Kiewnick, S., G. Karssen, J. A. Brito, M. Oggenfuss, and J. E. Frey. 2008. First report of root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* on tomato and cucumber in Switzerland. *Plant Disease*. 92:1370-1370.
- Kiewnick, S., M. Dessimoz, and L. Franck. 2009. Effects of the *Mi-1*, and the *N* root-knot nematode resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. *Journal of Nematology*. 41: 134-139.
- Kim, Y. J., and B. K. Hwang. 2000. Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia plantarum*. 108:51-60.
- Kirby, J., and J. D. Keasling. 2009. Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annual Review of Plant Biology*. 60: 335-355.
- Kyndt, T., P. Vieira, G. Gheysen, and J. de Almeida-Engler. 2013. Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. *Planta*. 238: 807-818.
- Li, S. M., Z. C. Mao, L. Li, D. X. Feng, Y. H. Yang, and B. Y. Xie. 2008. Isolation of WRKY Genes in the Incompatible Interaction Between *Meloidogyne incognita* and *Capsicum annuum*. *Acta Horticulturae Sinica*. 10:1467-1472.
- López-Martínez N, M. T. Colinas-León, C. B. Peña-Valdivia, Y. Salinas-Moreno, P. Fuentes-Montiel, M. Biesaga, and E. Zavaleta-Mejía. 2011. Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM-334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant Soil*. 338:399-409.
- 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. *Nematopica*. 32:150-227.
- Mathooko, F. M. 1996. Regulation of ethylene biosynthesis in higher plants by carbon dioxide. *Postharvest Biology and Technology*. 7:1-26.
- McDowell, J. M., and B. J. Woffenden. 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *TRENDS in Biotechnology*. 21: 178-183.
- Melillo M. T., P. Leonetti, M. Bongiovanni, P. Castagnone-Sereno, and T. Blevè-Zacheo. 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. *New Phytologist*. 170:501–512.
- Miziorko, H. M. 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 505:131-143.
- Moens, M., R. N. Perry, and J. L. Starr. 2009. *Meloidogyne* species a diverse group of novel and important plant parasites. *In*: Perry, R. N., M. Moens y J. L. Starr, (Eds.). *Root-knot nematodes*. CAB International, Wallingford, UK. pp: 1-17.
- Molinari, S., E. Fanelli, and P. Leonetti. 2013. Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in *Mi-1*-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. *Molecular plant pathology*. 15:255-264.
- Niderman, T., I. Genetet, T. Bruyere, R. Gees, A. Stintzi, M. Legrand, and E. Mosinger. 1995. Pathogenesis related PR-1 proteins are antifungal isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology*. 108:17-27.

- Oliveira, J. T. A., N. C. Andrade, A. S. Martins-Miranda, A. A. Soares, D. M. F. Gondim, J. H. Araújo-Filho, F.R. Freire-Filho, and I. M. Vasconcelos. 2012. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot *Meloidogyne incognita*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 51:145-152.
- Pandey, S. P., and I. E. Somssich. 2009. The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant physiology*. 150:1648-1655.
- Park, C. J., Y. C. Shin, B. J. Lee, K. J. Kim, J. K. Kim, and K. H. Paek 2006. A hot pepper gene encoding WRKY transcription factor is induced during hypersensitive response to *Tobacco mosaic virus* and *Xanthomonas campestris*. *Planta*. 223:168-179.
- Passardi, F. C. Cosio, C. Penel, and C. Dunand. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*. 24:255-265.
- 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.
- Requena, M. E., C. Egea-Gilabert., and M. E., Candela. 2005. Nitric oxide generation during the interaction *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiologia Plantarum*. 124:50-60.
- Rodiuc, N., P. Vieira, M. Y. Banora, and J. de Almeida Engler. 2014. On the track of transfer cell formation by specialized plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Plant Science* 5:1-14
- Rodríguez-Concepción, M. 2014. *Plant Isoprenoids methods and protocols*. Humana Press. Barcelona, Spain. 297 p.

- Sacco, M. A., K. Koropacka, E. Grenier, M. J. Jaubert, A. Blanchard, A. Govere, G. Smant, and P. Moffett. 2009. The cyst nematode SPERYSEC protein RBP-1 elicits Gpa2- and RanGAP2-dependent plant cell death. *PLoS Pathogens*. 5:1-14.
- Sandoval-Luna, R. 2011. Actividad de PAL, acumulación de fenoles y flavonoides en chile CM-334 infectado por *Nacobbus aberrans* e inoculado en el follaje con *Phytophthora capsici*. Tesis de Doctorado en Ciencias Colegio de Postgraduados Montecillo, Edo. de México. 97 p.
- SAS Institute Inc. 2002. SAS Procedures Guide, Version 9.0 (Computer program). SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Sasser, J. N. 1980 Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease*. 64: 36-41.
- Schaller, F., C. Biesgen, C. Müssig, T. Altmann, and E. W. Weiler. 2000. 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta*. 210: 979-984.
- Schmittgen, T. D., and K. J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*. 3: 1101-1108.
- Scurrah, M. I., B. Niere, and J. Bridge. 2005. Nematode parasites of solanum, and sweet potatoes. *In*: Luc, M., R. A. Sikora, J. Bridge. (Eds). *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. CAB International, Wallingford, UK. pp: 193-219.
- Shah, J. 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 365-371.
- Sijmons, P. C., H. J. Atkinson, and U. Wyss. 1994. Parasitic strategies of Root nematodes and associated host cell responses. *Annual Review of Phytopathology*. 32:235-259.

- Sikora, R. A., and E. Fernández. 2005. Nematode parasites of vegetables. *In*: Luc, M., R. A. Sikora, J. Bridge. (Eds). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CAB International, Wallingford, UK. pp: 319-392.
- Silvar, C., F. Merino, and J. Díaz. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*. 165:1120-1124.
- Sobczak, M., and W. Golinowski. 2011. Cyst nematodes and syncytia *In*: Jones, J., G. Gheysen, C. Fenoll. (Eds.). Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Springer Dordrecht Heidelberg. Pp: 61-82.
- Sobczak, M., and W. Golinowski. 2009. Structure of cyst nematode feeding sites *In*: Berg, R. H., y C. G. Taylor. (Eds). Cell biology of plant nematode parasitism. Plant Cell Monographs. Springer-Dordrecht Heidelberg, Germany. pp: 153-187.
- Suzuki, M., and Muranaka T. 2007. Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis. *Lipids*. 42: 47-54.
- Takahashi, S., Zhao, Y., O'Maille, P. E., Greenhagen, B. T., Noel, J. P., Coates, R. M., and J. Chapell. 2005. Kinetic and molecular analysis of 5-epiaristolochene 1,3-dihydroxylase, a cytochrome P450 enzyme catalyzing successive hydroxylation of sesquiterpenes. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 3686-3696.
- 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.

- Turner, S. J., and J. A. Rowe. 2006. Cyst nematodes. *In*: Perry, R. N., y M. Moens (Eds.). *Plant nematology*. CAB International. Wallingford, UK. pp: 91-122.
- Ueeda, M., M. Kubota, and K. Nishi. 2006. Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 67:149-154.
- Van Loon, L. C., M. Rep, and C. M. J. Pieterse. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*. 44:135-162
- Vargas, E., E. Zavaleta-Mejia, and A. Hernández. 1996. Rompimiento de Resistencia a *Phytophthora capsici* Leo. En Chile (*Capsicum annuum* L.) serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen. *Nematropica*. 26:159-166.
- Villar-Luna, E. 2013. Transcritos de genes de defensa acumulados en Chile CM334 infectado por *Nacobbus aberrans* o por *Meloidogyne enterolobii* e inoculado con *Phytophthora capsici*. Tesis de Doctorado en Ciencias Colegio de Postgraduados Montecillo, Edo. de México. 118 p.
- Villar-Luna, E., B. Reyes-Trejo, R. I. Rojas-Martínez, O. Gómez-Rodríguez, A.M. Hernández-Anguiano, and E. Zavaleta-Mejía. 2009. Respuesta hipersensitiva en el follaje de Chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*. 39:143-155.
- Vrain, T. C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. *Journal of Nematology*. 9: 249.
- Weissenborn, D. L., C. J. Denbow, M. Laine, S. S. Lång, Z. Yang, X. Yu, and C. L. Cramer. 1995. HMG-GoA reductase and terpenoid phytoalexins: Molecular specialization within a complex pathway. *Physiologia Plantarum*. 93:393-400.

Williamson, V. M., and C. A. Gleason. 2003. Plant-nematode interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 327-333.

Zavala-Páramo, G., M. P. Chávez-Moctezuma, E. García-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.