



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**  
**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**TRANSCRITOS DE GENES DE DEFENSA ACUMULADOS EN  
CHILE CM334 INFECTADO POR *Nacobbus aberrans* O POR  
*Meloidogyne enterolobii* E INOCULADO CON *Phytophthora  
capsici***

**EDGAR VILLAR LUNA**

**T E S I S**

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

**DOCTOR EN CIENCIAS**

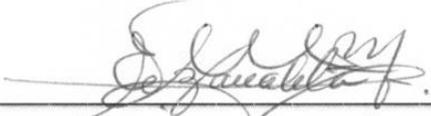
**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2013**

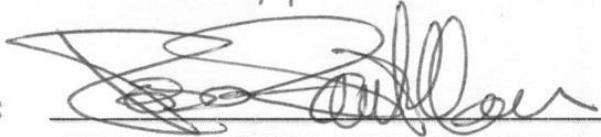
La presente tesis, titulada: **TRANSCRITOS DE GENES DE DEFENSA ACUMULADOS EN CHILE CM334 INFECTADO POR *Nacobbus aberrans* O POR *Meloidogyne enterolobii* E INOCULADO CON *Phytophthora capsici***, realizada por el alumno: **Edgar Villar Luna**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

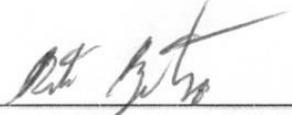
**DOCTOR EN CIENCIAS  
FITOSANIDAD-FITOPATOLOGIA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERA:   
DRA. EMMA ZAVALETA MEJÍA

ASESORA:   
DRA. REYNA ISABEL ROJAS MARTÍNEZ

ASESORA:   
DRA. ROSA LUISA SANTILLAN BACA

ASESOR:   
DR. BENITO REYES TREJO

ASESOR:   
DR. DANIEL L. OCHOA MARTÍNEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2013.

# TRANSCRITOS DE GENES DE DEFENSA ACUMULADOS EN CHILE CM334 INFECTADO POR *Nacobbus aberrans* O POR *Meloidogyne enterolobii* E INOCULADO CON *Phytophthora capsici*

Edgar Villar Luna, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2013

El chile CM334 es resistente al oomiceto *Phytophthora capsici* (*Pc*) y a los nematodos *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*, pero susceptible a *M. enterolobii* (*Me*) y *Nacobbus aberrans* (*Na*). La resistencia de *Capsicum annuum* a *Pc* se asocia con la acumulación de la fitoalexina sesquiterpenica capsidiol y con la sobre-expresión de varios genes de defensa. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) conocer las modificaciones que *Na* y *Me* inducen en la expresión de algunos genes de la ruta mevalónica (*HMG2*, *EAS*, *HMG3*, y *SS*) en plantas CM334 infectadas por *Na* (*NaPc*) o *Me* (*MPc*) e inoculadas con *Pc* (*Pc*); 2) determinar la relación entre los niveles de *HMG2* y *EAS* en raíces de CM334 inoculadas sólo con *Na* (*N*), con *Pc* (*Pc*) y con ambos patógenos (*NPc*); y 3) evaluar los niveles de transcritos de *WRKY-a*, *WRKY1*, *POX*, *PR-1* y *EAS* en agallas de raíces infectadas por *Na* y compararlos con los acumulados en las inoculadas sólo con *Pc*. En tallos de plantas de los tratamientos *NaPc* y *MPc*, los niveles de *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS* fueron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) inferiores al testigo *Pc*, cuando el oomiceto se inoculó a los 3 y 21 días posteriores a la inoculación (dpi) con *Na* o *Me*; en *NaPc* y *MPc* los niveles de capsidiol en tallos fueron inferiores ( $P \leq 0.05$ ) únicamente cuando *Pc* se inoculó a los 21 dpi con el nematodo, en comparación con el tratamiento *Pc*; en cambio, en raíces las diferencias entre *Pc* vs *NaPc* y *Pc* vs *MPc* fueron significativas ( $P \leq 0.05$ ) tanto a 3 como a 21 dpi. En raíces, los niveles de *HMG2* y *EAS* fueron reducidos ( $P \leq 0.05$ ) en el tratamiento *N* en comparación con *Pc*, mientras que los de *NPc* fueron superiores a los de *N*, pero generalmente inferiores a los de *Pc*; ambos genes estuvieron positivamente correlacionados. Los niveles de *WRKY1*, *POX*, y *PR-1* fueron inferiores ( $P \leq 0.05$ ) en el tratamiento *Na* en comparación con *Pc*; y los de *WRKY-a* y *EAS* fueron reprimidos localmente en presencia del nematodo; en cambio en *Pc*, todos los genes fueron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) sobre-expresados. *Na* y *Me* modificaron los patrones de expresión de genes de defensa y los niveles de capsidiol.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, nematodos agalladores, qRT-PCR, factores de transcripción, ruta mevalónica.

**DEFENSE GENE TRANSCRIPTS ACCUMULATION IN CHILI PEPPER CM334 INFECTED BY *Nacobus aberrans* OR *Meloidogyne enterolobii* AND INOCULATED WITH *Phytophthora capsici*.**

Edgar Villar Luna, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2013

Chili pepper CM334 is resistant to the oomycete *Phytophthora capsici* (*Pc*) and the nematodes *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and *M. javanica*, but susceptible to *M. enterolobii* (*Me*) and *Nacobus aberrans* (*Na*). *Capsicum annuum* resistance to *Pc* is associated with the accumulation of sesquiterpene phytoalexin capsidiol and overexpression of several defense-related genes. The objectives of this study were: 1) to know what changes in the expression of some mevalonate pathway genes (*HMG2*, *EAS*, *HMG3*, y *SS*) occur in CM334 plants infected by *Na* (*NaPc*) or *Me* (*MPc*) and inoculated with *Pc* (*Pc*); 2) to determine the relationship between levels of *HMG2* and *EAS* in CM334 roots inoculated only with *Na* (*N*), with *Pc* (*Pc*) and with both pathogens (*NPc*); and 3) to assess the levels of *WRKY-a*, *WRKY1*, *POX*, *PR-1* and *EAS* transcripts in infected root galls and compare them with those accumulated in roots inoculated only with *Pc*. In stems of *NaPc* and *MPc* treatments, *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, and *SS* levels were significantly ( $P \leq 0.05$ ) lower than in the *Pc* treatment, when the oomycete was inoculated at 3 and 21 days after inoculation (dai) with *Na* or *Me*; in *NaPc* and *MPc* treatments, capsidiol levels in stems were lower ( $P \leq 0.05$ ) only when *Pc* was inoculated at 21 dai with nematode, compared with *Pc* treatment, whereas in roots differences between *Pc* vs *NaPc* and *Pc* vs *MPc* were significant ( $P \leq 0.05$ ) at 3 and 21 dai. In roots, *HMG2* and *EAS* transcript levels were reduced ( $P \leq 0.05$ ) in *N* treatment compared to *Pc*, while those of *NPc* were higher to those of *N*, but generally lower than *Pc*, both genes were positively correlated. The *WRKY1*, *POX*, and *PR-1* transcript levels were lower ( $P \leq 0.05$ ) in *Na* treatment compared to *Pc*; *WRKY-a* and *EAS* genes were locally repressed in the presence of nematode, whereas in *Pc* all genes were significantly overexpressed ( $P \leq 0.05$ ). Both nematodes (*Na* and *Me*) altered the pattern expression of defense genes and levels of capsidiol.

**Keywords:** *Capsicum annuum*, root-knot nematodes, qRT-PCR, transcription factors, mevalonate pathway.

## **Dedico esta tesis:**

A mis padres **José y María**, ejemplos de lucha, honestidad y tenacidad, por su confianza en la realización de mis sueños y por el apoyo absoluto que siempre me han brindado.

A mis hermanos **Gris y Hernán**, por su inigualable amistad, y por su apoyo incondicional.

A mi hermano **José Iván**<sup>†</sup> en cualquier lugar en que se encuentre.

Por ellos y para ellos!!!

*Somos todos tan limitados que creemos siempre tener la razón.*

*J. W. von Goethe*

## **AGRADECIMIENTOS**

A los millones de mexicanos que pagan impuestos, quienes, a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el Colegio de Postgraduados, han financiado parte de mi formación.

A los integrantes de mi Consejo Particular (Doctores: Emma Zavaleta Mejía, Reyna I. Rojas Martínez, Rosa Luisa Santillan Baca, Benito Reyes Trejo, y Daniel L. Ochoa Martínez) por el tiempo y paciencia otorgados al compartirme sus conocimientos.

Hago extensivo mi agradecimiento a la Dra. Emma Zavaleta Mejía por haberme impulsado en el área de la Fitopatología, por su brillante calidad humana y profesional, y por la infinita paciencia y comprensión para conmigo.

A la Dra. Olga Gómez Rodríguez, por el tiempo y apoyo brindados en la parte experimental, y por su amistad.

Al Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304, por el apoyo financiero otorgado, lo que hizo posible en parte la conclusión de este trabajo de tesis.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, por el subsidio otorgado, el cual constituyó una pieza fundamental para la culminación de este trabajo.

Por último y no por ser menos importante, doy gracias a Dios, por fortalecer mi espíritu e iluminar mi mente, hoy y siempre.

## NOTA

Este trabajo de investigación fue realizado como parte del proyecto “Implicación de los genes *PAL* y *HMG* en el fenómeno de Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* por *Nacobbus aberrans* en Chile CM-334”, financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 46331-Z).

# CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN GENERAL</b> .....	iii
<b>GENERAL ABSTRACT</b> .....	iv
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xii
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. OBJETIVO</b> .....	5
<b>III. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	6
Nematodos endoparásitos sedentarios.....	6
<i>Nacobbus aberrans</i> .....	8
<i>Meloidogyne enterolobii</i> .....	9
Sitios especializados de alimentación: células gigantes y sincitios.....	10
Alteraciones moleculares inducidas por nematodos endoparásitos sedentarios .....	12
Marchitez de chile ( <i>Capsicum annuum</i> L.) inducida por <i>Phytophthora capsici</i> Leonian .....	14
La línea de chile tipo serrano “Criollo de Morelos” (CM334) .....	15
Mecanismos moleculares implicados en la resistencia a <i>P. capsici</i> .....	17
Implicación del capsidiol en la resistencia a <i>P. capsici</i> .....	18
Rompimiento de resistencia de chile CM334 inducido por <i>N. aberrans</i> .....	18
Biosíntesis de isoprenoides en plantas (ruta del mevalonato).....	20
Regulación de la expresión de <i>HMG2</i> , <i>SC</i> y <i>SS</i> en interacciones planta-patógeno .....	24
Factores de transcripción WRKY.....	26
Proteínas relacionadas con patogénesis.....	28
<b>IV. LITERATURA CITADA</b> .....	30

<b>CAPÍTULO II. GENES DE DEFENSA DE LA RUTA DEL MEVALONATO EN CHILE CM334 INFECTADO POR <i>Nacobbus aberrans</i> Y <i>Meloidogyne enterolobii</i> E INOCULADO CON <i>Phytophthora capsici</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>43</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>44</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>45</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
Identificación molecular de <i>N. aberrans</i> y de <i>M. enterolobii</i> .....	48
Material biológico.....	48
Extracción de DNA genómico.....	48
Reacción en cadena de la polimerasa .....	49
Acumulación de transcritos de genes y de capsidiol en tallos de plantas de chile CM334 .....	50
Material vegetal.....	50
Inoculación con <i>N. aberrans</i> o con <i>M. enterolobii</i> .....	50
Inoculación con <i>P. capsici</i> .....	51
Experimentos .....	51
Extracción de RNA total, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real.....	53
Extracción y determinación del contenido de capsidiol.....	54
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
Identificación molecular de <i>N. aberrans</i> y de <i>M. enterolobii</i> .....	55
Infección de raíces de chile CM334 por <i>N. aberrans</i> y por <i>M. enterolobii</i> .....	57
Acumulación de transcritos y de capsidiol en tallos de plantas CM334 infectadas por nematodos agalladores e inoculadas con <i>P. capsici</i> .....	61
Experimento 1, plantas CM334 inoculadas con <i>N. aberrans</i> .....	61
Acumulación de transcritos.....	61
Acumulación de capsidiol en tallos y raíces.....	64
Experimento 2, plantas CM334 inoculadas con <i>M. enterolobii</i> .....	66
Acumulación de transcritos.....	66
Acumulación de capsidiol en tallos y raíces.....	69
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>71</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>79</b>

<b>CAPÍTULO III. EXPRESSION OF TWO GENES ASSOCIATED WITH BIOSYNTHESIS OF SESQUITERPENE PHYTOALEXINS IN CHILLI CM334 INFECTED BY <i>Nacobbus aberrans</i> AND <i>Phytophthora capsici</i>.....</b>	<b>87</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>87</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>88</b>
<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>91</b>
Chilli plants and inoculation with <i>N. aberrans</i> and <i>P. capsici</i> .....	91
Assay establishment.....	91
RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR .....	92
<b>RESULTS.....</b>	<b>93</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>96</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>98</b>
<b>CAPITULO IV. TRANSCRITOS DE GENES DE DEFENSA ACUMULADOS EN RAÍCES DE CHILE CM334 INOCULADAS CON <i>Nacobbus aberrans</i> O CON <i>Phytophthora capsici</i> .....</b>	<b>102</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>102</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>103</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>104</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>106</b>
Establecimiento del experimento.....	106
Extracción de RNA total, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real .....	107
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>109</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>111</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>114</b>

## LISTA DE CUADROS

	Página
<b>CAPITULO I.</b>	
Cuadro 1. Clasificación de proteínas relacionadas con patogénesis .....	28
<b>CAPÍTULO II. GENES DE DEFENSA DE LA RUTA DEL MEVALONATO EN CHILE CM334 INFECTADO POR <i>Nacobbus aberrans</i> Y <i>Meloidogyne enterolobii</i> E INOCULADO CON <i>Phytophthora capsici</i></b>	
Cuadro 1. Iniciadores específicos utilizados en el presente estudio.....	49
Cuadro 2. Tratamientos evaluados en el experimento 1 ( <i>N. aberrans</i> ) y 2 ( <i>M. enterolobii</i> ).....	52
Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.....	54
Cuadro 4. . Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre niveles de expresión de los genes <i>HMG2</i> , <i>HMG3</i> y <i>EAS</i> , y entre los niveles de <i>EAS</i> y el contenido de capsidiol en tallos de plantas CM334 infectadas por <i>Nacobbus aberrans</i> e inoculadas con <i>Phytophthora capsici</i> .....	66
Cuadro 5. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre niveles de expresión génica, y entre los niveles de <i>EAS</i> y el contenido de capsidiol en tallos de plantas de chile CM334 infectadas por <i>Meloidogyne enterolobii</i> e inoculadas con <i>Phytophthora capsici</i> .....	71
<b>CAPÍTULO III. EXPRESSION OF TWO GENES ASSOCIATED WITH BIOSYNTHESIS OF SESQUITERPENE PHYTOALEXINS IN CHILLI CM334 INFECTED BY <i>Nacobbus aberrans</i> AND <i>Phytophthora capsici</i></b>	
Table 1. Real-time PCR primers used in gene expression analysis.....	92
<b>CAPITULO IV. TRANSCRITOS DE GENES DE DEFENSA ACUMULADOS EN RAÍCES DE CHILE CM334 INOCULADAS CON <i>Nacobbus aberrans</i> O CON <i>Phytophthora capsici</i></b>	
Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.....	109

## LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I.	Página
<p><b>Figura 1.</b> Ruta simplificada de biosíntesis de fitoesteroles y capsidiol (fitoalexina sesquiterpénica). Se remarcan en gris las enzimas correspondientes a los transcritos cuya acumulación fue determinada en este trabajo. HMGS: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa; HMGRs: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasas; MK: mevalonocinasa; PMK: fosfomevalonato cinasa; MDD: mevalonato difosfato descarboxilasa; IPP: pirofosfato de isopentenilo; IPPI: IPP isomerasa; DMAPP: pirofosfato de dimetilalilo; GPP: pirofosfato de geranilo; FPP: pirofosfato de farnesilo; FPPS: FPP sintasa; SS: escualeno sintasa; SE: escualeno epoxidasa; CAS: cicloartenol sintasa; SMT1 y SMT2: esterol metiltransferasas; BRs: brasinoesteroides; EAS: 5-epiaristoliqueno sintasa.....</p>	22
<p><b>Figura 2.</b> Ruta de biosíntesis del capsidiol. FPP: pirofosfato de farnesilo; EAS: 5-epiaristoliqueno sintasa; EAH: 5-epiaristoliqueno dihidroxilasa.....</p>	23
<p><b>CAPÍTULO II. GENES DE DEFENSA DE LA RUTA DEL MEVALONATO EN CHILE CM334 INFECTADO POR <i>Nacobbus aberrans</i> Y <i>Meloidogyne enterolobii</i> E INOCULADO CON <i>Phytophthora capsici</i></b></p>	
<p><b>Figura 1.</b> Amplificación del DNA de juveniles de segundo estadio (J<sub>2</sub>) de <i>Nacobbus aberrans</i>, <i>Meloidogyne enterolobii</i> y <i>Meloidogyne incognita</i> generada con los iniciadores: (A) ITS de <i>N. aberrans</i> (173 pb); (B) IGS2 de <i>M. enterolobii</i> (236 pb); (C) SCAR de <i>M. enterolobii</i> (520 pb); (D) SCAR de <i>M. incognita</i> (999 pb). CST: control negativo sin templado. Marcador 100-pb (Fermentas™).....</p>	55

**Figura 2.** Ausencia de amplificación del DNA de: (1) *Nacobbus aberrans*; (2) *Meloidogyne enterolobii*; (3) *Meloidogyne incognita*; con iniciadores específicos que generan fragmentos de: 999 pb (*M. incognita* SCAR), 420 pb (*M. arenaria* SCAR), 670 pb (*M. javanica* SCAR), 236 pb (*M. enterolobii* IGS2), 520 pb (*M. enterolobii* SCAR), y 173 pb (*N. aberrans* ITS). Marcador 100-pb (Fermentas™). 56

**Figura 3.** Número de nematodos que ingresaron en raíces de chile CM334. Na, *Nacobbus aberrans*; Me, *Meloidogyne enterolobii*. Cada barra representa el promedio de cinco raíces analizadas, y la línea en cada barra la desviación estándar. El experimento se repitió una vez..... 57

**Figura 4.** Invasión de raíces de chile CM334 por *Nacobbus aberrans*. (A) 3 días post-inoculación (dpi); (B) 21 dpi; (C y D) 40 dpi. J2, J3 y J4, juveniles de segundo, tercero y cuarto estadio, respectivamente; Ha, hembra adulta..... 58

**Figura 5.** Invasión de raíces de chile CM334 por *Meloidogyne enterolobii*. (A y B) 3 días post-inoculación (dpi); (B y C) 21 dpi. J2, juveniles de segundo estadio; Ha, hembra adulta..... 59

**Figura 6.** Raíz de chile CM334 agallada por *Meloidogyne enterolobii* a 21 días post-inoculación. Ag, agalla; Ha, hembra adulta. Pc, zona de decapitación e inoculación con micelio de *Phytophthora capsici*..... 60

**Figura 7.** Acumulación de transcritos de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS*, en tallos de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. Pc: inoculadas sólo con *P. capsici*; NaPc: inoculadas con *Nacobbus aberrans* y con *P. capsici*. Las plantas se inocularon con el oomiceto 3 días posteriores a la inoculación con el nematodo (grupo 3d). 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 Gliceraldehído 3-fosfato 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.....

62

**Figura 8.** Acumulación de transcritos de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS* y *SS*, en tallos de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. Pc: inoculadas sólo con *P. capsici*; NaPc: inoculadas con *Nacobbus aberrans* y con *P. capsici*. Las plantas se inocularon con el oomiceto 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo (grupo 21d). 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 Gliceraldehído 3-fosfato 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.....

63

**Figura 9.** Acumulación de capsidiol en tallos de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. Pc: inoculadas sólo con *P. capsici*; NaPc: inoculadas con *Nacobbus aberrans* y con *P. capsici*; Control: plantas con medio V8 sin micelio. Los tallos de las plantas se inocularon con el oomiceto 3 ó 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo en la raíz (grupos 3d y 21d, respectivamente). Cada barra representa el promedio de tres extracciones y la línea en cada barra la desviación estándar. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). El experimento se repitió una vez.....

64

**Figura 10.** Acumulación de capsidiol en raíces de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. Pc: inoculadas sólo con *P. capsici*; NaPc: inoculadas con *Nacobbus aberrans* y con *P. capsici*; Control: plantas con medio V8 sin micelio. Los tallos de las plantas se inocularon con el oomiceto 3 ó 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo en la raíz (grupos 3d y 21d, respectivamente). Cada barra representa el promedio de tres extracciones y la línea en cada barra la desviación estándar. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). El experimento se repitió una vez.....

65

**Figura 11.** Acumulación de transcritos de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS*, en tallos de plantas de chile CM334 resistentes a *P. capsici*. Pc: inoculadas sólo con *Phytophthora capsici*; MPC: inoculadas con *Meloidogyne enterolobii* y con *P. capsici*. Las plantas se inocularon con el oomiceto 3 días posteriores a la inoculación con el nematodo (grupo 3d). 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 Gliceraldehído 3-fosfato 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.....

67

**Figura 12.** Acumulación de transcritos de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS*, en tallos de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. Pc: inoculadas sólo con *P. capsici*; MPC: inoculadas con *Meloidogyne enterolobii* y con *P. capsici*. Las plantas se inocularon con el oomiceto 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo (grupo 21d). 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 Gliceraldehído 3-fosfato 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.....

68

**Figura 13.** Acumulación de capsidiol en tallos de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. Pc: inoculadas sólo con *P. capsici*; MPc: inoculadas con *Meloidogyne enterolobii* y con *P. capsici*; Control: plantas con discos de medio V8 sin micelio. Los tallos de las plantas se inocularon con el oomiceto 3 ó 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo en la raíz (grupos 3d y 21d, respectivamente). Cada barra representa el promedio de tres extracciones y la línea en cada barra la desviación estándar. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). El experimento se repitió una vez.....

69

**Figura 14.** Acumulación de capsidiol en raíces de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. Pc: inoculadas sólo con *P. capsici*; MPc: inoculadas con *Meloidogyne enterolobii* y con *P. capsici*; Control: plantas con discos de medio V8 sin micelio. Los tallos de las plantas se inocularon con el oomiceto 3 ó 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo en la raíz (grupos 3d y 21d, respectivamente). Cada barra representa el promedio de tres extracciones y la línea en cada barra la desviación estándar. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). El experimento se repitió una vez.....

70

### CAPÍTULO III. EXPRESSION OF TWO GENES ASSOCIATED WITH BIOSYNTHESIS OF SESQUITERPENE PHYTOALEXINS IN CHILLI CM334 INFECTED BY *Nacobbus aberrans* AND *Phytophthora capsici*

**Figura 1.** Biosynthetic pathway of capsidiol (simplified scheme). Enzymes corresponding to the transcripts evaluated in this study are presented in a gray box. HMGRs: hydroxymethylglutaryl-CoA reductases; IPP: isopentenyl diphosphate; IPPI: IPP delta-isomerase; DMAPP: dimethylallyl diphosphate; GPP: geranyl diphosphate; FPP: farnesyl diphosphate; FPPS: (2*E*, 6*E*)-FPP synthase; SS: squalene synthase; SC: sesquiterpene cyclase; EAS: 5-epiaristolochene synthase..... 89

**Figura 2.** Relative transcript accumulation of *HMG2* and *EAS* genes in CM334 chilli plant roots resistant to *P. capsici*. *Pc*: inoculated with *P. capsici* alone; *N*: inoculated with *N. aberrans* alone; *Npc*: inoculated with *N. aberrans* and *P. capsici*. Relative expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Schmittgen and Livak, 2008). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene was used as internal reference to normalize expression, and control plants to calibrate expression levels of the gene of interest, which were expressed as fold-change due to treatment in relation to the basal level of transcripts in control plants (1x). Each bar represents the average of six technical replicates and the line in each bar the standard deviation. Bars with the same letter are not significantly different (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). The experiment was repeated once..... 95

### CAPITULO IV. TRANSCRITOS DE GENES DE DEFENSA ACUMULADOS EN RAÍCES DE CHILE CM334 INOCULADAS CON *Nacobbus aberrans* O CON *Phytophthora capsici*

**Figura 1.** Acumulación de transcritos de los genes *WRKY-a*, *WRKY1*, *POX*, *PR-1*, y *EAS* en raíces de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. *Na*: inoculadas solo con *Nacobbus aberrans* (interacción compatible); *Pc*:

inoculadas sólo con *P. capsici* (interacción incompatible). Con la finalidad de que las plantas de todos los tratamientos estuvieran en la misma etapa fenológica al momento de realizar las evaluaciones de la expresión de genes, las inoculaciones con los patógenos se realizaron en tiempos diferentes; las del nematodo al momento de establecer el ensayo y las del oomiceto a los 49 días de haber realizado la inoculación con el nematodo y 24 h antes de obtener el tejido radical de las plantas de cada tratamiento para la comparación de la expresión génica. En plantas inoculadas con el nematodo los niveles de transcritos se evaluaron en las agallas de la raíz y en las inoculadas con el oomiceto se consideró la totalidad del sistema radical. Cada barra representa el promedio de tres réplicas y la línea en cada barra la desviación estándar. Los niveles de expresión se expresaron como cambios en veces en respuesta al tratamiento con relación al nivel basal registrado en las plantas testigo (1x) y se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Schmittgen y Livak, 2008), utilizando como referencia interna el gen que codifica para Gliceraldehído 3-fosfato 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.....

# CAPÍTULO 1

## I. INTRODUCCIÓN

El oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian, induce la marchitez y el tizón foliar y de tallo en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.), causando pérdidas considerables a nivel mundial (Erwin y Ribeiro, 1996; Ristaino y Johnston, 1999). Entre las alternativas de manejo de la enfermedad está el uso de variedades resistentes. Las plantas en general poseen mecanismos de defensa con los que responden a la infección por patógenos, usualmente mediante la activación transcripcional de varios genes de defensa, que resulta en la síntesis *de novo* de diversas proteínas y compuestos antimicrobianos (Yang *et al.*, 1997; Rushton y Somssich, 1998). La línea de chile Criollo de Morelos 334 “CM334”, exhibe un alto grado de resistencia a diversos aislamientos de este oomiceto, que se expresa como una respuesta hipersensitiva a nivel de raíz, tallo y follaje (Fernández-Pavia, 1997; Candela *et al.*, 2000; Ueeda *et al.*, 2006; Glosier *et al.*, 2008). Al igual que en otros genotipos de chile, la resistencia a *P. capsici* se asocia con una acumulación elevada del capsidiol, una fitoalexina de naturaleza sesquiterpénica cuya biosíntesis está regulada inicialmente por la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoenzimaA reductasa (HMGR) (Chappell *et al.*, 1991; Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000). Además, en genotipos de chile resistentes al oomiceto, se han registrado incrementos en la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) como: *PR-1* (Fernández-Herrera *et al.*, 2012); *GLU* (Silvar *et al.*, 2008) que codifica para  $\beta$ -1, 3-glucanasas (Egea *et al.*, 1999; Fernández-Herrera *et al.*, 2012); *POX* (Silvar *et al.*, 2008), que promueve una mayor actividad de peroxidasas (Fernández-Pavia, 1997; Fernández-Herrera *et al.*, 2012); y sobre-expresiones de otros genes de defensa como el *OPR-3* que codifica para la 12-oxofitodienoato reductasa, asociada con la biosíntesis de ácido jasmónico (Ueeda *et al.*, 2006); y los genes *HMG2*, *SC* y *EAS*, que codifican para la HMGR, sesquiterpeno ciclasa, y 5-epi-aristolóqueno sintasa, respectivamente, implicadas en la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas como el capsidiol (Zavala-Páramo *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2003; Silvar *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012).

En plantas la HMGR cataliza la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoenzimaA a mevalonato, y es codificada por una familia multigénica que en *C. annuum* incluye a *HMG1*, *HMG2*, y *HMG3*, diferencialmente regulados para conducir a la biosíntesis de diferentes tipos de isoprenoides como esteroides y fitoalexinas sesquiterpénicas (Chappell, 1995; Ha *et al.*, 2003). Así, en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, la expresión de *HMG1* y *HMG2* probablemente está asociada con la síntesis de ciertos esteroides y triterpenos (Enjuto *et al.*, 1994; Enjuto *et al.*, 1995); en *Solanum tuberosum* L., *HMG1* se asocia con la producción de esteroides, mientras que *HMG2* y *HMG3* se relacionan con la síntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas en respuesta al ataque por patógenos (Choi *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1994); en *S. lycopersicum* L., el gen *HMG1* está probablemente asociado con la síntesis de esteroides, mientras que *HMG2* se relaciona con respuestas de defensa frente a estrés biótico y abiótico (Weissenborn *et al.*, 1995). La biosíntesis de esteroides es regulada a nivel post-mevalonato por la escualeno sintasa (SS) y cicloartenol sintasa (CAS) (Stermer *et al.*, 1994; Chappell, 1995; Suzuki y Muranaka, 2007); mientras que la de fitoalexinas sesquiterpénicas es regulada por la sesquiterpeno ciclasa (SC) (Vögeli y Chappell, 1988; Chappell, 1995). Con frecuencia se menciona que el estrés biótico o abiótico, induce cambios en el curso normal de la biosíntesis de isoprenoides, desviando la ruta hacia la producción de fitoalexinas sesquiterpénicas (Takahashi *et al.*, 2007). En este proceso, un punto clave estrictamente regulado, es la utilización del intermediario pirofosfato de farnesilo (FPP), del cual también se derivan compuestos que forman parte del metabolismo primario como los esteroides (Vögeli y Chappell, 1988; Takahashi *et al.*, 2007). Se ha sugerido que el mecanismo de regulación implica la existencia de un interruptor metabólico entre la síntesis de esteroides y fitoalexinas (Takahashi *et al.*, 2007). Por ejemplo, en tabaco, la acumulación de capsidiol, inducida por celulosa, condujo a la inhibición de la SS (Threlfall y Whitehead, 1988). La biosíntesis de capsidiol es catalizada por la 5-epiaristoloxeno sintasa (EAS), una sesquiterpeno ciclasa (Zavala-Páramo *et al.*, 2000).

CM334 es susceptible al nematodo “falso nodulador” *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944 (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005), pero resistente a las tres principales especies de nematodos agalladores [*Meloidogyne incognita* (Kofoid y White, 1919)

Chitwood, 1949; *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949; y *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 (Pegard *et al.*, 2005); sin embargo, se desconoce si lo es para otras especies de *Meloidogyne*. Se ha documentado que la infección previa por *N. aberrans* compromete la resistencia de CM334 a *P. capsici*, fenómeno conocido como “rompimiento de resistencia”; el cual podría estar relacionado con cambios transcripcionales y metabólicos inducidos por el nematodo en la raíz, afectando a las principales rutas de síntesis de compuestos involucrados en defensa (Zavaleta-Mejía, 2002; Godínez-Vidal *et al.*, 2008; Villar-Luna *et al.*, 2009; Godínez-Vidal *et al.*, 2013; López-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). En raíces de plantas CM-334 infectadas por *N. aberrans* e inoculadas con *P. capsici*, se observó una acumulación tardía de transcritos del gen *EAS*, en comparación con las inoculadas únicamente con el oomiceto, suceso que se relacionó con una menor acumulación de capsidiol (Fernández-Herrera *et al.*, 2012). De manera similar, en plantas infectadas por *N. aberrans* se registró un retraso en la respuesta hipersensitiva foliar hacia *P. capsici*, en comparación con las inoculadas únicamente con el oomiceto (Villar-Luna *et al.*, 2009). La resistencia de CM334 a las tres principales especies de *Meloidogyne*, se expresa como una respuesta hipersensitiva, asociada con una marcada acumulación de ácido clorogénico (Pegard *et al.*, 2005). Además, la resistencia de ciertos genotipos de Chile a *M. incognita* se relaciona con incrementos en la expresión de los genes *WRKY30*, *WRKY2* y *WRKY-a* (Li *et al.*, 2008; Jingyuan *et al.*, 2011). Los factores WRKY constituyen una de las familias más extensas de reguladores transcripcionales con funciones clave frente a estrés biótico como el ataque por hongos, bacterias y nematodos; estas proteínas son codificadas por una familia multigénica. Por ejemplo, en *A. thaliana* se reporta la existencia de 74 isogenes *WRKY* (Rushton *et al.*, 2010), 81 en *Solanum lycopersicum* L. (Huang *et al.*, 2012), mientras que para *C. annuum* se han reportado *WRKY-a*, *WRKY1*, *WRKYb*, *WRKYd*, *WRKY58*, *WRKY40*, *WRKY30*, y *WRKY2* (Park *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2011; Jingyuan *et al.*, 2011; Huh *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Dang *et al.*, 2013) que actúan como reguladores positivos o negativos (activación o represión de genes, respectivamente) en interacciones de las plantas con su ambiente.

Los nematodos endoparásitos sedentarios, como *Meloidogyne* spp y *N. aberrans*, establecen una relación íntima y sofisticada con sus hospedantes susceptibles mediante la formación de sitios especializados de alimentación (células gigantes y sincitios, respectivamente). Para ambos nematodos, el proceso parasítico inicia cuando juveniles del segundo estadio (J<sub>2</sub>) penetran las raíces y migran inter (*Meloidogyne* spp), e intracelularmente (*N. aberrans*), los J<sub>2</sub> de *Meloidogyne* sp se alojan en el cilindro vascular e inmediatamente inducen la formación de células gigantes; en contraste, los J<sub>2</sub> de *N. aberrans* pueden permanecer o salir y volver a ingresar a la raíz, en este caso la formación del sincitio es inducida por la hembra J<sub>4</sub> o la hembra inmadura (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Williamson y Gleason, 2003). La formación del sitio especializado implica cambios dramáticos en la expresión de genes, involucrando la sobre-expresión de aquellos directamente relacionados con el desarrollo y mantenimiento del sitio especializado y la represión de aquellos relacionados con los mecanismos de defensa del hospedante y que podrían restringir el establecimiento y reproducción del nematodo (Gheysen y Fenoll, 2002; Jammes *et al.*, 2005). Así, por ejemplo, en raíces de soya (*Glycine max* L., cv. Williams 82) inoculadas con una raza compatible de *Heterodera glycines*, la expresión de genes implicados en la biosíntesis del ácido jasmónico (*OPR1* y *OPR2*) fue localmente reprimida; el ácido jasmónico es una molécula de señalización involucrada en respuestas de defensa frente a estrés biótico o abiótico (Ithal *et al.*, 2007). Similarmente, en agallas de *A. thaliana* inducidas por *M. incognita*, se reprimió la expresión de varios genes relacionados con defensa como *PR-4* (proteína relacionada con patogénesis-4), *PAD4* (proteína tipo lipasa, implicada en señalización del ácido salicílico), y 17 genes *WRKY*; así el establecimiento exitoso del nematodo se asoció con una supresión efectiva de los mecanismos de defensa (Jammes *et al.*, 2005).

Hasta los primeros 6 años del presente siglo se consideraba a las especies *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica* como las de mayor importancia económica; sin embargo, en la actualidad, *Meloidogyne enterolobii* Yang y Eisenback, 1983 (= *M. mayaguensis* Rammah y Hirschmann, 1988) ha cobrado mayor importancia a nivel mundial, debido a su creciente distribución geográfica, amplio rango de hospedantes, y a su notable capacidad patogénica para superar la resistencia en cultivares de jitomate (*S.*

*lycopersicum*) y chile que poseen los genes *Mi-1* y *N*, respectivamente (Brito *et al.*, 2007; Kiewnick *et al.*, 2009; Castagnone-Sereno, 2012). Estos genes confieren resistencia dominante a las tres especies arriba mencionadas, pero es inefectiva contra *M. enterolobii*; a la fecha no se han encontrado fuentes de resistencia en jitomate y chile para esta especie. En este sentido y considerando el hecho de que CM334 exhibe una incompatibilidad similar para las tres especies más comunes de *Meloidogyne*, surgió el interés por determinar si CM334 es resistente a *M. enterolobii* y conocer que respuestas de defensa son expresadas por CM334 al interactuar con este nematodo. A la fecha, los análisis de expresión génica en la interacción chile CM334-*N. aberrans*, solamente se han enfocado a nivel de raíz en respuesta a la infección por ambos patógenos; no obstante, también es de interés conocer la magnitud de las alteraciones transcripcionales en la parte aérea de plantas de este genotipo infectadas por el nematodo. Además, en este genotipo se desconoce la magnitud de las alteraciones transcripcionales a nivel de agallas inducidas por *N. aberrans*.

## II. OBJETIVOS

Por lo anterior los objetivos del presente estudio fueron:

- 1) Comparar el nivel de invasión de *M. enterolobii* y *N. aberrans* en raíces de chile CM334, y determinar los niveles de expresión de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS*, y la acumulación de capsidiol en tallos de plantas de chile CM334 infectadas por *N. aberrans* o *Meloidogyne enterolobii* e inoculados con *P. capsici*.
- 2) Determinar la relación entre los niveles de expresión de *HMG2* y *EAS* en raíces de chile CM334 inoculadas con *N. aberrans* y en combinación con *P. capsici*.
- 3) Conocer los niveles de expresión de los genes *WRKY-a*, *WRKY1*, *POX*, *PR-1*, y *EAS* en agallas inducidas por *N. aberrans*, en comparación con los registrados en la interacción incompatible chile CM334-*P. capsici*.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### Nematodos endoparásitos sedentarios

Todos los nematodos fitoparásitos son estrictamente obligados, y exhiben diferentes tipos de estrategias parasíticas (migratorias y/o sedentarias) que se resumen en: ectoparásitos, endoparásitos, y semiendoparásitos (Williamson y Gleason, 2003; Decraemer y Hunt, 2006). Los endoparásitos sedentarios constituyen el grupo de mayor importancia, por su marcada especialización, los cuales después de una fase migratoria inicial adoptan un estilo de vida sésil; dentro de este grupo se incluyen principalmente a los que se enquistan (como *Globodera* y *Heterodera*), los agalladores (*Meloidogyne* spp), y el “falso agallador” *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944; quienes mediante la formación de sitios especializados de alimentación (células gigantes o sincitios) establecen una interacción íntima y sofisticada con sus hospedantes para la obtención de los nutrimentos necesarios para su crecimiento y reproducción (Sijmons *et al.*, 1994; Gheysen y Mitchum, 2009). Los nematodos que se enquistan se caracterizan por la cutinización del cuerpo de las hembras después de ser fecundadas, reteniendo en su interior los huevecillos, el quiste resultante funciona como estructura de supervivencia, permanece en el suelo y es capaz de persistir por periodos prolongados bajo condiciones adversas; la eclosión de los huevecillos ocurre en respuesta a la presencia de un hospedante adecuado (Turner y Rowe, 2006). Por otra parte, los agalladores se caracterizan por los abultamientos que inducen en la raíz y que contienen al nematodo rodeado de tejido formado de células hipertrofiadas y células con hiperplasia; la hembra adulta se reproduce casi siempre por partenogénesis y oviposiciona en una matriz gelatinosa; la eclosión de los huevecillos a diferencia de los nematodos que se enquistan no requiere de la estimulación por parte del hospedante (Karssen y Moens, 2006).

La taxonomía de los nematodos endoparásitos sedentarios (aquellos que se enquistan y los agalladores) está en continua evolución, la más actual y que esta soportada por métodos de caracterización molecular es la propuesta por Decraemer y Hunt (2006) y por Hunt y Handoo (2009):

PHYLUM:	Nematoda
CLASE:	Chromadorea
ORDEN:	Rhabditida
Suborden:	Tylenchina
Infraorden:	Tylenchomorpha
SUPERFAMILIA:	Tylenchoidea
<b>FAMILIA:</b>	Hoplolaimidae
Subfamilia:	Heteroderinae
Géneros:	<i>Heterodera</i> y <i>Globodera</i> , entre otros.
Subfamilia:	Meloidogyninae
Géneros:	<i>Meloidogyne</i>
<b>FAMILIA:</b>	Pratylenchidae
Subfamilia:	Nacobbinae
Géneros:	<i>Nacobbus</i>

Los nematodos pertenecientes al género *Meloidogyne* (comúnmente conocidos como nematodos agalladores), son económicamente los más importantes a nivel mundial por las grandes pérdidas que ocasionan en los cultivos; en la actualidad se han descrito más de 90 especies que atacan a más de 3000 especies de plantas (Abad *et al.*, 2003; Moens *et al.*, 2009). Las especies más importantes son cuatro [*Meloidogyne incognita* (Kofoid y White, 1919) Chitwood, 1949; *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949; *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949; y *M. hapla* Chitwood, 1949, sin embargo, en la actualidad *Meloidogyne enterolobii* Yang y Eisenback, 1983 (= *M. mayaguensis* Rammah y Hirschmann, 1988) ha sido incorporada en esta lista por su alta agresividad, superando incluso a *M. incognita* considerada por mucho tiempo como la más predominante; estas especies difieren en patogenicidad y en rango de hospedantes; los cultivos hortícolas principalmente afectados por dichas especies son *Solanum lycopersicum* L., *S. tuberosum* L., *Capsicum* spp., *Cucumis sativus* L., *Cucurbita pepo* L., y *Daucus carota* L. (Abad *et al.*, 2003; Sikora y Fernández, 2005). Con respecto al género *Nacobbus* solo están

reconocidas dos especies: *N. aberrans* y *N. dorsalis* Thorne y Allen, 1944 (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

***Nacobbus aberrans***. Conocido comúnmente como el nematodo “falso agallador” *N. aberrans*, infecta a plantas tropicales y subtropicales en regiones de Norte (México y USA) y Sudamérica (Argentina, Chile, Perú, Bolivia, y Ecuador); en México causa pérdidas económicas principalmente en chile (*Capsicum* spp.), jitomate (*Solanum lycopersicum*), y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). En sus hospedantes susceptibles induce la formación de agallas en raíces, reducción del sistema radical, clorosis, enanismo y marchitez (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Scurrah *et al.*, 2005). Durante su ciclo de vida combina estrategias parasíticas características de miembros de las familias Pratylenchidae, y de las subfamilias Meloidogyninae y Heteroderinae, correspondiendo a la primera el hábito migratorio de todos los estadios juveniles, hembras inmaduras y machos; y a las últimas dos subfamilias el establecimiento de un sitio especializado de alimentación (sincitio), donde la hembra J<sub>4</sub> y la hembra inmadura son las responsables de inducir dicha estructura, mientras que en las especies de *Meloidogyne* y los que se enquistan el J<sub>2</sub> es el principal inductor (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Abad *et al.*, 2009; Sobczak y Golinowski, 2009). *N. aberrans* exhibe un marcado dimorfismo sexual, las hembras presentan forma de saco y los machos son vermiformes. Su ciclo de vida comprende la etapa de huevecillo, cuatro estados juveniles y la etapa adulta; el ciclo inicia con la primera muda de J<sub>1</sub> a J<sub>2</sub> que ocurre dentro del huevecillo, y posteriormente los J<sub>2</sub> emergen e invaden las raíces secundarias (ingresando y saliendo de la raíz con frecuencia), la migración es intracelular, la muda a J<sub>3</sub> y a J<sub>4</sub>, puede ocurrir en el suelo o dentro de la raíz, durante el tercer estadio adoptan la posición en forma de “C” o de espiral; la muda a hembra inmadura puede también ocurrir dentro o fuera de la raíz, dentro de la raíz se aloja cerca del cilindro vascular e induce la formación del sincitio (estructura que también puede ser inducida por la hembra J<sub>4</sub>), en este estado sésil alcanza la madurez, y su posterior fecundación conduce a la deposición de huevecillos en una matriz gelatinosa que es visible en la superficie de las agallas; dependiendo del hospedante y la temperatura, el ciclo se completa entre 28 y 95 días (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Scurrah *et al.*, 2005).

***Meloidogyne enterolobii***. En la actualidad, se han reportado especies emergentes de nematodos agalladores capaces de infectar solanáceas tales como *M. hispanica* Hirschmann, 1986; *M. paranaensis* Carneiro, Carneiro, Abrantes, Santos y Almeida, 1996; *M. minor* Karssen, Bolk, van Aelst, van den Beld, Kox, Korthals, Molendijk, Zijlstra, van Hoof y Cook, 2004; y *M. enterolobii* (= *M. mayaguensis*) (Moens *et al.*, 2009; Maleita *et al.*, 2012); de éstas, *M. enterolobii* ha cobrado mayor importancia a nivel mundial, debido a su creciente distribución geográfica, amplio rango de hospedantes, y a su notable agresividad para superar la resistencia de plantas cultivables a las tres principales especies de agalladores: *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*; la especie ha sido detectada en regiones de África, USA, Centro y Sudamérica, y Europa (Brito *et al.*, 2007; Kiewnick *et al.*, 2009; Moens *et al.*, 2009).

*M. enterolobii* fue inicialmente descrito en 1983 causando severos daños en *Enterolobium contortisiliquum* en las islas Hainan, China (Yang y Eisenback, 1983); pocos años más tarde, en 1988 una nueva especie fue descrita infectando a *Solanum melongena* en Puerto Rico (Rammah y Hirschmann, 1988), la cual presentaba ciertas diferencias morfológicas con la reportada en China, y fue denominada *M. mayaguensis*; sin embargo, estudios moleculares posteriores han demostrado la existencia de similitudes en una de las regiones del DNA mitocondrial de las mismas, indicando que *M. enterolobii* y *M. mayaguensis* son la misma especie, y ambas denominaciones son actualmente aceptadas (Xu *et al.*, 2004; Castagnone-Sereno, 2012). El rango de hospedantes de esta especie es relativamente amplio y muy similar al de *M. incognita*, incluyendo a especies de plantas como *C. annuum*, *Solanum lycopersicum*, *Glycine max* L., *Ipomoea batatas* L., *Nicotiana tabacum* L., *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum y Nakai, *Psidium guajava* L., *Bidens pilosa* L., *Coffea arabica* L., *Phaseolus vulgaris*, *Beta vulgaris* L., *Brassica oleracea* L., *Apium graveolens* L., *Solanum tuberosum*, y *Cucurbita* spp, entre otras (Moens *et al.*, 2009). La especie tiene la habilidad para establecerse exitosamente en plantas portadoras de genes de resistencia como lo son algunos genotipos de jitomate (*Mi-1*), papa (*Mh*), soya (*Mir1*) y chile (*N* y *Tabasco*); los cuales confieren resistencia dominante a las tres principales de especies de *Meloidogyne* (Castagnone-Sereno, 2012).

Como resultado del agallamiento radical inducido por los nematodos agalladores, las raíces son severamente afectadas en sus funciones de absorción y transporte de agua y nutrimentos; mostrando síntomas de enanismo, clorosis, marchitez e incluso la muerte (Sikora y Fernández, 2005; Moens *et al.*, 2009). El ciclo de vida comprende la etapa de huevecillo, cuatro juveniles, y la etapa adulta; dentro de los huevecillos ocurre la primera muda de J<sub>1</sub> a J<sub>2</sub> el cual posteriormente emerge e invade la raíz (en zonas cercanas al ápice) utilizando mecanismos físicos (estilete) y bioquímicos (secreciones conteniendo enzimas pectolíticas y celulíticas), migra intercelularmente y se aloja cerca del cilindro vascular donde inmediatamente induce la formación de células gigantes, durante esta etapa sedentaria el J<sub>2</sub> muda a J<sub>3</sub>, luego a J<sub>4</sub>, y finalmente al estado adulto; la hembra adulta oviposita en una matriz gelatinosa que es visible en la superficie de las agallas; exhiben un marcado dimorfismo sexual (machos vermiformes y hembras globosas); dependiendo de las condiciones ambientales y del hospedante el ciclo puede completarse entre 21 y 42 días (Abad *et al.*, 2009; Abad y Williamson, 2010).

### **Sitios especializados de alimentación: células gigantes y sincitios**

Los nematodos como *Meloidogyne* spp, *N. aberrans*, y los que se enquistan, han desarrollado estrategias sofisticadas para la inducción y mantenimiento de sitios especializados de alimentación (células gigantes y sincitios) en sus hospedantes susceptibles, garantizando la conclusión exitosa de su ciclo de vida (Gheysen y Fenoll, 2002; Gheysen y Mitchum, 2009). La naturaleza y función de las células gigantes inducidas por el género *Meloidogyne* son muy similares para todas sus especies; así, los J<sub>2</sub> se alojan en la zona de diferenciación del cilindro vascular (quedando su cabeza embebida en la periferia del tejido vascular y el resto de su cuerpo en la corteza), y cada individuo induce la rediferenciación de cinco a siete células parenquimatosas en típicas células gigantes multinucleadas (cada una con 100 núcleos aproximadamente) y son producto de divisiones nucleares repetidas sin citocinesis; las células modificadas funcionan como fuentes especializadas que proveen al nematodo de los nutrimentos necesarios para su crecimiento y reproducción; son metabólicamente activas, con citoplasma muy denso conteniendo numerosos plastidios, ribosomas, mitocondrias, aparato de Golgi y retículo endoplásmico liso organizado en espiral, la vacuola central

desaparece dando lugar a muchas vacuolas diminutas; conjuntamente con la formación del sitio, ocurre la hiperplasia e hipertrofia de las células corticales vecinas lo cual conduce a la formación de las típicas agallas (Abad *et al.*, 2003; Berg *et al.*, 2009; Abad *et al.*, 2009; Jones y Goto, 2011).

Los nematodos que se enquistan de los géneros *Globodera* y *Heterodera* inducen sitios especializados conocidos como sincitios. Una vez que el J2 se encuentra en el interior de la raíz, migra intracelularmente y se aloja cerca del cilindro vascular y elige una sola célula e inicia su modificación. En esta célula inicial ocurre el ensanchamiento progresivo de los plasmodesmos que la conectan con sus vecinas, provocando la fusión de protoplastos, las paredes celulares se disuelven de manera gradual y al final se forma un gran sincitio multinucleado (producto de la fusión de hasta 200 células) el cual constituye la única fuente de nutrimentos necesarios para que el nematodo complete su ciclo de vida (Grundler *et al.*, 1998; Sobczak y Golinowski, 2011; Turner y Rowe, 2006; Baum *et al.*, 2007). Ultraestructuralmente el sincitio se caracteriza por proliferación del citoplasma, reducción del volumen de las vacuolas, hipertrofia del núcleo y nucléolo; e incremento del retículo endoplásmico, ribosomas, plastidios, mitocondrias, microtúbulos y microfilamentos (Baum *et al.*, 2007; Sobczak y Golinowski, 2011).

Para *Meloidogyne* spp y los nematodos que se enquistan, se ha dilucidado que las secreciones de las glándulas esofágicas que son inyectadas mediante el estilete, son portadoras del arsenal de moléculas efectoras que tienen un papel fundamental durante la invasión de raíces, y durante la formación y mantenimiento del sitio especializado. Al respecto, se menciona que las dos glándulas subventrales son las más activas durante las etapas tempranas del parasitismo (penetración y migración, y eventos iniciales de formación del sitio), mientras que la glándula dorsal es más activa en etapas tardías de la formación y mantenimiento de esta estructura, así como durante la alimentación del nematodo; esta glándula es la mayormente implicada en la secreción de moléculas efectoras que modulan las respuestas del hospedante para beneficio del parásito (Abad *et al.*, 2009; Bird *et al.*, 2009; Gheysen y Mitchum, 2009; Szakasits *et al.*, 2009). *N. aberrans* comparte ciertas similitudes con *Meloidogyne* spp y con los nematodos que se

enquistan, induce la formación de agallas en raíces, que son producto de la hiperplasia e hipertrofia de las células que se constituyen en el sincitio; sin embargo, en contraste con ellos, el sitio especializado es inducido por la hembra J<sub>4</sub> o por la hembra inmadura; además, sus tres glándulas esofágicas son metabólicamente activas en J<sub>2</sub>, mientras que la actividad de la dorsal se acentúa mucho más en hembras jóvenes y maduras; no obstante, la implicación fisiológica de las secreciones durante el parasitismo de *N. aberrans* no está documentada (Jones y Payne, 1977; Manzanilla-López *et al.*, 2002). Un rasgo característico de los sitios especializados de los agalladores y los nematodos que se enquistan es el desarrollo de invaginaciones de la pared celular, típicas de células de transferencia, que muy probablemente incrementan la absorción de solutos desde el sistema vascular; sin embargo, en las células modificadas por *N. aberrans* no se observan dichas invaginaciones (Jones y Payne, 1977; de Almeida *et al.*, 2005).

### **Alteraciones moleculares inducidas por nematodos endoparásitos sedentarios**

La reprogramación génica inducida en el hospedante por el nematodo fitoparásito implica la sobre-expresión de aquellos genes cuyos productos favorecen al nematodo, mientras que aquellos que codifican para moléculas que pueden restringir su establecimiento y reproducción, son reprimidos; por ejemplo, en la interacción *Nicotiana tabacum* L.-*M. javanica* durante la formación del sitio especializado se han detectado sobre-expresiones de genes que codifican para proteínas de pared celular como la expansina y en *Solanum lycopersicum*-*M. incognita* el gen *EXPA5* (expansina) (Niebel *et al.*, 1993; Jammes *et al.*, 2005; Gal *et al.*, 2006); en contraste, se han observado represiones de genes relacionados con defensa. Un análisis transcriptómico global en la interacción *M. incognita*-*Arabidopsis thaliana*, indicó que el 70% de los genes alterados consistieron de genes asociados con las rutas dependientes del ácido jasmónico y etileno (cuyos productos tienen potencial antimicrobiano) y con factores de transcripción WRKY (asociados con mecanismos de defensa); tales genes fueron reprimidos (Jammes *et al.*, 2005; Caillaud *et al.*, 2008).

Como parte de las estrategias de supresión de mecanismos de defensa, se ha dilucidado que durante la fase temprana del parasitismo, este tipo de nematodos

producen enzimas corismato mutasas que potencialmente inactivan mecanismos de defensa que involucran a flavonoides, ácido salicílico y fitoalexinas (Caillaud *et al.*, 2008; Abad *et al.*, 2010). La glándula esofágica dorsal de *G. rostochiensis* secreta proteínas con dominio SPRY (SPRYSEC19) que regulan las respuestas de defensa de la planta hospedante (Sacco *et al.*, 2009) y se sabe que dos miembros de este tipo de proteínas, a su vez interactúan con proteínas de resistencia de la familia NB\_LRR, cuya interacción posiblemente conduce a una reducción de los mecanismos de defensa del hospedante, que en turno podrían favorecer la invasión y establecimiento exitoso del nematodo (Rehman *et al.*, 2009; Hassan *et al.*, 2010). Las proteínas con dedos de zinc 10A06, son moléculas efectoras que al interactuar con la espirmidina sintasa 2 generan un ambiente protector antioxidante en sincitios inducidos por *Heterodera glycines*, y *H. schachtii*, alterando la señalización por poliaminas e inhibiendo las respuestas de defensa del hospedante (Hassan *et al.*, 2010). También se ha demostrado que la calreticulina (Mi-CRT), secretada por *M. incognita* en el apoplasto de tejidos infectados, interfiere con los mecanismos de defensa del hospedante; así, Jaouannet *et al.*, (2013) reportan que las plantas transgénicas de *A. thaliana* con sobre-expresión del gen *Mi-CRT* fueron más susceptibles al nematodo y al oomiceto *Phytophthora parasitica* Dastur en contraste con las silvestres; tal sobre-expresión reprimió la expresión de genes de la ruta del ácido salicílico, jasmónico y de etileno. Por otra parte, se menciona que existen proteínas efectoras en la superficie cuticular del nematodo, que evaden o neutralizan las respuestas de defensa del hospedante durante la invasión; por ejemplo, la peroxirredoxina detectada en *M. incognita* y *Globodera rostochiensis*, elimina el peróxido de hidrógeno, protegiendo de esta forma al nematodo de la explosión oxidativa generada por el hospedante. Similarmente, las proteínas unidas a lípidos, presentes en *G. pallida* inhiben la actividad de la lipoxigenasa, una de las enzimas clave en rutas de señalización del ácido jasmónico (Vanholme *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2009; Dubreuil *et al.*, 2011). Todo lo anterior evidencia que las moléculas efectoras producidas por los nematodos actúan tanto a nivel transcripcional como post-traduccional.

## **Marchitez de chile (*Capsicum annum* L.) inducida por *Phytophthora capsici* Leonian**

La marchitez inducida por el oomiceto *P. capsici*, es de las más destructivas que afecta al cultivo de chile a nivel mundial, el patógeno infecta todas las partes de la planta en cualquier estado de desarrollo, induciendo pudriciones de raíz y de fruto, y tizones en hojas y tallos; además forma parte del complejo de patógenos con origen en el suelo causantes del ahogamiento en plántulas (Alcantara y Bosland, 1994; Erwin y Ribeiro, 1996; Sy *et al.*, 2005; Lamour *et al.*, 2012). La infección de raíces es evidente cuando se aprecia una pudrición del cuello, que afecta tejidos corticales y vasculares provocando el síntoma característico de marchitez y que subsecuentemente conduce a un rápido colapso y muerte de la planta; en épocas lluviosas, el inóculo del suelo puede dispersarse a la parte aérea por salpique y causar lesiones en hojas, tallos y frutos (Ristaino y Johnston, 1999; Lamour *et al.*, 2012).

El oomiceto se reproduce sexual y asexualmente, es heterotálico y por tanto para la producción de esporas sexuales (oosporas) se requiere que los dos tipos de compatibilidad (A1 y A2) entren en contacto, un tipo funciona como gametangio masculino (anteridio) y el otro como femenino (oogonio). Las oosporas son estructuras de supervivencia bajo condiciones adversas, y regularmente constituyen la principal fuente de inóculo primario, pudiendo germinar directamente mediante la formación de un tubo germinativo o indirectamente vía formación de esporangios (Ristaino y Johnston, 1999; Hausbeck y Lamour, 2004). Bajo condiciones ambientales favorables (25-28°C y alta humedad relativa) el oomiceto se reproduce asexualmente produciendo cantidades exorbitantes de esporangios sobre tejidos vegetales infectados, que en presencia de películas de agua, germinan indirectamente dando lugar a la formación de zoosporas (inóculo secundario); en estas condiciones, la germinación directa de los esporangios también es común. Las zoosporas motiles al entrar en contacto con la superficie de la planta, se enquistan y producen un tubo germinativo, el cual mediante un mecanismo enzimático penetra directamente en la cutícula y coloniza los tejidos de la planta hospedante (Lamour *et al.*, 2012). A menudo se menciona que ciertas especies de *Phytophthora* requieren esteroides para su crecimiento, reproducción sexual y formación

de hifas, y debido a que carecen de rutas biosintéticas de dichos metabolitos son totalmente dependientes de sus hospedantes para la obtención de dichos compuestos (Elliot, 1983; Hohl, 1983); por ejemplo, bajo condiciones *in vitro* el sitosterol y estigmasterol promovieron el crecimiento micelial de *Phytophthora sojae* Kaufmann y Gerdemann (Marshall *et al.*, 2001; Yousef *et al.*, 2009). *P. capsici* fue inicialmente descrito en 1922 infectando plantas de pimiento morrón en Nuevo México (Leonian, 1922), su rango de hospedantes es amplio incluyendo especies de plantas como tomate, berenjena, pepino, calabaza y melón, entre otros (Lamour *et al.*, 2012).

Las estrategias de manejo de la enfermedad por lo general involucran la utilización de fungicidas sistémicos tales como el metalaxil y mfenoxam que pertenecen al grupo químico de las fenilamidas, y otros compuestos (dimetomorf y zoxamida+mancozeb) que actualmente han dado buenos resultados; sin embargo, se ha demostrado el surgimiento de aislamientos del oomiceto resistentes a las fenilamidas (Parra y Ristaino, 2001; Hausbeck y Lamour, 2004; Café-Filho y Ristaino, 2008). Otras estrategias que se han implementado involucran prácticas culturales como la rotación de cultivos, drenaje adecuado y riego moderado, aunado a la utilización de genotipos resistentes y de agentes de control biológico como *Trichoderma harzianum* Rifai y *Bacillus subtilis* Ehrenberg (Sid *et al.*, 1999; Ristaino y Johnston, 1999; Hausbeck y Lamour, 2004; Lee *et al.*, 2008). La utilización de genotipos de chile resistentes a *P. capsici* representa una estrategia económica y ambientalmente amigable, y que a menudo constituye la parte medular del manejo integrado de este patosistema. A la fecha se han identificado diferentes genotipos de chile resistentes a este fitopatógeno, sin embargo, en la mayoría de ellos la resistencia se ve comprometida por su poca estabilidad frente a la existencia de razas fisiológicas del oomiceto, a excepción de algunos como la línea de chile tipo serrano “Criollo de Morelos” (CM334), considerado universalmente resistente a *P. capsici* (Glosier *et al.*, 2008).

### **La línea de chile tipo serrano “Criollo de Morelos” (CM334)**

La línea de chile “Criollo de Morelos” (CM334) exhibe un alto grado de resistencia a diferentes aislamientos de *P. capsici* en varias partes del mundo (Gil-Ortega *et al.*, 1991;

Oelke *et al.*, 2003), debido a que el oomiceto dispara una respuesta hipersensitiva (RH) a nivel de raíz, tallo y follaje (Fernández-Pavía, 1997; Candela *et al.*, 2000; Ueeda *et al.*, 2006); se menciona que esta resistencia es conferida por tres genes diferentes e independientemente regulados (uno para cada sistema) (Sy *et al.*, 2005). También se reporta que ciertos caracteres morfológicos de este genotipo, como las vellosidades en tallo y hojas, contribuyen en dicha resistencia restringiendo la habilidad del oomiceto para adherirse fácilmente al tejido de la planta lo cual retrasa la invasión (Egea-Gilabert *et al.*, 2008).

El genotipo CM334 ostenta además resistencia termoestable a las tres principales especies de *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*), la cual es conferida por el gen *Me7* que se expresa mediante una RH. Cabe mencionar que la necrosis en el tejido cortical asociada a dicha respuesta fue más temprana para *M. arenaria* (1 día post-inoculación, dpi) y *M. javanica* (1-2 dpi) que para *M. incognita* (3 dpi) (Pegard *et al.*, 2005; Djian-Caporalino *et al.*, 2007). Pegard *et al.*, (2005) sugirieron que CM334 podría exhibir dos tipos de resistencia a estas tres especies, la primera representada por barreras físicas o la exudación de algún compuesto nematostático, que pudo haber interferido con la penetración de los J<sub>2</sub>, lo cual podría explicar el reducido porcentaje de penetración registrado; mientras que la segunda evitó la formación de agallas y masas de huevecillos al bloquear la migración, desarrollo y reproducción del nematodo; fue en esta resistencia donde la RH y la acumulación de ácido clorogénico estuvieron predominantemente implicados. CM334 también es portador del gen *Mech1*, el cual confiere resistencia a *M. chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo y Finley, 1980 (Djian-Caporalino *et al.*, 2007; Gisbert *et al.*, 2013). Además, CM334 es resistente a los potyvirus *Pepper mottle virus* (PepMoV) y múltiples aislamientos del *Potato virus Y* (PVY), los cuales disparan una RH que en consecuencia imposibilita la multiplicación del virus; esta resistencia es conferida por el gen dominante *Pvr4* (Dogimont *et al.*, 1996; Janzac *et al.*, 2009), que también le confiere resistencia contra el *Ecuadorian rocoto virus* (ERV) y el *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Janzac *et al.*, 2009).

## Mecanismos moleculares implicados en la resistencia a *P. capsici*

En genotipos de Chile en general, la respuesta hipersensitiva constituye el principal mecanismo de resistencia al oomiceto a nivel de raíz, tallo y follaje (Egea *et al.*, 1996b; Fernández-Pavía, 1997; Ueeda *et al.*, 2006). Este mecanismo está asociado con cambios en la expresión de genes relacionados con defensa y en la acumulación de sus productos, así por ejemplo se han observado incrementos en la expresión de genes tales como los siguientes: *GLU* que codifica para  $\beta$ -1, 3-glucanasas (Silvar *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012); *PR-1*, y *POX* para peroxidasas (Silvar *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012), *OPR-3* para la 12-oxofitodienoato reductasa, asociada con la biosíntesis de ácido jasmónico (Ueeda *et al.*, 2006); y los genes *HMG2*, *SC*, y *EAS*, que codifican para las enzimas (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoenzimaA reductasa, sesquiterpeno ciclasa, y 5-epi-aristolóqueno sintasa) responsables de la síntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas como el capsidiol, a través de la ruta mevalónica (Zavala-Páramo *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2003; Silvar *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). En respuesta al ataque por *P. capsici* se han observado incrementos en la actividad de  $\beta$ -1, 3-glucanasas, peroxidasas, y de la fenilalanina amonio liasa (Fernández-Pavía, 1997; Egea *et al.*, 1999; López-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Herrera *et al.*, 2012); adicionalmente se han registrado incrementos en el contenido de capsidiol (Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000) y fenoles con propiedades antimicrobianas, entre los cuales destaca el ácido trans-cinámico (Candela *et al.*, 1995). También, durante la RH disparada por el oomiceto, se generan moléculas de señalización como el óxido nítrico, ácido jasmónico y ácido salicílico (Requena *et al.*, 2005; Ueeda *et al.*, 2006).

El análisis transcriptómico global de la interacción CM334-*P. capsici* (incompatible) y NM6-4-*P. capsici* (compatible) reveló que 168 genes fueron dramáticamente alterados en su expresión, de éstos los mayormente expresados en la planta fueron proteínas relacionadas con patogénesis (PRs), catalasas y asparagina sintetasa; y 22 de ellos fueron sobre-expresados únicamente en el material resistente, predominando uno que codifica para proteínas de pared celular posiblemente implicadas en la RH (Richins *et al.*, 2010). Recientemente en la interacción CM334-*P.*

*capsici*, Yeom *et al.*, (2011) encontraron una sobre-expresión de 26 genes que codifican para PRs y otras proteínas con propiedades antifúngicas; así como de 13 genes más que codifican para proteasas e inhibidores de proteasas involucrados en defensa a estrés biótico.

### **Implicación del capsidiol en la resistencia a *P. capsici***

El capsidiol es un sesquiterpeno bicíclico dihidroxilado sintetizado por algunas solanáceas como *C. annuum* y *N. tabacum* en respuesta a estrés biótico y abiótico (Zhao *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2005). En ciertos genotipos de Chile, la acumulación de esta fitoalexina está asociada con la resistencia a *P. capsici* a nivel de raíz, tallo y follaje (Ward, 1976; Molot *et al.*, 1981; Egea *et al.*, 1996a). Se ha demostrado que la presencia de ambos grupos OH son necesarios para que el capsidiol exhiba esta propiedad (Arreola-Cortés *et al.*, 2007). *In vitro*, el compuesto afecta el desarrollo de *P. capsici*, ya que a concentraciones de 3.5 mM tiene un efecto fungistático, y a concentraciones superiores a 5 mM funciona como fungicida (Egea *et al.*, 1996a). *In vivo*, el capsidiol se acumuló en tallos del cultivar Smith-5 resistente a *P. capsici* en cantidades inhibitorias a los 3, 6, y 9 días post-inoculación (dpi), registrándose el mayor nivel a los 6 dpi, el cual fue suficiente para detener el avance de la infección (Egea *et al.*, 1996b); por otra parte, a 6 dpi, la máxima acumulación detectada en tallos del genotipo CM334 fue de 362.70 µg/g de tejido, en respuesta al ataque por el oomiceto (Candela *et al.*, 2000).

### **Rompimiento de resistencia de Chile CM334 inducido por *N. aberrans***

Los nematodos *Meloidogyne* spp y *N. aberrans* establecen una interacción íntima y sofisticada con sus hospedantes susceptibles, lo cual puede conducir a una interacción sinérgica con otros patógenos con origen en el suelo (como hongos y oomicetos) intensificando la severidad de la enfermedad que estos últimos inducen (Back *et al.*, 2002; Abad *et al.*, 2010). También la infección por estos nematodos puede comprometer la resistencia de ciertas plantas a un patógeno en particular, fenómeno conocido como “rompimiento de resistencia” (Back *et al.*, 2002; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Manzanilla-López y Starr, 2009).

A pesar del alto grado de resistencia a *P. capsici* mostrado por el genotipo de Chile CM334, se ha demostrado que estas plantas se comportan como susceptibles al oomiceto cuando son previamente infectadas por *N. aberrans*; la máxima expresión de este fenómeno fue evidente a los 21 días posteriores a la inoculación con 2000 larvas del segundo estadio (J<sub>2</sub>) y con 300 000 zoosporas del oomiceto por planta (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). Dicho fenómeno, podría explicarse por los cambios transcripcionales y metabólicos inducidos por el nematodo en la raíz de la planta hospedante (Zavaleta-Mejía, 2002; Godínez-Vidal *et al.*, 2010; Villar-Luna *et al.*, 2009; López-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Herrera, *et al.*, 2012; Godínez-Vidal *et al.*, 2013). En plantas de CM334 infectadas por *N. aberrans* ocurren importantes alteraciones en sus mecanismos de defensa; el contenido de fenoles solubles totales (FST) y de capsidiol, así como la actividad de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y peroxidasas se redujo en plantas infectadas solo con el nematodo o en combinación con *P. capsici*, en comparación con las plantas inoculadas únicamente con el oomiceto (Godínez-Vidal *et al.*, 2008; Godínez-Vidal *et al.*, 2010; López-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Se tiene además evidencia de que el capsidiol es tóxico a juveniles del segundo estadio de *N. aberrans* (Godínez-Vidal *et al.*, 2010) y que la RH a *P. capsici* o a *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* en el follaje de CM334, se retrasó en plantas previamente infectadas por el nematodo y que tal retraso se asoció con una reducción en el contenido de capsidiol (Villar-Luna *et al.*, 2009); de igual manera, Sandoval-Luna (2011) encontró que en plantas CM334 infectadas por el nematodo e inoculadas con el oomiceto en las hojas o tallo, la actividad de la enzima PAL y el contenido de FST fueron reducidos en raíces, tallos, y hojas. Asimismo, en raíces de Chile CM334 inoculadas solo con *N. aberrans* se observó una expresión reducida de los genes: *EAS* (que codifica para 5-epiaristoliqueno sintasa, enzima implicada en la biosíntesis de capsidiol); *PR-1*, *POX* (peroxidasas), y *GLU* ( $\beta$ -1,3-glucanasas); en cambio en raíces inoculadas únicamente con *P. capsici* hubo una mayor expresión; además, en raíces inoculadas con ambos patógenos se observó una acumulación tardía de transcritos del gen *EAS* (Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Todo lo anterior indica que la infección por *N. aberrans* interfiere local y sistémicamente con los mecanismos de defensa de la planta, lo que favorece su

establecimiento y le permite completar su ciclo de vida; tales alteraciones podrían también promover el establecimiento exitoso de *P. capsici*.

### **Biosíntesis de isoprenoides en plantas (ruta del mevalonato)**

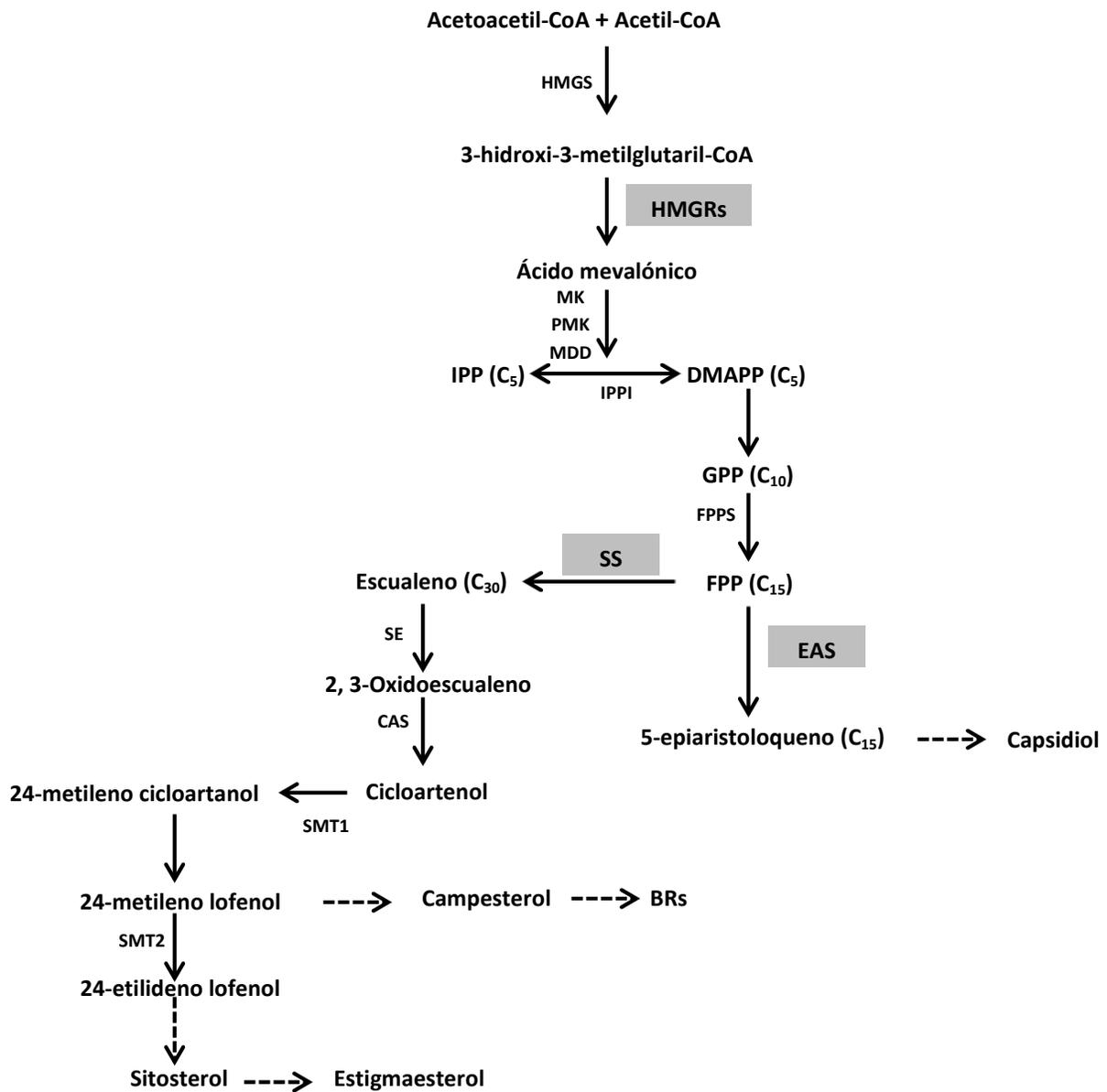
Los isoprenoides (también conocidos como terpenoides) en plantas constituyen un grupo estructuralmente diverso de compuestos que pueden ser divididos en dos clases: metabolitos primarios y secundarios (Chappell, 1995). Los metabolitos primarios incluyen esteroides, carotenoides, reguladores del crecimiento y quinonas, entre otros; mientras que los secundarios incluyen monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), y diterpenos (C<sub>20</sub>), los cuales son fundamentales en las interacciones de las plantas con su ambiente, por ejemplo planta-planta, planta-insecto, y planta-patógeno (Chappell, 1995; Kirby y Keasling, 2009). Todos los isoprenoides son sintetizados a partir de dos bloques de construcción de cinco carbonos (C<sub>5</sub>): pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), denominados unidades isoprénicas. En plantas superiores y algunos grupos de algas, estos precursores universales pueden ser producidos por dos rutas diferentes: la del ácido mevalónico (MVA) o por la 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulosa (DXP), las cuales difieren en su localización, la primera tiene lugar en el citosol/reticulo endoplásmico, y la segunda en los plastidios (Rodríguez-Concepción, 2006; Kirby y Keasling, 2009).

La biosíntesis del mevalonato inicia cuando dos moléculas de acetil CoA reaccionan para formar acetoacetyl-CoA, y por adición de una tercer molécula de acetil CoA ocurre la formación de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) por acción de la HMG-CoA sintasa (HMGS). Posteriormente, el grupo carboxilo esterificado de HMG-CoA es reducido por dos moléculas de NADPH a un grupo hidroxilo, conduciendo a la síntesis del mevalonato en una reacción irreversible catalizada por la HMG-CoA reductasa (HMGR). El mevalonato formado tiene tres fosforilaciones sucesivas, las dos primeras son fosforilaciones directas que ocurren por reacciones de sustitución nucleofílica en el fósforo terminal del ATP, convirtiendo el mevalonato a fosfomevalonato en una reacción catalizada por la mevalonato cinasa (MK); luego, el fosfomevalonato reacciona con un segundo ATP para generar difosfomevalonato, reacción catalizada por la

fosfomevalonato quinasa (PMK); enseguida, la mevalonato difosfato descarboxilasa (MDD) cataliza la descarboxilación del difosfomevalonato para formar pirofosfato de isopentenilo (IPP). El IPP es isomerizado a pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), en una reacción catalizada por la isopentenil pirofosfato isomerasa (IPPI); después, la geranil pirofosfato sintasa (GPPS) cataliza la condensación del IPP y DMAPP para formar pirofosfato de geranilo (GPP) (C<sub>10</sub>), y subsecuentemente, 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) precursor común de esteroides, triterpenos y sesquiterpenos (Figura 1) (Heldt y Piechulla, 2011; Mizioroko, 2011).

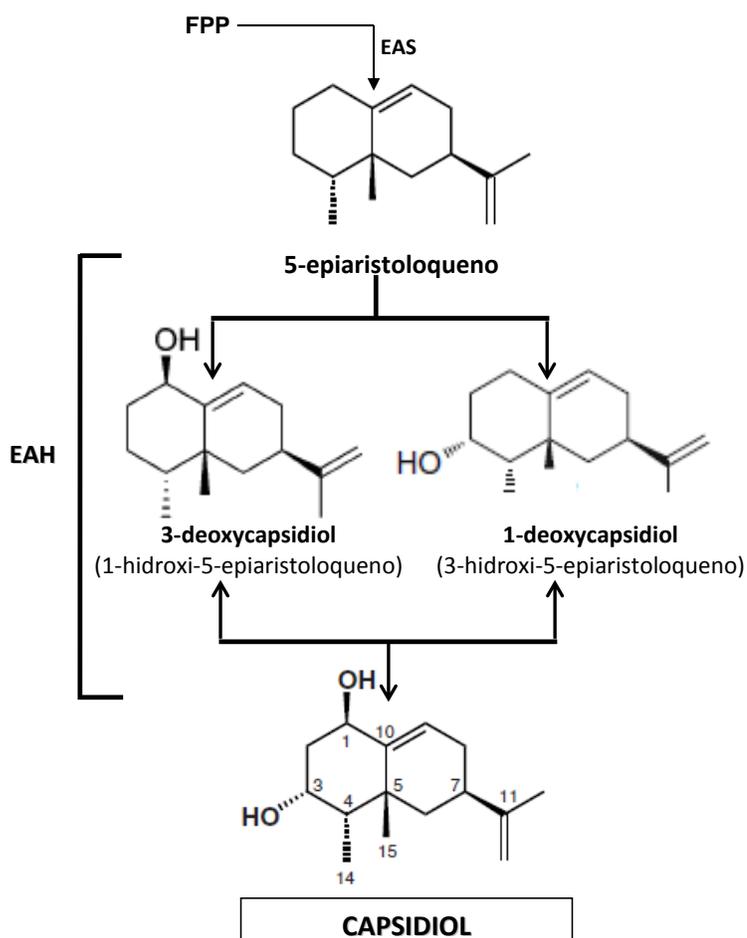
Los fitoesteroides son componentes esenciales de membranas de las células vegetales, regulan su fluidez y permeabilidad; el sitoesterol, campesterol y estigmaesterol, son los más comunes en plantas. La biosíntesis de estos compuestos inicia con la condensación de dos moléculas de pirofosfato de farnesilo (FPP) para formar escualeno, en una reacción catalizada por la escualeno sintasa (SS), posteriormente la escualeno epoxidasa (SE) cataliza la oxidación del escualeno a 2,3-oxidoescualeno, y después de una ciclización convertirse en cicloartenol por acción de la cicloartenol sintasa (CAS) (Bouvier *et al.*, 2005; Suzuki y Muranaka, 2007). Además de CAS, las plantas poseen otras oxidoescualeno ciclasas que promueven la formación de una gran variedad de triterpenos pentacíclicos como las saponinas (Benveniste, 2002). Las proporciones de campesterol y sitoesterol están determinadas por la actividad de las esterol metiltransferasas (SMT1 y SMT2); de esta forma, SMT1 cataliza la metilación del cicloartenol para formar 24-metileno cicloartanol, el cual luego de sucesivas modificaciones es convertido en 24-metileno lofenol, y éste en 24-metileno colesterol, el precursor inmediato del campesterol; mientras que la SMT2 es responsable de la metilación de 24-metileno lofenol generando 24-etilidene lofenol, el cual es conducido a la formación de sitoesterol, y a partir de éste se deriva el estigmasterol (Benveniste, 2002). Cabe mencionar, que del campesterol se deriva el campestanol, que subsecuentemente es conducido a la formación de brasinoesteroides, una clase de hormonas implicada en la regulación del crecimiento y desarrollo, y varias respuestas

fisiológicas en plantas, como defensa frente a factores bióticos y abióticos (Fujioka y Yokota, 2003; Bari y Jones, 2009).



**Fig. 1.** Ruta simplificada de biosíntesis de fitoesteros y capsidiol (fitoalexina sesquiterpénica). Se remarcan en gris las enzimas correspondientes a los transcritos cuya acumulación fue determinada en este trabajo. HMGS: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa; HMGRs: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasas; MK: mevalonatocinasa; PMK: fosfomevalonato cinasa; MDD: mevalonato difosfato descarboxilasa; IPP: pirofosfato de isopentenilo; IPPI: IPP isomerasa; DMAPP: pirofosfato de dimetilalilo; GPP: pirofosfato de geranilo; FPP: pirofosfato de farnesilo; FPPS: FPP sintasa; SS: escualeno sintasa; SE: escualeno epoxidasa; CAS: cicloartenol sintasa; SMT1 y SMT2: esteroles metiltransferasas; BRs: brasinoesteroides; EAS: 5-epiaristoliqueno sintasa.

La biosíntesis del capsidiol está regulada por dos enzimas clave: la 5-epiaristoliqueno sintasa (EAS), que cataliza la ciclización del difosfato de farnesilo (FPP) para formar el intermediario bicíclico 5-epiaristoliqueno (EA); posteriormente, el 5-epiaristoliqueno es regio- y estereo-específicamente hidroxilado en los carbonos 1 y 3 por una segunda enzima la epi-aristoliqueno dihidroxilasa (EAH) para finalmente dar lugar a la formación de capsidiol (Takahashi *et al.*, 2005) (Figura 2).



**Fig. 2.** Ruta de biosíntesis del capsidiol. FPP: pirofosfato de farnesilo; EAS: 5-epiaristoliqueno sintasa; EAH: 5-epiaristoliqueno dihidroxilasa.

## Regulación de la expresión de *HMG2*, *SC*, y *SS* en interacciones planta-patógeno

En plantas, la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) cataliza el paso clave de regulación para la biosíntesis de esteroides y sesquiterpenos (Figura 1); esta enzima es codificada por una familia multigénica cuyos miembros son diferencialmente regulados frente a estímulos endógenos y exógenos; por ejemplo, en raíces de *C. annuum* (cv. Nockwang) la expresión del isógeno *HMG2* fue activada en respuesta al ataque por *P. capsici*, y se asoció con la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas; mientras que para *HMG1* no se detectaron transcritos; y el gen *HMG3* se expresó constitutivamente en frutos (Ha *et al.*, 2003). Similarmente, en *Solanum tuberosum* la expresión de tres isógenos fue modificada en respuesta al ataque por una raza incompatible de *P. infestans*, los genes *HMG2* y *HMG3* se sobre-expresaron y el *HMG1* mostró una expresión reducida; tales expresiones se asociaron con incrementos en la acumulación de fitoalexinas sesquiterpénicas y decrementos en el contenido de esteroides, respectivamente (Choi *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1994). En *S. lycopersicum* también se observó una expresión diferencial de *HMG1* y *HMG2*, en respuesta al tratamiento con elicitores (ácido araquidónico o fragmentos de paredes celulares fúngicas), se disparó la expresión de *HMG2* mientras que *HMG1* no se activó; en este sistema *HMG2* se asoció con la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas, y *HMG1* con la biosíntesis de esteroides (Cramer *et al.*, 1993; Weissenborn *et al.*, 1995); además, en plantas transformadas de *S. lycopersicum*, la infección por *M. incognita* y *M. hapla* condujo a una fuerte activación del promotor *HMG2* (Cramer *et al.*, 1993). En raíces de *Arabidopsis thaliana* los altos niveles de la proteína AtHMGR en respuesta a la infección por *M. incognita* (Fenoll *et al.*, 1997), podrían corresponder a la alta demanda de esteroides requerida por el nematodo. Así mismo, en raíces de plantas de tabaco transformadas, se registró una fuerte inducción del gen *AtHMG1* en respuesta al establecimiento del sitio especializado de alimentación inducido por nematodos agalladores; los nematodos fitoparásitos debido a su incapacidad para sintetizar sus propios esteroides son totalmente dependientes de sus plantas hospedantes para abastecerse de dichos compuestos necesarios para completar su ciclo de vida (Chitwood y Lusby, 1991; Fenoll *et al.*, 1997).

La biosíntesis de esteroides, es regulada a nivel post-mevalonato por las enzimas escualeno sintasa (SS) y cicloartenol sintasa (CAS) (Figura 1) (Stermer *et al.*, 1994; Chappell, 1995; Susuki y Muranaka, 2007). Se ha documentado que el estrés biótico o abiótico, induce cambios en el curso normal de la biosíntesis de isoprenoides, desviando la ruta a la producción de fitoalexinas sesquiterpénicas (Takahashi *et al.*, 2007). En este proceso, un punto clave estrictamente regulado, es la utilización del intermediario pirofosfato de farnesilo (FPP), ya que de éste también se derivan compuestos que forman parte del metabolismo primario como los esteroides (Vögeli and Chappell, 1988; Takahashi *et al.*, 2007). Se ha sugerido que el mecanismo de regulación implica la existencia de un interruptor metabólico entre la síntesis de esteroides y fitoalexinas (Takahashi *et al.*, 2007). Por ejemplo, en tabaco, la acumulación de capsidiol, inducida por celulosa, condujo a la inhibición de la SS (Threlfall y Whitehead, 1988). Esto tiene relación con lo anteriormente descrito sobre la expresión elevada de *HMG2* y *HMG3* (asociados con fitoalexinas sesquiterpénicas), y la subsecuente represión de *HMG1* (asociado con biosíntesis de esteroides) en la interacción incompatible *S. tuberosum*-*P. infestans*; (Choi *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1994).

La enzima 5-epiaristológeno sintasa (EAS) es una sesquiterpeno ciclasa (SC) implicada en la biosíntesis del capsidiol. En *C. annuum*, en respuesta al ataque por *P. capsici*, se ha observado una marcada expresión del gen *EAS* y *SC* (Zavala-Paramo *et al.*, 2000; Silvar *et al.*, 2008). En la misma interacción Ha *et al.* (2003) consignaron una expresión coordinada de los genes *HMG2* y *SC*, este hecho sugiere que el isógeno *HMG2* está implicado en la biosíntesis de capsidiol, cuya acumulación también es concordante con la expresión de *EAS* (Bohlmann *et al.*, 2002; Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). La expresión de este gen fue reducida en la interacción compatible CM334-*N. aberrans* (Fernández-Herrera *et al.*, 2012), lo cual tiene sentido pues el capsidiol fue tóxico a los J<sub>2</sub> de *N. aberrans* (Godínez-Vidal *et al.*, 2010).

## Factores de transcripción WRKY

Los factores de transcripción son proteínas que tienen la habilidad para unirse a secuencias específicas de DNA para regular la transcripción en los procesos fisiológicos de las plantas. Esta regulación responde a estímulos internos (ej. hormonas vegetales) y externos (elicitores bióticos y abióticos); estos últimos pueden inducir la producción de señales internas, y cada factor puede regular más de un gen (Vom Endt, 2002). Varios tipos de factores de transcripción han sido implicados en defensa de las plantas frente a estrés biótico; por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., se han reportado los factores TGA-Bzip, ERF, Myb, Whirly, y WRKY capaces de unirse a elementos promotores de genes relacionados con defensa para regular su expresión (Eulgem, 2005).

En plantas superiores, los factores WRKY constituyen una de las familias de proteínas más extensas de reguladores transcripcionales con funciones clave frente al estrés biótico (ataque por hongos, bacterias y nematodos) (Rushton *et al.*, 2010). El mecanismo de regulación implica la activación o represión transcripcional, para ello se unen a una secuencia consenso de la región promotora del gen blanco para regular su expresión, la secuencia consenso reconocida por los factores WRKY es conocida como caja W [(T)GACC/T]; cabe mencionar que la auto-regulación de estos factores también es factible (Eulgem, 2005). La caja W es común en genes de defensa incluyendo los que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) (Eulgem *et al.*, 2000). Las proteínas WRKY son codificadas por una familia multigénica, así por ejemplo, en *A. thaliana*, se reporta la existencia de 74 isógenos WRKY (Rushton *et al.*, 2010), 81 en *Solanum lycopersicum* L. (Huang *et al.*, 2012), mientras que para *Capsicum annuum* L., se ha reportado a los isógenos WRKY-a, WRKY1, WRKYb, WRKYd, WRKY58, WRKY40, WRKY30, y WRKY2 (Park *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2011; Jingyuan *et al.*, 2011; Huh *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Dang *et al.*, 2013) que actúan como reguladores positivos o negativos en interacciones de las plantas con su ambiente. Así, Dong *et al.*, (2003) encontraron que en *A. thaliana*, 49 de 72 genes WRKY evaluados se sobre-expresaron tempranamente en respuesta al ataque por un aislamiento avirulento de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* o al tratamiento con ácido salicílico.

Similarmente, Park *et al.* (2006) reportaron que en plantas de *Capsicum annuum* el gen *WRKY-a* se sobre-expresó durante la respuesta hipersensitiva a *Tobacco mosaic virus* (TMV) y a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y sugirieron su implicación en la activación de mecanismos de defensa contra patógenos. También en Chile, la activación del gen *WRKY1* por patógenos ha sido documentada, por ejemplo, Oh *et al.*, (2008) encontraron que en la interacción incompatible *C. annuum* (cv. ECW-20R)-*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) la expresión del gen *WRKY1* fue más temprana e intensa en contraste con la compatible *C. annuum* (cv. ECW)- *Xcv*; el gen *PR-1* también se sobre-expresó con una tendencia similar en ambas interacciones pero con mayor intensidad que *WRKY1*. Así mismo, los genes *WRKY30*, *WRKY2* y *WRKY-a* han sido implicados en la resistencia de ciertos genotipos de Chile a *M. incognita* (Li *et al.*, 2008; Jingyuan *et al.*, 2011).

Ciertos factores WRKY también actúan como reguladores negativos en mecanismos de defensa, por ejemplo, en la interacción compatible *A. thaliana*-*Heterodera schachtii* la infección por el nematodo disparó la sobre-expresión del gen *AtWRKY23*, y cuando se silenció al gen, la infección por el nematodo fue reducida (Grunewald *et al.*, 2008). Similarmente, Oh *et al.*, (2008) demostraron que el silenciamiento del gen *WRKY1* en plantas transgénicas de *C. annuum* (cv. Bukang) promovió los mecanismos de defensa frente a *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (naturalmente compatible), y los síntomas de la enfermedad fueron considerablemente reducidos en contraste con las plantas no transformadas. De igual manera, en plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc) sobre-expresando el gen *WRKY1*, se detectaron niveles reducidos de resistencia basal a *Tobacco mosaic virus* y las plantas transgénicas fueron incapaces de restringir el avance de la infección en comparación con las plantas control; en la mayoría de estas líneas transgénicas de tabaco, el tratamiento previo con ácido salicílico, condujo a una expresión reducida de genes de defensa que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (*PR1*, *PR2*, *PR4* y *PR5*), en comparación con las plantas no tratadas (Oh *et al.*, 2008). Todas estas evidencias sugieren que la proteína WRKY1 estaría actuando como un regulador negativo de mecanismos de defensa.

## Proteínas relacionadas con patogénesis

Como parte de los mecanismos de defensa frente al estrés biótico, las plantas responden con la generación de especies reactivas de oxígeno, acumulación de metabolitos secundarios como fitoalexinas, taninos, compuestos fenólicos, y la producción de proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) (Sels *et al.*, 2008). Las PRs son de bajo peso molecular y su acumulación se incrementa en respuesta al ataque por patógenos como hongos, bacterias, virus, y nematodos; sin embargo, también pueden ser inducidas por aplicaciones exógenas de etileno, ácido indolacético y ácido absícico, por daño mecánico y otras formas de estrés abiótico (Van Loon, 1997; Vidhyasekaran, 2008). La producción de dichas proteínas con frecuencia se asocia con la resistencia sistémica adquirida frente a patógenos, y se acumulan tanto en interacciones compatibles como en incompatibles, su acumulación es mayor y más rápida en estas últimas (Van Loon, 1997). A la fecha están reconocidas oficialmente 17 familias de PRs, las cuales se resumen en el Cuadro 1 (Sels *et al.*, 2008).

**Cuadro 1. Clasificación de proteínas relacionadas con patogénesis (Sels *et al.*, 2008)**

PRs	Miembro tipo	Propiedades
PR-1	Tabaco PR-1a	Antifúngica
PR-2	Tabaco PR-2	$\beta$ -1, 3 glucanasa
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinasa (clase I-VI)
PR-4	Tabaco R	Quitinasa (clase I-II)
PR-5	Tabaco S	Tipo taumatina
PR-6	Jitomate Inhibidor I	Inhibidor de proteinasa
PR-7	Jitomate P <sub>69</sub>	Endoproteinasa
PR-8	Pepino quitinasa	Quitinasa clase III
PR-9	Tabaco "peroxidasa formadora de lignina"	Peroxidasa
PR-10	Perejil "PR1"	Tipo ribonucleasa
PR-11	Tabaco quitinasa "clase V"	Quitinasa clase I
PR-12	Rabano Rs-AFP3	Defensina
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	Tionina
PR-14	Cebada LTP4	Proteína de transferencia de lípidos
PR-15	Cebada OxOa (germin)	Oxalato oxidasa
PR-16	Cebada OxOLP	Tipo oxalato oxidasa
PR-17	Tabaco PRp27	Desconocida

En *C. annuum* se ha dilucidado la implicación del gen *PR-1* (proteína relacionada con patogénesis 1) en respuesta al ataque por el oomiceto *P. capsici*; al respecto, Lee *et al.*, (2000) reportan una fuerte sobre-expresión del gen en la interacción incompatible *C. annuum* (cv. Hanbyul)-*P. capsici* (avirulento) en contraste con la compatible *C. annuum* (cv. Hanbyul)-*P. capsici* (virulento). Similarmente, en plantas del cv. Hanbyul, el ataque por un aislamiento avirulento de *X. campestris* pv. *vesicatoria* condujo a una sobre-expresión de *PR-1*, en contraste, niveles de expresión reducidos fueron registrados en respuesta al aislamiento virulento (Kim y Hwang, 2000). La conocida actividad antifúngica de *PR-1* podría limitar el avance y multiplicación exitosa del oomiceto en plantas de Chile (Lee *et al.*, 2000); además, se menciona que la sobre-expresión de *PR-1* parece estar implicada en el reforzamiento de paredes celulares de la planta hospedante en respuesta al ataque por patógenos (Vidhyasekaran, 2008).

Por otra parte, las peroxidasas (POX) parecen contribuir en el fortalecimiento de paredes celulares mediante la deposición de lignina y suberina que restringen el avance y reproducción exitosa del patógeno; además, promueven la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la reacción de hipersensibilidad (Van Loon, 1997; Do *et al.*, 2003). Silvar *et al.*, (2008) reportan sobre-expresiones de los genes *PR-1* y *POX* en la interacción incompatible Chile CM331-*P. capsici*, mientras que en la compatible cv. Yolo Wonder- *P. capsici* los niveles de expresión fueron reducidos; similarmente, Fernández-Herrera *et al.*, (2012) encontraron altos niveles de transcritos de los genes *PR-1* y *POX* en raíces de Chile CM334 inoculadas con *P. capsici* (interacción incompatible), lo opuesto fue registrado en raíces de CM334 infectadas por el nematodo *Nacobbus aberrans* (interacción compatible), alteraciones similares fueron registradas en los niveles de actividad de peroxidasas. En genotipos de Chile resistentes al oomiceto, el incremento en la actividad de POX ha sido asociado con la acumulación de lignina; así, Egea *et al.*, (2001) encontraron que en plantas del genotipo Smith-5 inoculadas con *P. capsici* (interacción incompatible) la actividad de POX y la deposición de lignina fueron superiores a las registradas en el genotipo susceptible Yolo Wonder.

#### IV. LITERATURA CITADA

**Abad, P., Favery, B., Rosso, M. N., and Castagnone-Sereno, P. 2003.** Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Mol. Plant Pathol.* 4: 217-224.

**Abad, P., Castagnone-Sereno, P., Rosso, M. N., de Almeida, E. J., and Favery, B. 2009.** Invasion, feeding and development. *In: Perry, R. N., Moens, M., y Starr, J. L. (Eds.). Root-knot nematodes.* CAB International, Wallingford, UK. pp: 163-181.

**Abad, P., and Williamson, V. M. 2010.** Plant nematode interaction: a sophisticated dialogue. *Adv. Bot. Res.* 53: 147-192.

**Alcantara, T., and Bosland, P. 1994.** An inexpensive disease screening technique for foliar blight of chile pepper seedlings. *Hortscience* 29:1182-1183.

**Arreola-Cortés, A., Soriano-Bello, E. L., Lozoya-Gloria, E., Barriga-Guzmán, A., and García-Pineda, E. 2007.** The effect of acetylation of capsidiol phytoalexin on fungitoxic activity. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 40: 69-73.

**Back, M. A., Haydock, P. P. J., and Jenkinson, P. 2002.** Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. *Plant Pathol.* 51: 683-697.

**Bari, R., and Jones, J. D. G. 2009.** Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69: 473-488.

**Benveniste, P. 2002.** Sterol metabolism. *In: Somerville, C. R., y Meyerowitz, E. M. (Eds.). The Arabidopsis Book.* American Society of Plant Biologists. 1-31.

**Baum, T. J., Hussey, R. S., and Davis, E. L. 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.

**Berg, R. H., Fester, T., and Taylor, C. G. 2009.** Development of the root-knot nematode feeding cell. *In: Berg, R. H., y Taylor, C. G. (Eds.). Cell biology of plant nematode parasitism.* Plant Cell Monographs. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp: 115-152.

**Bird, M. D., Opperman, C. H., and Williamson, V. M. 2009.** Plant infection by root-knot nematode. *In: Berg, R. H., y Taylor, C. G. (Eds.). Cell biology of plant nematode parasitism.* Plant Cell Monographs. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp: 1-14.

**Bohlmann, J., Stauber, E. J., Krock, B., Oldham, N. J., Gershenzon, J., and Baldwin, I. T. 2002.** Gene expression of 5-epi-aristolochene synthase and formation of capsidiol in roots of *Nicotiana attenuata* and *N. sylvestris*. *Phytochemistry* 60: 109-116.

**Bouvier, F., Rahier, A., and Camara, B. 2005.** Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog. Lipid Res.* 44: 357-429.

**Brito, J. A., Stanley, J. D., Kaur, R., Cetintas, R., Di Vito, M., Thies, J. A., and Dickson, D. W. 2007.** Effects of the *Mi-1*, *N* and *Tabasco* genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. *J. Nematol.* 39: 327-332.

**Café-Filho, A. C., and Ristaino, J. B. 2008.** Fitness of isolates of *Phytophthora capsici* resistant to mefenoxam from squash and pepper fields in North Carolina. *Plant Dis.* 92:1439-1443.

**Caillaud, M. C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., Engler, J. de A., Abad, P., Rosso, M. N., and Favery, B. 2008.** Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *J. Plant Physiol.* 165:104-113.

**Candela, M. E., Alcázar, M. D., Espín, A., Egea, C., and Almela, L. 1995.** Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathol.* 44:116-123.

**Candela, M. E., Egea, C., García-Pérez, M. D., Costa, J., and Candela, M. 2000.** Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Hort.* 522: 79-86.

**Castagnone-Sereno, P. 2012.** *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*): profile of an emerging, highly pathogenic, root-knot nematode species. *Nematology* 14: 133-138.

**Chappell, J., VonLanken, C., and Vögeli, U. 1991.** Elicitor-inducible 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity is required for sesquiterpene accumulation in tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 97: 693-698.

**Chappell, J. 1995.** Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 521-547.

**Chitwood, D.J., and W.R. Lusby. 1991.** Metabolism of plant sterols by nematodes. *Lipids* 26:619-627.

**Choi, D., Ward, B. L., and Bostock, R. M. 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.

**Choi, D., Bostock, R. M., Avdiushko, S., and Hildebrand, D. F. 1994.** Lipid-derived signals that discriminate wound and pathogen responsive isoprenoid pathways in plants: Methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 2329-2333.

**Cramer, C.L., Weissenborn, D., Cottingham, C. K., Denbow, C. J., Eisenback, J.D., Radin, D. N. and Yu, X. 1993.** Regulation of defense-related gene expression during plant-pathogen interactions. *J. Nematol.* 25: 507-518.

**Dang, F. F., Wang, Y. N., Yu, L., Eulgem, T., Lai, Y., Liu, Z. Q., Wang, X., Qiu, A. L., Zhang, T. X., Lin, J., Chen, Y. S., Guan, D. Y., Cai, H. Y., Mou, S. L., and He, S. L. 2013.** CaWRKY40, a WRKY protein of pepper, plays an important role in the regulation of tolerance to heat stress and resistance to *Ralstonia solanacearum* infection. *Plant Cell Environ.* 36: 757-774

**de Almeida, E. J., Favery, B, Engler, G., and Abad, P. 2005.** Loss of susceptibility as an alternative for nematode resistance. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:112-117.

**Davis, E. L., Hussey, R. S., and Baum, T. J. 2009.** Parasitism genes: what they reveal about parasitism. *In: Berg, R. H., y Taylor, C. G. (Eds.). Cell biology of plant nematode parasitism. Plant Cell Monographs. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Pp: 15-44.*

**Decraemer, W., and Hunt, D. J. 2006.** Structure and classification. *In: Perry, R. N., y Moens, M. (Eds.). Plant nematology. CAB International. Wallingford, UK. pp: 3-32.*

**Djian-Caporalino, C., Fazari, A., Arguel, M. J., Vernie, T., VandeCastele, C., Faure, I., Brunoud, G., Pijarowski, L., Palloix, A., Lefebvre, V., and Abad, P. 2007.** Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theor. Appl. Genet.* 114: 473-486.

**Do, H. M., Hong, J. K., Jung, H. W., Kim, S. H., Ham, J. H., and Hwang, B. K. 2003.** Expression of peroxidase-like genes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 196-205.

**Dogimont, C., Palloix, A., Daubeze, A. M., Marchoux, G., Gebre-Selassie, K., and Pochard, E. 1996.** Genetic analysis of broad spectrum resistance to potyviruses using doubled haploid lines of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Euphytica* 88: 231-239.

**Dong, J., Chen, C., and Chen, Z. 2003.** Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol. Biol.* 51: 21-37.

**Dubreuil, G., Deleury, E., Magliano, M., Jaouannet, M., Abad, P., and Rosso, M. N. 2011.** Peroxiredoxins from the plant parasitic root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, are required for successful development within the host. *Int. J. Parasitol.* 41:385-396.

**Egea C., Alcazar, M. D., and Candela, M. E. 1996a.** Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* 98: 737-742.

**Egea, C., García, P. M. D., and Candela, M. E. 1996b.** Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. J. Plant Physiol. 149:762-764.

**Egea, E., Dickinson, M. J., Candela, M., and Candela, M. E. 1999.**  $\beta$ -1, 3-Glucanase isoenzymes and genes in resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici*. Physiol. Plant. 107:312-318.

**Egea, C., Ahmed, A. S., Candela, M., and Candela, M. E. 2001.** Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. J. Plant Physiol. 158: 151-158.

**Egea-Gilabert, C., Bilotti, G., Requena, M. E., Ezziyyani, M., Vivo-Molina, J .M., and Candela, M. E. 2008.** Pepper morphological traits related with resistance to *Phytophthora capsici*. Biol. Plant. 52:105-109.

**Elliot, C. G. 1983.** Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*. In: *Phytophthora*. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. D.C. Erwin, S. Bartniki-Garcia and P.H. Tsao eds. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. pp: 71-80.

**Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arro, M., and Boronat, A. 1994.** *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91:927-931.

**Enjuto, M., Lumbreras, V., Marin, C., and Boronat, A. 1995.** Expression of the *Arabidopsis HMG2* Gene, Encoding 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues. Plant Cell 7: 517-527.

**Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996.** *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. 562 p.

**Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., and Somssich, I. E. 2000.** The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends Plant Sci. 5: 199-206.

**Eulgem, T. 2005.** Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. Trends Plant Sci. 10:71-78.

**Fenoll, C., Grunder, F. M. W., and Ohl, S. A. 1997.** Cellular and molecular aspects of plant-nematode interactions. Kluwer academic publishers. Dordrecht, The Netherlands. 286 p.

**Fernández-Herrera, E., Rojas-Martínez, R.I., Guevara-Olvera, L., Rivas-Dávila, M. E., Valadez-Moctezuma, E., y Zavaleta-Mejía, E. 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 interactions in the root rot *Phytophthora capsici* / *Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph. D. Thesis. New Mexico State University. 109 p.

**Fujioka, S., and Yokota, T. 2003.** Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:137-164.

**Gal, T. Z., Aussenberg, E. R., Burdman, S., Kapulnik, Y. and Koltai, H. 2006.** Expression of a plant expansin is involved in the establishment of root knot nematode parasitism in tomato. *Planta* 224:155-162.

**Grundler, F. M. W., Sobczak, M., and Golinowski, W. 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.

**Gheysen, G., and Fenoll, C. 2002.** Gene expression in nematode feeding sites. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:191-219.

**Gheysen, G., and Mitchum, M. G. 2009.** Molecular insights in the susceptible plant response to nematode infection. *In: Berg, R. H., y Taylor, C. G. (Eds.). Cell biology of plant nematode parasitism. Plant Cell Monographs. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp: 45-81.*

**Gil-Ortega, R., Palazon, E. C., and Cuartero, Z. J. 1991.** Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line "SCM-334" *Plant Breed.* 107: 50-55.

**Gisbert, C., Trujillo-Moya, C., Sánchez-Torres, P., Sifres, A., Sánchez-Castro, E., and Nuez, F. 2013.** Resistance of pepper germplasm to *Meloidogyne incognita*. *Ann. Appl. Biol.* 162:110-118.

**Glosier, B. R., Ogundiwin, E.A., Sidhu, G. S., Sischo, D. R., and Prince, J. P. 2008.** A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiologica races of P. capsici in pepper. Euphytica* 162: 23-30.

**Godínez-Vidal, D., Rocha-Sosa, M., Sepúlveda-García, E. B., Lara-Reyna, J., Rojas-Martínez, R. I., and Zavaleta-Mejía, E. 2008.** Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 120:299-303.

**Godínez-Vidal, D., Soto-Hernández, M., Rocha-Sosa, M., Lozoya-Gloria, E., Rojas-Martínez, R. I., Guevara-Olvera, L., y Zavaleta-Mejía, E. 2010.** Contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por *Nacobbus aberrans* y su efecto en juveniles del segundo estadio. *Nematropica* 40:227-237.

**Godínez-Vidal, D. Rocha-Sosa, M., Sepúlveda-García, E. B., Lozoya-Gloria, E., Rojas-Martínez, R., Guevara-Olvera, L., and Zavaleta-Mejia, E. 2013.** Transcript accumulation of the mevalonate pathway genes and enzymatic activity of HMGC<sub>o</sub>A-r and EAS in chilli CM-334 infected by the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. Plant Soil. DOI: 10.1007/s11104-013-1743-8.

**Grunewald, W., Karimi, M., Wieczorek, K., Van de Cappelle, E., Wischnitzki, E., Grundler, F., Inzé, D., Beeckman, T., and Gheysen, G. 2008.** A role for AtWRKY23 in feeding site establishment of plant-parasitic nematodes. Plant Physiol. 148: 358-368.

**Ha, S. H., Kim, J. B., Hwang, Y. S., and Lee, S. W. 2003.** Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced *Hmg2* from pepper (*Capsicum annuum*). Biochim. Biophys. Acta 1625:253–260.

**Hassan, S., Behm, C. A., and Mathesius, U. 2010.** Effectors of plant parasitic nematodes that re-program root cell development. Funct. Plant Biol. 37:933-942.

**Hausbeck, M. K., and Lamour, K. H. 2004.** *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. Plant Dis. 88:1292-1303.

**Hohl, H. R. 1983.** Nutrition of *Phytophthora*. In: *Phytophthora*. Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology. D.C. Erwin, S. Bartniki-Garcia and P.H. Tsao (eds.). The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. pp: 41-54.

**Huang, S., Gao, Y., Liu, J., Peng, X., Niu, X., Fei, Z., Cao, S., and Liu, Y. 2012.** Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. Mol. Genet. Genomics 287: 495-513.

**Huh, S. U., Choi, L. M., Lee, G. J., Kim, Y. J., and Paek, K. H. 2012.** *Capsicum annuum* WRKY transcription factor d (CaWRKYd) regulates hypersensitive response and defense response upon *Tobacco mosaic virus* infection. Plant Sci. 197:50-58.

**Hunt, D. J., and Handoo, Z. A. 2009.** Taxonomy, identification and principal species. In: Perry, R. N., Moens, M., y Starr, J. L. (Eds.). Root-knot nematodes. CAB International, Wallingford, UK. pp: 55-97.

**Ithal, N., Recknor, J., Nettleton, D., Maier, T., Baum, T. J., and Mitchum, M. G. 2007.** Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. Mol. Plant-Microbe Interact. 20: 510-525.

**Jammes, F., Lecomte, P., de Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M. L., Renou, J. P., Abad, P., and Favery, B. 2005.** Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. Plant J. 44:447-458.

**Janzac, B., Fabre, M. F., Palloix, A., and Moury, B. 2009.** Phenotype and spectrum of action of the *Pvr4* resistance in pepper against potyviruses, and selection for virulent variants. *Plant Pathol.* 58:443-449.

**Jaouannet, M., Magliano, M., Arguel, M. J., Gourges, M., Evangelisti, E., Abad, P., and Rosson, M. N. 2013.** The root-knot nematode calreticulin Mi-CRT is a key effector in plant defense suppression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26:97-105.

**Jingyuan, Z., Xuexiao, Z., Zhenchuan, M., and Bingyan, X. 2011.** A novel pepper (*Capsicum annuum* L.) WRKY gene, *CaWRKY30*, is involved in pathogen stress responses. *J. Plant Biol.* 54: 329-337.

**Jones, M. G. K., Payne, H. L. 1977.** The structure of syncytia induced by the phytoparasitic nematode *Nacobbus aberrans* in tomato roots, and the possible role of plasmodesmata in their nutrition. *J. Cell Sci.* 23: 299-313.

**Jones, M. G. K., and Goto, D. B. 2011.** Root-knot nematodes and giant cells. *In:* Jones, J., Gheysen, G., y Fenoll, C. (Eds.). *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions.* Springer Dordrecht Heidelberg. pp: 83-100.

**Karssen, G., and Moens, M. 2006.** Root-knot nematodes. *In:* Perry, R. N., y Moens, M. (Eds.). *Plant nematology.* CAB International. Wallingford, UK. pp: 59-90.

**Kiewnick, S., Dessimoz, M., and Franck, L. 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. *J. Nematol.* 41:134-139.

**Kim, Y. J., and Hwang, B. K. 2000.** Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiol. Plant.* 108: 51-60.

**Kirby, J., and Keasling, J.D. 2009.** Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:335-355.

**Lamour, K. H., Stam, R., Jupe, J., and Huitema, E. 2012.** The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant Pathol.* 13: 329-337.

**Lee, Y. K., Hippe-Sanwald, S., Lee, S. C., Hohenberg, H., and Hwang, B. K. 2000.** In situ localization of PR-1 mRNA and PR-1 protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. *Protoplasma*, 211: 64-75.

**Lee, K. J., Kamala-Kannan, S., Sang, S. H., Kyu, S. C., and Woong, L., G. 2008.** Biological control of *Phytophthora* blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1139-1145.

**Leonian, L. H. 1922.** Stem and fruit blight of pepper caused by *Phytophthora capsici* species. *Phytopathology* 12: 401-408.

**Li, S. M., Mao, Z. C., Li, L., Feng, D. X., Yang, Y. H., and Xie, B. Y. 2008.** Isolation of WRKY genes in the incompatible interaction between *Meloidogyne incognita* and *Capsicum annuum*. *Acta Hortic. Sin.* 10:1467-1472.

**Lim, J. H., Park, C. J., Huh, S. U., Choi, L. M., Lee, G. J., Kim, Y. J., and Paek, K. H. 2011.** *Capsicum annuum* WRKYb transcription factor that binds to the *CaPR-10* promoter functions as a positive regulator in innate immunity upon TMV infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411: 613-619.

**Lopez-Martinez, N., Colinas-Leon, M. T., Peña-Valdivia, C. B., Salinas-Moreno, Y., Fuentes-Montiel, P., Biesaga, M., and Zavaleta-Mejía, E. 2011.** Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM-334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant Soil* 338: 399-409.

**Maldonado-Bonilla, L. D., Betancourt-Jiménez, M., and Lozoya-Gloria, E. 2008.** Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *Eur. J. Plant Pathol.* 121:439-449.

**Maleita, C. M. N., Hazemann, C. C. R., John, P. S., and Abrantes, I. 2012.** Host status of cultivated plants to *Meloidogyne hispánica*. *Eur. J. Plant Pathol.* 133:449-460.

**Manzanilla-López, R. H., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R.N., Lehman, P.S., Cid del Prado-Vera, I., Souza, R. M., and Evans, K. 2002.** The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32: 150-227.

**Manzanilla-López, R. H., and Starr, J. L. 2009.** Interactions with other pathogens. *In:* Perry, R. N., Moens, M., y Starr, J. L. (Eds.). *Root-knot nematodes*. CAB International, Wallingford, UK. Pp: 223-245.

**Marshall, J. A., Dennis, A. L., Kumazawa, T., Haynes, A. M., and Nes, W. D. 2001.** Soybean sterol composition and utilization by *Phytophthora sojae*. *Phytochemistry* 58: 423-428.

**Miziorko, H. M. 2011.** Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 505:131-143.

**Moens, M., Pery, R. N., and Starr, J. L. 2009.** *Meloidogyne* species- a diverse group of novel and important plant parasites. *In:* Perry, R. N., Moens, M., y Starr, J. L. (Eds.). *Root-knot nematodes*. CAB International, Wallingford, UK. pp: 1-17.

**Molot, P., Mas, M., P., Conus, M., Ferriere, H., and Ricci, P. 1981.** Relations between capsidiol concentration, speed of fungal invasion and level of induced resistance in

cultivars of pepper (*Capsicum annuum*) susceptible or resistant to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant Pathol.* 18:379-389.

**Niebel, A., de Almeida, E. J., Tire, C., Engler, G., Van Montagu, M., and Gheysen, G. 1993.** Induction patterns of an extensin gene in Tobacco upon nematode infection. *Plant Cell* 5:1697-1710.

**Oh, S., Yi, S. Y., Yu, S. H., Moon, J. S., Park, J. M., and Choi, D. 2006.** CaWRKY2, a chili pepper transcription factor, is rapidly induced by incompatible plant pathogens. *Mol. Cells* 22: 58-64.

**Oh, S. K., Baek, K. H., Park, J. M., Yi, S. Y., Yu, S. H., Kamoun, S., and Choi, D. 2008.** *Capsicum annuum* WRKY protein CaWRKY1 is a negative regulator of pathogen defense. *New Phytologist* 177: 977-989.

**Oelke, L. M., Bosland, P. W., and Steiner, R. 2003.** Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:213-218.

**Park, C. J., Shin, Y. C., Lee, B. J., Kim, K. J., Kim, J. K., and Paek, K. H. 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.

**Parra, G., and Ristaino, J. B. 2001.** Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Dis.* 85:1069-1075.

**Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P., and Djian-Caporalino, C. 2005.** Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95: 158-165.

**Rammah, A., and Hirschmann, H. 1988.** *Meloidogyne mayaguensis* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode from Puerto Rico. *J. Nematol.* 20:58-69.

**Rehman, S., Postma, W., Tytgat, T., Prins, P., Qin, L., Overmars, H., Vossen, J., Spiridon, L. N., Petrescu, A. J., Goverse, A., Bakker, J., and Smant, G. 2009.** A secreted SPRY domain-containing protein (SPRYSEC) from the plant-parasitic nematode *Globodera rostochiensis* interacts with a CC-NB-LRR protein from a susceptible tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:330-340

**Requena, M. E., Egea-Gilabert, C., and Candela, M. E. 2005.** Nitric oxide generation during the interaction with *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiol. Plant.* 124:50-60.

**Richins, R. D., Micheletto, S., and O'Connell, M. A. 2010.** Gene expression profiles unique to chile (*Capsicum annuum* L.) resistant to Phytophthora root rot. Plant Sci. 178:192-201.

**Ristaino, J. B., and Johnston, S. B. 1999.** Ecologically based approaches to management of Phytophthora blight on bell pepper. Plant Dis. 83:1080-1089.

**Rodríguez-Concepción, M. 2006.** Early steps in isoprenoid biosynthesis: Multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. Phytochem. Rev. 5:1-15.

**Rushton, P. J., and Somssich, I. E. 1998.** Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. Curr. Opin. Plant Biol. 1: 311-315.

**Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., and Shen, Q. J. 2010.** WRKY transcription factors. Trends Plant Sci. 15: 247-258.

**Sacco, M. A., Koropacka, K., Grenier, E., Jaubert, M. J., Blanchard, A., Goverse, A., Smant, G., and Moffett, P. 2009.** The cyst nematode SPRYSEC protein RBP-1 elicits Gpa2- and RanGAP2-dependent plant cell death. PLoS Pathog. 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.

**Scurrah, M. I., Niere, B., and Bridge, J. 2005.** Nematode parasites of solanum and sweet potatoes. In: Luc, M., Sikora, R. A., y Bridge, J. (Eds). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CAB International, Wallingford, UK. pp: 193-219.

**Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B., Cammue, B., and De Bolle, M. F. 2008.** Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. Plant Physiol. Biochem. 46: 941-950.

**Sid, A. A., Pérez-Sánchez, C., Egea, C., and Candela M. E. 1999.** Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. Plant Pathol. 48:58-65.

**Sijmons, P. C., Atkinson, H. J., and Wyss, U. 1994.** Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. Annu. Rev. Phytopathol. 32:235-259.

**Silvar, C., Merino, F., and Díaz, J. 2008.** Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. J. Plant Physiol. 165:1120-1124.

**Sikora, R. A., and Fernández, E. 2005.** Nematode parasites of vegetables. *In:* Luc, M., Sikora, R. A., y Bridge, J. (Eds). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. CAB International, Wallingford, UK. pp: 319-392.

**Sobczak, M., and Golinowski, W. 2009.** Structure of cyst nematode feeding sites. *In:* Berg, R. H., y Taylor, C. G. (Eds.). Cell biology of plant nematode parasitism. Plant Cell Monographs. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp: 153-187.

**Sobczak, M., and Golinowski, W. 2011.** Cyst nematodes and syncytia. *In:* Jones, J., Gheysen, G., y Fenoll, C. (Eds.). Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Springer Dordrecht Heidelberg. pp: 61-82.

**Stermer, B. A., G. M. Bianchini, and K. L. Korth. 1994.** Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J. Lipid Res.* 35:1133-1140.

**Suzuki, M., and Muranaka, T. 2007.** Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis. *Lipids* 42: 47-54.

**Sy, O., Bosland, P. W., and Steiner, R. 2005.** Inheritance of phytophthora stem blight resistance as compared to phytophthora root rot and phytophthora foliar blight resistance in *Capsicum annum* L. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130:75-78.

**Szakasits, D., Heinen, P., Wiczorek, K., Hofmann, J., Wagner, F., Kreil, D. P., Sykacek, P., Grundler, F. M. W., and Bohlmann, H. 2009.** The transcriptome of syncytia induced by the cyst nematode *Heterodera schachtii* in Arabidopsis roots. *Plant Journal* 57: 771-784.

**Takahashi, S., Zhao, Y., O'Maille, P. E., Greenhagen, B. T., Noel, J. P., Coates, R. M., and Chapell, J. 2005.** Kinetic and molecular analysis of 5-epiaristolochene 1,3-dihydroxylase, a cytochrome P450 enzyme catalyzing successive hydroxylation of sesquiterpenes. *J. Biol. Chem.* 280:3686-3696.

**Takahashi, S., Yeo, Y. S., Zhao, Y., O'Maille, P. E., Greenhagen, B. T., Noel, J. P., Coates, R. M., and Chapell, J. 2007.** Functional characterization of premnaspirodiene oxygenase, a cytochrome P450 catalyzing regio- and stereo-specific hydroxylations of diverse sesquiterpene substrates. *J. Biol. Chem.* 282: 31744-31754.

**Threlfall, D. R., and Whitehead, I. M. 1988.** Co-ordinated inhibition of squalene synthetase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 27: 2567-2580.

**Trujillo-Viramontes, F., Zavaleta-Mejía, E., Rojas-Martínez, R. I., y Lara, J. 2005.** Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile. *Nematropica* 35:37-44.

**Turner, S. J., and Rowe, J. A. 2006.** Cyst nematodes. *In*: Perry, R. N., y Moens, M. (Eds.). Plant nematology. CAB International. Wallingford, UK. pp: 91-122.

**Ueeda, M., Kubota, M., and Nishi, K. 2006.** Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67:149-154.

**Vanholme, B., De Meutter, J., Tytgat, T., Van Montagu, M., Coomans, A., and Gheysen, G. 2004.** Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. *Gene* 332: 13-27.

**Van Loon, L. C. 1997.** Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 753-765.

**Vidhyasekaran, P. 2008.** Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms. CRC Press. Boca Raton, FL. 509 p.

**Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R. I., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A. M., y Zavaleta-Mejía, E. 2009.** Respuesta hipersensitiva en el follaje de chile CM.334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.

**Vögeli, U., and Chappell, J. 1988.** Induction of sesquiterpene cyclase and supression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiol.* 72:864-869.

**Vom Endt, D., Kijne, J. W., and Memelink, J. 2002.** Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators?. *Phytochemistry* 61:107-114.

**Wang, Y., Dang, F., Liu, Z., Wang, X., Eulgem, T., Lai, Y., Yu, L., She, J., Shi, Y., Lin, J., Chen, C., Guan, D., Qiu, A., and He, S. 2013.** *CaWRKY58*, encoding a group I WRKY transcription factor of *Capsicum annuum*, negatively regulates resistance to *Ralstonia solanacearum* infection. *Mol. Plant Pathol.* 14: 131-144.

**Ward, E. W. B. 1976.** Capsidiol production in pepper leaves in incompatible interactions with fungi. *Phytopathology* 66: 175-176.

**Weissenborn, D. L., Denbow, C. J., Laine, M., Lang, S. S., Yang, Z., Yu, X., and Cramer, C. L. 1995.** HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins: Molecular specialization within a complex pathway. *Physiol. Plant.* 93: 393-400.

**Williamson, V. M., and Gleason, C. A. 2003.** Plant-nematode interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:327-333.

**Xu, J., Liu, P., Meng, Q., and Long, H. 2004.** Characterisation of *Meloidogyne* species from China using isozyme phenotypes and amplified mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 309-315.

**Yang, B., and Eisenback, J. D. 1983.** *Meloidogyne enterolobii* n. sp. (Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing pacara earpod tree in China. *J. Nematol.* 15: 381-391.

**Yang, Y., Shah, J., and Klessig, D. F. 1997.** Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621-1639.

**Yeom, S.I., Baek, H.K., Oh, S.K., Kang, W.H., Lee, S.J., Lee, J.M., Seo, E., Rose, J.K.C., Kim, B.D, and Choi, D. 2011.** Use of a secretion trap screen in pepper following *Phytophthora capsici* infection reveals novel functions of secreted plant proteins in modulating cell death. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 671-684.

**Yousef, L. F., Yousef, A. F., Mymryk, J. S., Dick, W.A., and Dick, R. P. 2009.** Stigmasterol and cholesterol regulate the expression of elicitor genes in *Phytophthora sojae*. *J. Chem. Ecol.* 35: 824-832.

**Zavala-Páramo, G., Chávez-Moctezuma, M. P., García-Pineda, E., Yin, S., Chappell, J., and Lozoya-Gloria, E. 2000.** Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene synthase gene (*gPEAS1*) from chilli pepper (*Capsicum annuum*). *Physiol. Plant.* 110: 410-418.

**Zavaleta-Mejía, E. 2002.** Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparasitos, una hipótesis. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 118-122.

**Zhao, Y. Schenk, D.J., Takahashi, S., Chappell, J., and Coates, R. M. 2004.** Eremophilane Sesquiterpenes from Capsidiol. *J. Org. Chem.* 69: 7428-7435.

## CAPÍTULO 2

### GENES DE DEFENSA DE LA RUTA DEL MEVALONATO EN CHILE CM334 INFECTADO POR *Nacobbus aberrans* Y *Meloidogyne enterolobii* E INOCULADO CON *Phytophthora capsici*

#### RESUMEN

La línea de chile CM334 es altamente resistente al oomiceto *Phytophthora capsici* (*Pc*) y a los nematodos agalladores *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, y *M. javanica*, pero susceptible a *M. enterolobii* y *N. aberrans*. La resistencia a *Pc* ha sido asociada con la acumulación de la fitoalexina sesquiterpenica capsidiol. El objetivo de este trabajo fue conocer las modificaciones que ambos nematodos inducen en la expresión de algunos genes de la ruta mevalónica, en plantas CM334 infectadas por *N. aberrans* (*NaPc*) o *M. enterolobii* (*MPc*) e inoculadas con el oomiceto (*Pc*). En tallos colectados a las 6, 24, y 48 horas posteriores a la inoculación con el oomiceto (hpio) se determinó mediante qRT-PCR la acumulación de transcritos de los genes *HMG2*, y *EAS* [(hidroximetilglutaril-CoA reductasa 2, y 5-epiaristoloueno sintasa, respectivamente (implicados en la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas)], y de *HMG3*, y *SS* (escualeno sintasa); y a 144 hpio, la acumulación de capsidiol. En los tratamientos *NaPc* y *MPc*, los niveles de *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS*, fueron generalmente inferiores a los registrados en el tratamiento testigo *Pc* ( $P \leq 0.05$ ) cuando el oomiceto se inoculó a los 3 dpi con *N. aberrans* o *M. enterolobii*; la tendencia fue similar cuando *Pc* se inoculó a los 21 dpi con el nematodo. En tallos de los tratamientos *NaPc* y *MPc*, los niveles de capsidiol fueron significativamente inferiores en comparación con los del tratamiento *Pc*, únicamente cuando el oomiceto se inoculó a los 21 dpi con el nematodo ( $P \leq 0.05$ ). En contraste con lo anterior, en raíces las diferencias entre *Pc* vs *NaPc* y *Pc* vs *MPc*, fueron significativas tanto a 3 como a 21 dpi ( $P \leq 0.05$ ). Ambos nematodos modificaron los patrones de expresión de genes de defensa a nivel sistémico (tallos), y los niveles de capsidiol fueron reducidos tanto local (raíz) como sistémicamente, posiblemente para crear el ambiente favorable que les permitió completar su ciclo de vida.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, nematodos agalladores, qRT-PCR, capsidiol, ruta mevalónica.

## ABSTRACT

Plants of *Capsicum annuum* L. landrace CM334 is highly resistant to the oomycete *Phytophthora capsici* (*Pc*) and the root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* and *M. javanica*, but susceptible to *M. enterolobii* and *Nacobbus aberrans*. Resistance to *Pc* is associated with the accumulation of the sesquiterpene phytoalexin capsidiol. The objective of this study was to know the changes that both nematodes induce in the expression of some mevalonate pathway genes in CM334 plants infected by *N. aberrans* (*NaPc*) or *M. enterolobii* (*MPc*) and inoculated with the oomycete (*Pc*). In stems collected at 6, 24, and 48 hours after inoculation with the oomycete (haio), the transcripts accumulation of *HMG2* and *EAS* [(hydroxymethylglutaryl-CoA reductase 2, and 5-epiaristolochene synthase, respectively (associated with sesquiterpene phytoalexin biosynthesis)], and *HMG3*, and *SS* genes (squalene synthase) was determined by qRT-PCR; and at 144 haio, the capsidiol accumulation also was determined. In *NaPc* and *MPc*, the *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, and *SS* transcript levels were generally lower than those recorded in the *Pc* treatment ( $P \leq 0.05$ ) when the oomycete was inoculated at 3 dai with *N. aberrans* or *M. enterolobii*, the trend was similar when *Pc* was inoculated at 21 dai with the nematode. In stems of *NaPc* and *MPc* treatments capsidiol levels were significantly lower compared to *Pc* treatment only when the oomycete was inoculated at 21 dai with the nematode. In contrast, in roots the differences between *Pc* vs *NaPc* and *Pc* vs *MPc*, were significant at 3 and 21 dai ( $P \leq 0.05$ ). Both nematodes altered the expression of defense genes systemically (stems), and capsidiol accumulation was reduced locally (roots) and systemically, possibly to create a favorable environment that allowed them to complete their life cycle.

**Keywords:** *Capsicum annuum*, root-knot nematodes, qRT-PCR, capsidiol, mevalonate pathway.

## INTRODUCCIÓN

El oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian induce la marchitez y el tizón foliar y de tallo en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.), causando pérdidas considerables a nivel mundial (Erwin y Ribeiro, 1996; Ristaino y Johnston, 1999). La utilización de genotipos de chile resistentes constituye una estrategia económica y ambientalmente amigable para el manejo de esta enfermedad. La línea de chile Criollo de Morelos 334 “CM334”, exhibe un alto grado de resistencia a diversos aislamientos del oomiceto que se expresa como una respuesta hipersensitiva a nivel de raíz, tallo y follaje (Fernández-Pavia, 1997; Candela *et al.*, 2000; Ueeda *et al.*, 2006; Glosier *et al.*, 2008). Al igual que en otros genotipos de chile, la resistencia a *P. capsici* se asocia con una acumulación elevada del capsidiol, una fitoalexina de naturaleza sesquiterpénica cuya biosíntesis está regulada inicialmente por la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoenzimaA reductasa (HMGR) (Chappell *et al.*, 1991; Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000).

En plantas la HMGR cataliza la conversión de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoenzimaA a mevalonato, es codificada por una familia multigénica que en *C. annuum*, incluye a *HMG1*, *HMG2*, y *HMG3*, diferencialmente regulados para conducir a la biosíntesis de diferentes tipos de isoprenoides como esteroides y fitoalexinas sesquiterpénicas (Chappell, 1995; Ha *et al.*, 2003). Así, en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, la expresión de *HMG1* y *HMG2* probablemente está asociada con la síntesis de ciertos esteroides y triterpenos (Enjuto *et al.*, 1994; Enjuto *et al.*, 1995); en *Solanum tuberosum* L., *HMG1* se asocia con la producción de esteroides, mientras que *HMG2* y *HMG3* se relacionan con la síntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas en respuesta al ataque por patógenos (Choi *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1994); en *S. lycopersicum* L., el gen *HMG1* está probablemente asociado con la síntesis de esteroides, mientras que *HMG2* se relaciona con respuestas de defensa frente a estrés biótico y abiótico (Weissenborn *et al.*, 1995). La biosíntesis de esteroides es regulada a nivel post-mevalonato por la escualeno sintasa (SS) y cicloartenol sintasa (CAS) (Stermer *et al.*, 1994; Chappell, 1995; Suzuki y Muranaka, 2007); mientras que la de fitoalexinas sesquiterpénicas es regulada por la sesquiterpeno ciclasa (SC) (Vögeli y Chappell, 1988; Chappell, 1995). Con frecuencia se menciona que el estrés biótico o abiótico, induce cambios en el curso normal de la biosíntesis de isoprenoides,

desviando la ruta hacia la producción de fitoalexinas sesquiterpénicas (Takahashi *et al.*, 2007). En este proceso, un punto clave estrictamente regulado, es la utilización del intermediario pirofosfato de farnesilo (FPP), del cual también se derivan compuestos que forman parte del metabolismo primario como los esteroides (Vögeli y Chappell, 1988; Takahashi *et al.*, 2007). Se ha sugerido que el mecanismo de regulación implica la existencia de un interruptor metabólico entre la síntesis de esteroides y fitoalexinas (Takahashi *et al.*, 2007). Por ejemplo, en tabaco, la acumulación de capsidiol, inducida por celulosa, condujo a la inhibición de la SS (Threlfall y Whitehead, 1988). La biosíntesis de capsidiol es catalizada por la 5-epiaristoliqueno sintasa (EAS), una sesquiterpeno ciclasa (Zavala-Páramo *et al.*, 2000). La expresión del gen *EAS* (que codifica para 5-epiaristoliqueno sintasa) en la interacción *Capsicum annum*-*P. capsici*, se incrementa en respuesta al ataque por el oomiceto (Zavala-Páramo *et al.*, 2000); similarmente se han observado sobre-expresiones de los genes *HMG2* (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoenzimaA reductasa) y *SC* (sesquiterpeno ciclasa) de la ruta mevalónica (Ha *et al.*, 2003; Silvar *et al.*, 2008).

CM334 es susceptible al nematodo falso nodulador *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944 (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005), pero resistente a las tres principales especies de nematodos agalladores [*Meloidogyne incognita* (Kofoid y White, 1919) Chitwood, 1949; *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949; y *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 (Pegard *et al.*, 2005); sin embargo, se desconoce si lo es para otras especies de *Meloidogyne*. Se ha documentado que la infección previa por *N. aberrans* compromete la resistencia de CM334 a *P. capsici*, fenómeno conocido como “rompimiento de resistencia”; el cual podría estar relacionado con cambios transcripcionales y metabólicos inducidos por el nematodo en la raíz, afectando a las principales rutas de síntesis de compuestos involucrados en defensa (Zavaleta-Mejía, 2002; Godínez-Vidal *et al.*, 2008; Villar-Luna *et al.*, 2009; Godínez-Vidal *et al.*, 2013; López-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). En raíces de plantas CM-334 infectadas por *N. aberrans* e inoculadas con *P. capsici*, se observó una acumulación tardía de transcritos del gen *EAS*, en comparación con las inoculadas únicamente con el oomiceto, suceso que se relacionó con una menor acumulación de capsidiol (Fernández-

Herrera *et al.*, 2012). De manera similar, en plantas infectadas por *N. aberrans* se registró un retraso en la respuesta hipersensitiva foliar hacia *P. capsici*, en comparación con las inoculadas únicamente con el oomiceto (Villar-Luna *et al.*, 2009). A la fecha, los análisis de expresión génica en esta interacción solo se han enfocado a nivel de raíz en respuesta a la infección por ambos patógenos; no obstante, también es de interés conocer la magnitud de las alteraciones transcripcionales en la parte aérea de plantas CM334 infectadas por el nematodo.

Los nematodos endoparásitos sedentarios, *Meloidogyne* spp y *N. aberrans*, establecen una relación íntima y sofisticada con sus hospedantes susceptibles mediante la formación de sitios especializados de alimentación (células gigantes y sincitios, respectivamente); proceso que implica cambios dramáticos en la expresión de genes, así por ejemplo, se sobre-expresan aquellos directamente relacionados con el desarrollo y mantenimiento del sitio especializado, mientras que la expresión de aquellos involucrados en los mecanismos de defensa del hospedante es reducida (Gheysen y Fenoll, 2002; Jammes *et al.*, 2005). Para ambos nematodos, el proceso parasítico inicia cuando juveniles del segundo estadio (J<sub>2</sub>) penetran las raíces y migran inter e intracelularmente (*Meloidogyne* sp, y *N. aberrans*, respectivamente), los J<sub>2</sub> de *Meloidogyne* sp se alojan en el cilindro vascular e inmediatamente inducen la formación de células gigantes; en contraste, los J<sub>2</sub> de *N. aberrans* pueden permanecer o salir y volver a ingresar a la raíz, en este caso la formación del sincitio es inducida por la hembra J<sub>4</sub> o la hembra inmadura (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Williamson y Gleason, 2003).

Hasta los primeros 6 años del presente siglo se consideraba a las especies *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica* como las de mayor importancia económica; sin embargo, en la actualidad, *Meloidogyne enterolobii* Yang y Eisenback, 1983 (= *M. mayaguensis* Rammah y Hirschmann, 1988) ha cobrado mayor importancia a nivel mundial, debido a su creciente distribución geográfica, amplio rango de hospedantes, y a su notable capacidad patogénica para superar la resistencia en cultivares de jitomate (*S. lycopersicum*) y chile que poseen los genes *Mi-1* y *N*, respectivamente (Brito *et al.*, 2007; Kiewnick *et al.*, 2009; Castagnone-Sereno, 2012). Estos genes confieren resistencia

dominante a las tres especies arriba mencionadas, pero es inefectiva contra *M. enterolobii*; a la fecha no se han encontrado fuentes de resistencia en jitomate y chile para esta especie.

Con base en estos antecedentes y considerando el hecho de que CM334 exhibe una incompatibilidad similar para las tres especies más comunes de *Meloidogyne*, surgió el interés por determinar si CM334 es resistente a *M. enterolobii* y conocer que respuestas de defensa son expresadas por CM334 al interactuar con este nematodo. Por lo anterior, en la presente investigación se comparó el nivel de invasión de *M. enterolobii* y *N. aberrans* en raíces de CM334 y se determinaron los niveles de expresión de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS*, y la acumulación de capsidiol en tallos de plantas CM334 infectadas por *N. aberrans* o *Meloidogyne enterolobii* e inoculados con *P. capsici*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Identificación molecular de *N. aberrans* y de *M. enterolobii*.**

**Material biológico.** Para verificar la identidad de *N. aberrans*, se utilizaron raíces de jitomate agalladas, procedentes de suelos naturalmente infestados del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. El inóculo de *Meloidogyne* se obtuvo de raíces agalladas de chile tipo Jalapeño procedentes del municipio de Ahome, Sinaloa. Dicha población se identificó como *Meloidogyne enterolobii* mediante pruebas moleculares utilizando como positivo DNA de *M. incognita* (incrementado a partir de una sola masa de huevecillos).

La extracción de huevecillos de cada nematodo se realizó siguiendo la metodología descrita por Vrain (1977) y la obtención de juveniles del segundo estadio (J<sub>2</sub>) se hizo según Villar-Luna *et al.*, (2009).

**Extracción de DNA genómico.** Los J<sub>2</sub> fueron concentrados por centrifugación a 3000 rpm por 5 min, descartando el sobrenadante. El precipitado contenido en tubos Eppendorf se congeló con N<sub>2</sub> líquido y maceró con micropistilo. Luego se homogenizó con 250 µL de buffer de extracción [(500 mM de KCl, 100 mM de Tris HCl pH 8.0, 1% de

Tritón X-100, 400 µg/mL Proteínasa K (Sigma-Aldrich®)] y se incubó a 60° C durante 4 h, adicionalmente se incubó a 90° C por 10 min para inactivar la proteínasa K. La mezcla fue centrifugada a 5000 rpm por 5 min y el sobrenadante se colocó en un nuevo tubo adicionando 600 µL de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) centrifugando a 10 000 rpm por 10 min. Para precipitar el DNA, el sobrenadante recuperado se mezcló con 100 µL de isopropanol y se incubó durante 30 min a -20° C; posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min, descartando el sobrenadante; la pastilla se lavó con 1 mL de etanol 70% (10 000 rpm por 10 min), secando a temperatura ambiente y resuspendiendo en 30 µL de agua libre de nucleasas.

**Reacción en cadena de la polimerasa.** Para verificar la identidad de *N. aberrans* se utilizaron iniciadores específicos que amplifican un fragmento de entre 141 y 173 pb de una de las regiones ITS (espaciadores transcritos internos, por sus siglas en inglés) del DNA ribosomal (rDNA) de este nematodo, siendo el fragmento de 173 pb para la población mexicana (Atkins *et al.*, 2005). Para el caso de *Meloidogyne enterolobii* se utilizaron los iniciadores específicos SCAR (región amplificada y caracterizada por secuencia, por sus siglas en inglés) y otros que generan un fragmento de 236 pb de la región IGS2 (región intergénica 2, por sus siglas en inglés) del rDNA. Para *M. incognita*, *M. arenaria*, y *M. javanica* también se utilizaron iniciadores específicos SCAR para cada una de las especies. (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Iniciadores específicos utilizados en el presente estudio.**

Clave	Iniciadores	Producto de PCR (pb)	Nematodo	Referencia
	Secuencia (5' → 3')			
NacF	GATCATTACACGTACCGTGATGGTC	173	<i>N. aberrans</i>	Atkins <i>et al.</i> , 2005
NacR	CTGCTCAACCACGCATAGACG			
Mi-F	GTGAGGATTCAGCTCCCCAG	999	<i>M. incognita</i>	Meng <i>et al.</i> , 2004
Mi-R	ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC			
Far	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	420	<i>M. arenaria</i>	Zijlstra <i>et al.</i> , 2000
Rar	TCGGCGATAGACACTACAAC			
Fjav	GGTGC GCGATTGAACTGAGC	670	<i>M. javanica</i>	Zijlstra <i>et al.</i> , 2000
Rjav	CAGGCCCTTCAGTGGAACTATAC			
Me-F	AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG	236	<i>M. enterolobii</i>	Long <i>et al.</i> , 2006
Me-R	TCAGTTCAGGCAGGATCAACC			
MK7-F	GATCAGAGGCGGGCGCATTGCCA	520	<i>M. enterolobii</i>	Tigano <i>et al.</i> , 2010
MK7-R	CGAACTCGCTCGAACTCGAC			

La PCR se realizó en un volumen de reacción de 25  $\mu\text{L}$  que consistió de 1  $\mu\text{L}$  de DNA, buffer 10X, 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM de dNTPs, amplificasa (Biotecmol), 0.4  $\mu\text{M}$  de iniciadores NacF/NacR, MiF/Mi-R, Far/Rar, o Fjav/Rjav, o 0.12  $\mu\text{M}$  de iniciadores Me-F/Me-R, o MK7-F/MK7-R. Las condiciones de amplificación para cada par de iniciadores consistieron de una desnaturalización inicial a 94° C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 94° C por 30 s, alineamiento a temperatura variable según el par de iniciadores utilizados por 30 s, extensión a 72° C por 30 s; y una extensión final a 72° C por 5 min. Las temperaturas de alineamiento de cada par de iniciadores fueron: NacF/NacR (60°C), MiF/Mi-R (62°C), Far/Rar (61°C), Fjav/Rjav (64°C), Me-F/Me-R, y MK7-F/MK7-R (68°C). Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa a 1 %; y se purificaron con el QIAquick™ PCR purification Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, para su posterior secuenciación y confirmación de su identidad.

#### **Acumulación de transcritos de genes y de capsidiol en tallos de plantas de chile CM334.**

**Material vegetal.** Semillas de chile “tipo serrano” CM334 resistente a *P. capsici* se desinfestaron con una solución de hipoclorito de sodio a 1 %, y se germinaron a 28±1°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 28±1°C, con un fotoperiodo de 14 horas a una intensidad luminosa de 6768 lux (luz fluorescente) y 10 horas de obscuridad. Los riegos se realizaron cada 24 h con agua estéril, y la fertilización semanalmente aplicando una solución nutritiva (3.15 g de Nitrofoska® 12-12-12 por litro de agua estéril).

**Inoculación con *N. aberrans* o con *M. enterolobii*.** El inóculo se obtuvo de raíces agalladas de jitomate y de chile jalapeño cultivados en suelos naturalmente infestados del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, y del municipio de Ahome, Sinaloa, para *N. aberrans*, y *M. enterolobii*, respectivamente. La extracción de huevecillos y la obtención del inóculo (juveniles del segundo estadio, J<sub>2</sub>) se realizaron según la metodología antes descrita. Cuando las plantas presentaron entre cuatro y cinco hojas

verdaderas, se inocularon con una suspensión de 500 J<sub>2</sub> de *N. aberrans* o de *M. enterolobii* por planta.

**Inoculación con *P. capsici*.** El oomiceto se cultivó sobre medio V8 según Villar-Luna *et al.*, (2009), y una vez que el micelio cubrió la superficie del medio se cortaron discos de 0.5 cm de diámetro. Tres ó 21 días posteriores a la inoculación (dpi) con *N. aberrans* o con *M. enterolobii* se realizó la inoculación con el oomiceto, para ello se removió el ápice de los tallos y se colocó un disco con micelio en la zona de decapitación. Adicionalmente se incluyeron plantas de chile cv. Yolo Wonder susceptibles como referencia de la patogenicidad del oomiceto y de la eficacia de la inoculación.

**Experimentos.** Se establecieron dos experimentos: el Experimento 1 involucró a *N. aberrans*, y el 2 a *M. enterolobii*. En cada experimento se tuvieron dos grupos de plantas de chile CM334 (Grupo 3d y Grupo 21d): en el Grupo 3d la inoculación con *P. capsici* se realizó a los 3 días post-inoculación con el nematodo (dpin), mientras que en el Grupo 21d se realizó a los 21 dpin. Los tratamientos en ambos experimentos se muestran en el Cuadro 2. Cada tratamiento constó de 80 plantas, y a las 6, 24 y 48 horas post-inoculación con el oomiceto (hpio) se tomaron 20 plantas por tiempo. De cada planta se separó la raíz, y se retiró un fragmento de tallo de 3 cm por debajo de la zona de decapitación, los tejidos se congelaron con N<sub>2</sub> líquido, se almacenaron a -80° C y posteriormente en el tejido de tallo se estimaron, para cada tiempo, los niveles de expresión de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS*, y el contenido de capsidiol solamente a las 144 hpio. A este mismo tiempo también se determinó el contenido de la fitoalexina en las raíces. Los dos experimentos se repitieron una vez más.

Cuadro 2. Tratamientos evaluados en el experimento 1 (*N. aberrans*) y 2 (*M. enterolobii*).

Experimento	Grupos	Tratamientos	Inoculación con <i>P. capsici</i> a días posteriores)¶	Tiempos de muestreo post-inoculación con <i>P. capsici</i> (horas)	
				Expresión de genes	Acumulación de capsidiol
1	G 3d Na	Pc	3	6, 24, y 48	144
		NaPc		6, 24, y 48	144
		Control		6, 24, y 48	144
	G 21d Na	Pc	21	6, 24, y 48	144
		NaPc		6, 24 y 48	144
		Control		6, 24 y 48	144
2	G 3d Me	Pc	3	6, 24, y 48	144
		MPc		6, 24, y 48	144
		Control		6, 24, y 48	144
	G 21d Me	Pc	21	6, 24, y 48	144
		MPc		6, 24 y 48	144
		Control		6, 24 y 48	144

Pc: CM334 inoculado solo con *P. capsici*; MPc: CM334 inoculado con *M. enterolobii* y *P. capsici*; NaPc: CM334 inoculado con *N. aberrans* y *P. capsici*; Control: CM334 inoculado con discos de medio V8 sin micelio; Na: *N. aberrans*; Me: *M. enterolobii*; ¶Inoculación con *P. capsici* a días posteriores a la inoculación con el nematodo

En ambos experimentos en los tratamientos que involucraron nematodos, se incluyeron plantas adicionales para monitorear la invasión y desarrollo del nematodo a 3 y 21 dpin en raíces (cinco para cada tiempo). Para confirmar que *N. aberrans* y *M. enterolobii* habían completado su ciclo de vida y verificar la presencia de masas de huevecillos, se realizaron observaciones en cinco plantas a los 40 y 75 dpin, respectivamente. Las raíces se tiñeron con hipoclorito de sodio-fucsina ácida (Bybd *et al.*, 1983) y se contabilizó el número de individuos por raíz bajo un microscopio óptico.

**Extracción de RNA total, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real.** La extracción de RNA total se realizó a partir de secciones de tallos de CM334 mantenidos en ultracongelación utilizando el RNeasy® Plant mini kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y en seguida se realizó una digestión con DNasa (Qiagen). La pureza e integridad del RNA fue verificada por espectrofotometría (ND-1000, Nanodrop Technologies) y por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante a 1.2%, respectivamente. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 2 µg de RNA total utilizando oligo dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen) y la enzima M-MLV reverse transcriptase (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La acumulación de transcritos fue determinada mediante PCR cuantitativa en un sistema ABI7500 (Applied Biosystems), la mezcla de reacción (volumen final de 25 µL) consistió de buffer 10X, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µM de cada oligonucleótido, 0.2 mM de dNTPs, amplificasa (Biotecmol), SYBR Green I (1:75000) (Molecular Probes, Eugene, OR) como fluoróforo, 10 nM de fluorosceína como referencia pasiva, y 2 µL de cDNA. Las características de los oligonucleotidos utilizados se muestran en el Cuadro 3. Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 95° C por 4 min, seguido de 35 ciclos a 95° C por 15 s, alineamiento a 60° C por 35 s, y extensión a 72° C por 35 s. Los datos fueron colectados durante el paso de extensión. Adicionalmente se incluyó una curva de disociación para descartar la formación de productos inespecíficos. Los productos de PCR se purificaron con el QIAquick™ PCR purification Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenciaron para confirmar su identidad. 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 Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) para normalizar la expresión del gen de interés, y las plantas testigo para calibrar los niveles de expresión; así, en relación al nivel basal de transcritos en las plantas testigo (1x), los niveles del gen de interés se expresaron en “veces” en respuesta al tratamiento, y se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a un análisis de comparación de medias con el método de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Adicionalmente, se realizó un análisis de correlación de Pearson para determinar la asociación entre los niveles de expresión génica. Todos los análisis estadísticos se ejecutaron en el programa SAS version 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.

Proteína	Gen	Numero de acceso <sup>†</sup>	‡Oligonucleótido	Producto de PCR (pb)
			Secuencia (5' → 3')	
GAPDH	<i>GAPDH</i>	AJ246011	GGCCTTATGACTACAGTTCACTCC GATCAACCACAGAGACATCCACAG	217
EAS	<i>EAS</i>	AJ005588	GCTCAAGAAATTGAACCGCCGAAG TCTTCATTATAGACATCGCCCTCG	200
HMGR2	<i>HMG2</i>	AF110383	ATTACCTTCAGAATGAATACGCT CTCTCTATGTTTTGTGCTGGGT	316
HMGR3	<i>HMG3</i>		GAGGAGGTGGTGAAGAAAGTG ACAGTCTCCATCATAGTGATGCA	212
SS	<i>SS</i>	AF124842	GAGGTGGAACAACCGATGA CTGGACTGTAAGTAGGCTCGCTCT	697

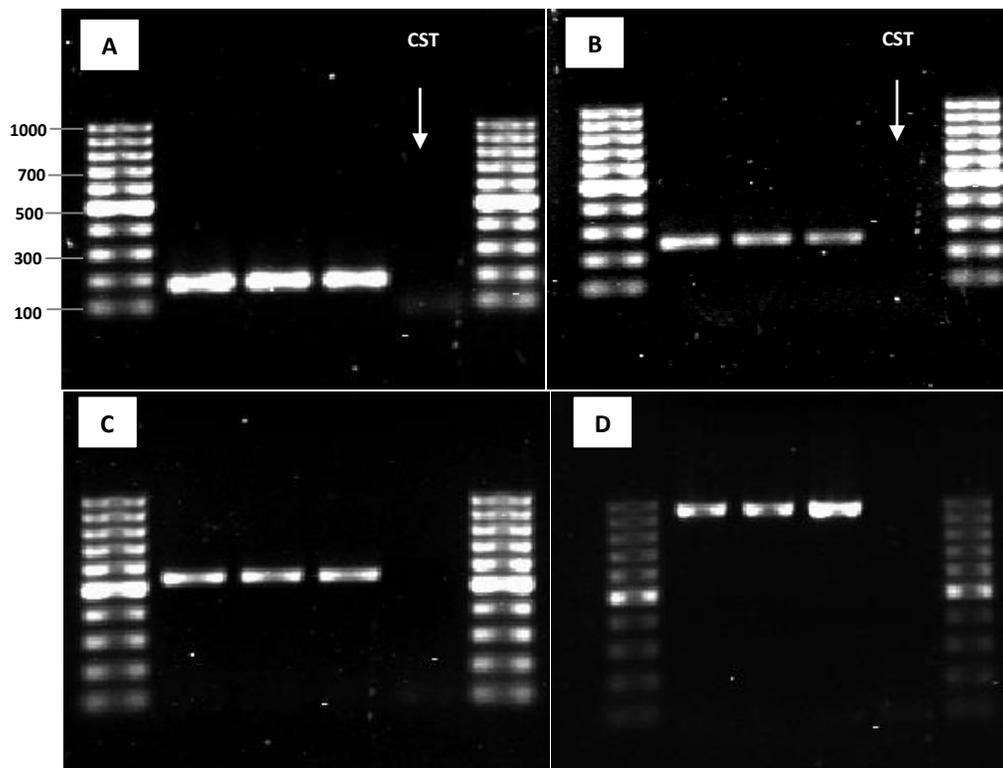
<sup>†</sup>NCBI (National Center for Biotechnology Information); GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; EAS: 5-epiaristoloueno sintasa; HMGR: hidroximetilglutaril-CoA reductasa; SS: escualeno sintasa. <sup>‡</sup>Todos los oligonucleótidos fueron diseñados por nuestro grupo de trabajo.

**Extracción y determinación del contenido de capsidiol.** La extracción se realizó a partir de 1 g de tejido de tallos o de raíces de plantas CM334, siguiendo la metodología descrita por Egea *et al.*, (1996b) con algunas modificaciones. El tejido se maceró utilizando una mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (2:1) en un mortero conteniendo N<sub>2</sub> líquido. Cada extracto se filtró y evaporó a sequedad a temperatura ambiente, redisolviéndolo posteriormente para su análisis por cromatografía en capa fina la cual se desarrolló con una mezcla de hexano:acetato de etilo (1:6) utilizando placas cromatográficas de silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck®). Para cada tratamiento, las muestras se cromatografiaron en banda y eluyeron conjuntamente con una muestra de capsidiol puro. Se recortó la porción correspondiente al estándar, la cual se reveló con una disolución de sulfato cérico amoniacal 2N en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se confrontó físicamente con la porción eluída y no revelada de cada tratamiento. Las regiones correspondientes al R<sub>f</sub>=0.28 característico del capsidiol se rasparon, lavaron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, filtraron y evaporaron a sequedad. Las determinaciones del contenido de capsidiol se realizaron siguiendo la metodología descrita por Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria (1996) con algunas modificaciones. Las muestras se redisolviaron 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 1 h 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 de acumulación obtenidos ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de tallo o raíz) 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 estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

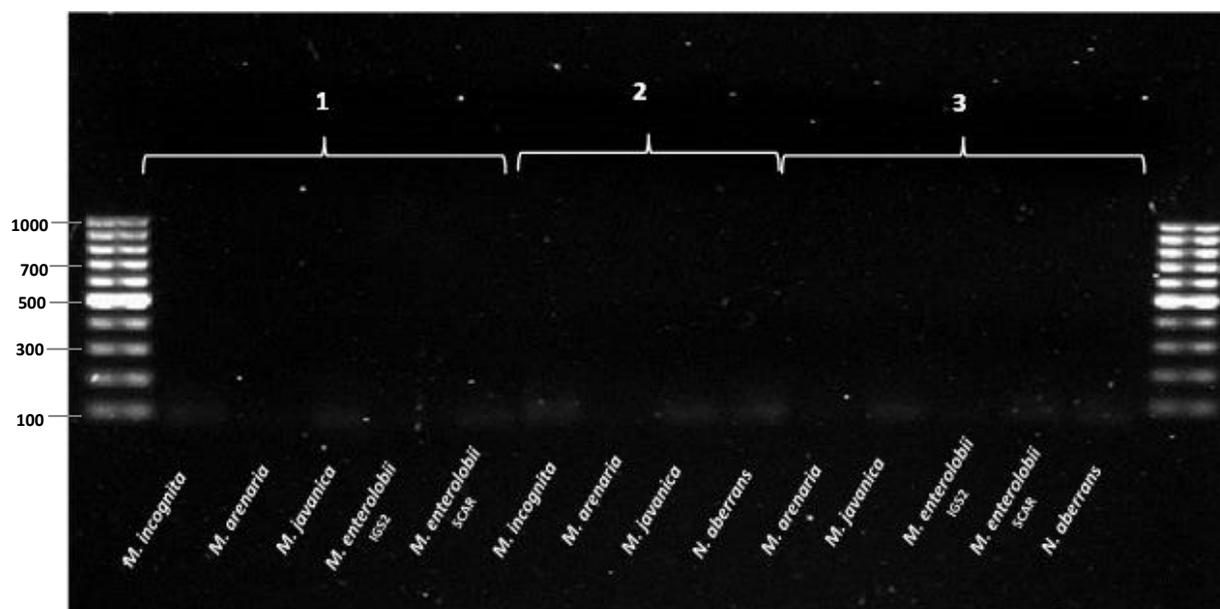
## RESULTADOS

**Identificación molecular de *N. aberrans* y de *M. enterolobii*.** A partir de DNA obtenido de J<sub>2</sub> (juveniles de segundo estadio) de *N. aberrans*, los iniciadores específicos (NacF/NacR) de *N. aberrans* amplificaron un único fragmento de  $\sim 173$  pb, que fue del tamaño esperado (Figura 1A); la amplificación fue negativa con los iniciadores Mi-F/Mi-R, Far/Rar, Fjav/Rjav, y Me-F/Me-R//MK7-F/MK7-R específicos para *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, y *M. enterolobii*, respectivamente (Figura 2).



**Fig. 1.** Amplificación del DNA de juveniles de segundo estadio (J<sub>2</sub>) de *Nacobbus aberrans*, *Meloidogyne enterolobii* y *Meloidogyne incognita* generada con los iniciadores: **(A)** ITS de *N. aberrans* (173 pb); **(B)** IGS2 de *M. enterolobii* (236 pb); **(C)** SCAR de *M. enterolobii* (520 pb); **(D)** SCAR de *M. incognita* (999 pb). CST: control negativo sin templado. Marcador 100-pb (Fermentas™).

Con el DNA de los J<sub>2</sub> de *M. enterolobii* obtenidos de raíces agalladas de chile jalapeño, la amplificación fue positiva con los iniciadores específicos SCAR e IGS2 de *M. enterolobii* generando un único fragmento de ~520 y ~236 pb, respectivamente (Figuras 1B y 1C). Con los iniciadores de *N. aberrans*, *M. incognita*, *M. arenaria*, y *M. javanica* no hubo amplificación (Figura 2). La utilización de los iniciadores específicos SCAR de *M. incognita* con el control positivo de DNA de J<sub>2</sub> de este nematodo generaron un único fragmento (~999 pb) (Figura 1D) y no hubo amplificación con los iniciadores de *N. aberrans*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. enterolobii* (Figura 2).

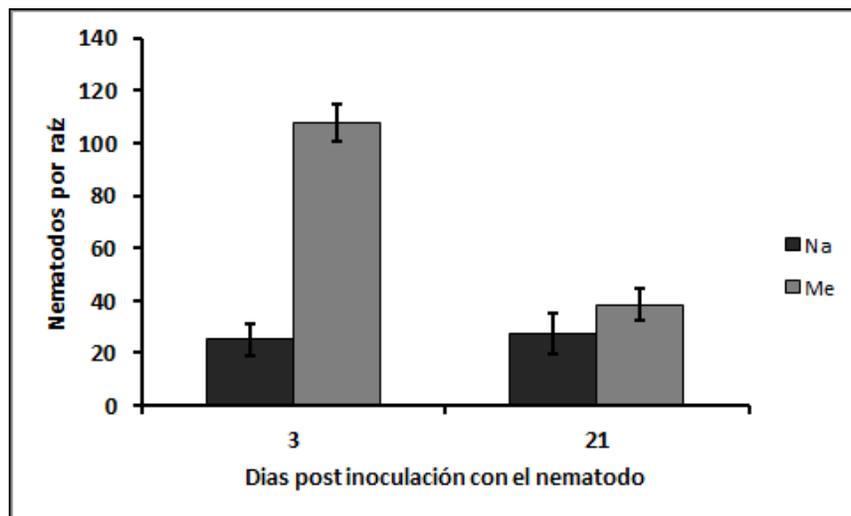


**Fig. 2.** Ausencia de amplificación del DNA de: (1) *Nacobbus aberrans*; (2) *Meloidogyne enterolobii*; (3) *Meloidogyne incognita*; con iniciadores específicos que generan fragmentos de: 999 pb (*M. incognita* SCAR), 420 pb (*M. arenaria* SCAR), 670 pb (*M. javanica* SCAR), 236 pb (*M. enterolobii* IGS2), 520 pb (*M. enterolobii* SCAR), y 173 pb (*N. aberrans* ITS). Marcador 100-pb (Fermentas™).

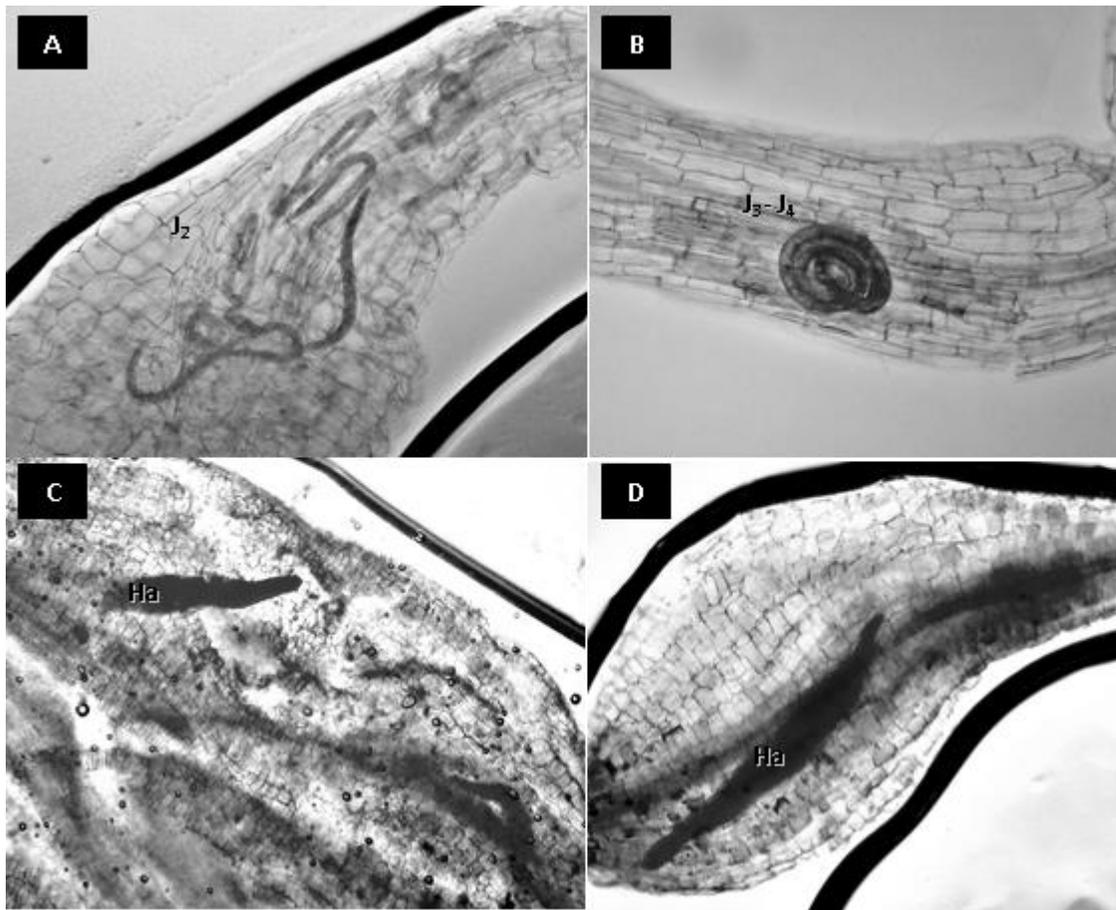
El análisis de secuenciación de los productos de PCR de *N. aberrans*, *M. enterolobii*, y de *M. incognita*, y el posterior alineamiento mediante el programa BLAST del GenBank indicó que: el fragmento de *N. aberrans* generado con los iniciadores ITS (NacF/NacR) exhibió un 99% de identidad con secuencias ITS del rDNA de este nematodo (No. de acceso NCBI: DQ318727, DQ318722-DQ318725, DQ318712 y DQ318713); el de *M. enterolobii* generado con los iniciadores IGS2 (Me-F/Me-R) exhibió un 99% de identidad con secuencias IGS2 del rDNA de este nematodo (JN005846, GQ395554, GQ395547,

GQ395531-GQ395533, GQ395524, y GQ395525); mientras que el fragmento generado con los iniciadores SCAR (MK7-F/MK7-R) exhibió el 100% de identidad con la secuencia MK7-SCAR de *M. enterolobii* (proporcionada por el Dr. Valdir Correa y la Dra. Regina Carneiro. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasil); por otra parte, el fragmento de *M. incognita* generado con los iniciadores SCAR (MiF/Mi-R) exhibió un 99% de identidad con secuencias SCAR de esta especie (JN005840- JN005842).

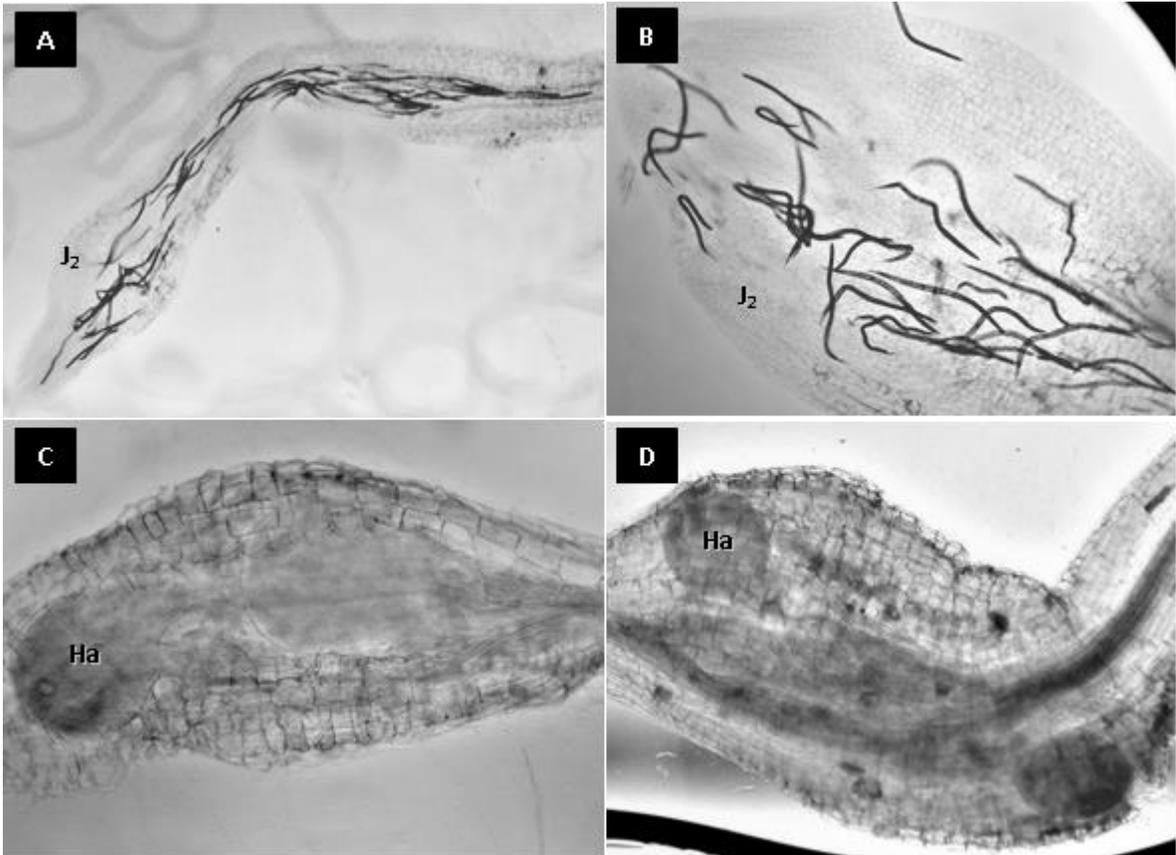
**Infección de raíces de chile CM334 por *N. aberrans* y por *M. enterolobii*.** En raíces inoculadas con 500 J<sub>2</sub>, el número de larvas de *N. aberrans* registrados a los 3 y 21 días post inoculación (dpi) fue de 25 (5%) y de 27.4 (5.5%), respectivamente; a los 21 días los nematodos presentaron la típica forma de “C” o de espiral que adoptan los juveniles del tercer estadio (J<sub>3</sub>); el agallamiento bien definido, y la presencia de hembras adultas y masas de huevecillos, fue evidente hasta los 40 dpi (Figuras 3 y 4). El mayor número de nematodos de *M. enterolobii* se registró a los 3 dpi y fue en promedio de 108 (21.6%); pero a los 21 dpi el número descendió de manera considerable a un promedio de 38.3 individuos (7.7%) (Figura 3). En este tiempo predominó la presencia de hembras adultas y fue evidente la presencia de agallas definidas; mientras que la presencia de masas de huevecillos fue predominante a 75 dpi (Figuras 5 y 6).



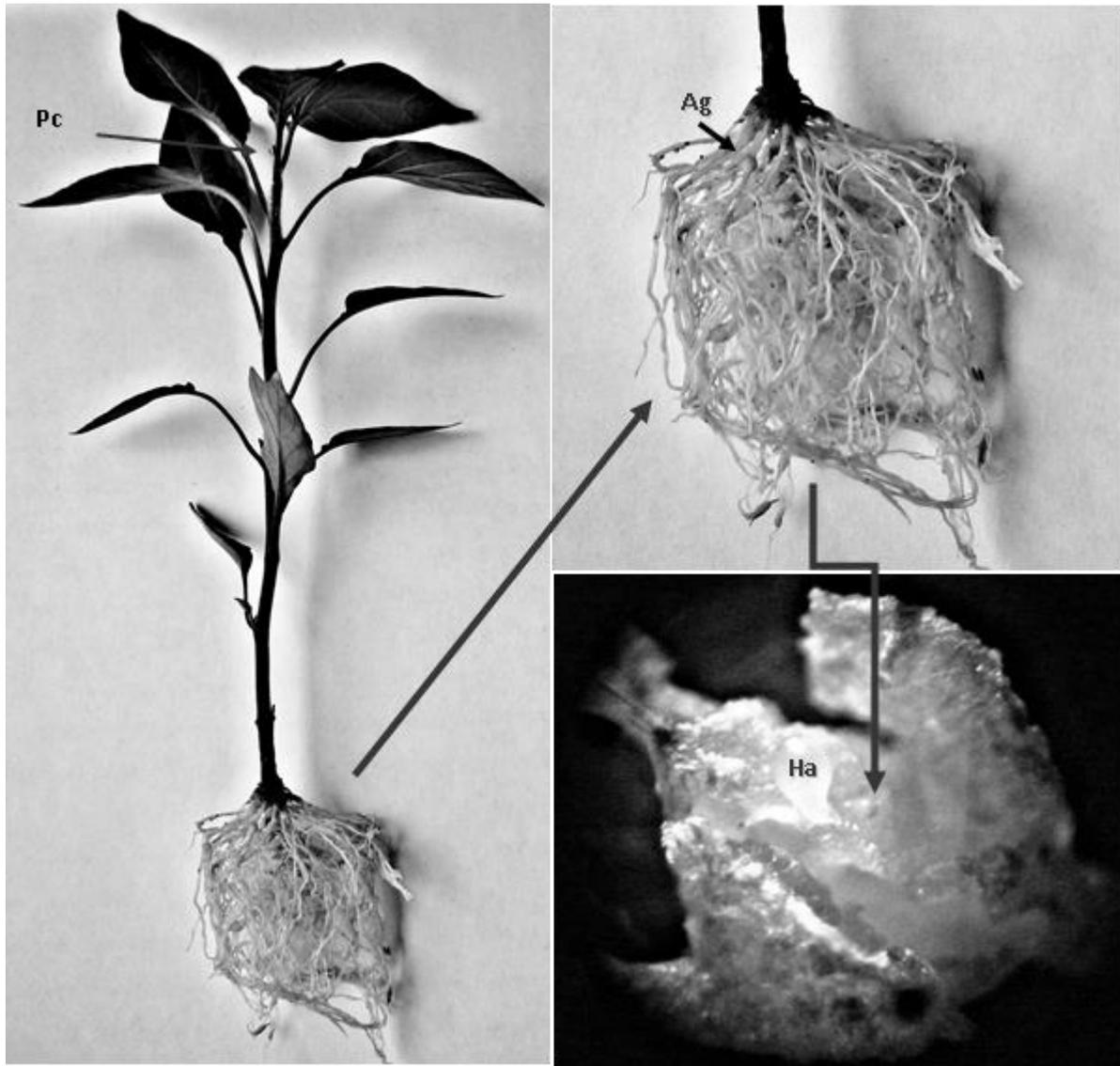
**Fig. 3.** Número de nematodos que ingresaron en raíces de chile CM334. Na, *Nacobus aberrans*; Me, *Meloidogyne enterolobii*. Cada barra representa el promedio de cinco raíces analizadas, y la línea en cada barra la desviación estándar. El experimento se repitió una vez.



**Fig. 4.** Invasión de raíces de chile CM334 por *Nacobbus aberrans*. (A) 3 días post-inoculación (dpi); (B) 21 dpi; (C y D) 40 dpi. J<sub>2</sub>, J<sub>3</sub> y J<sub>4</sub>, juveniles de segundo, tercero y cuarto estadio, respectivamente; Ha, hembra adulta.



**Fig. 5.** Invasión de raíces de chile CM334 por *Meloidogyne enterolobii*. (A y B) 3 días post-inoculación (dpi); (C y D) 21 dpi. **J<sub>2</sub>**, juveniles de segundo estadio; **Ha**, hembra adulta.

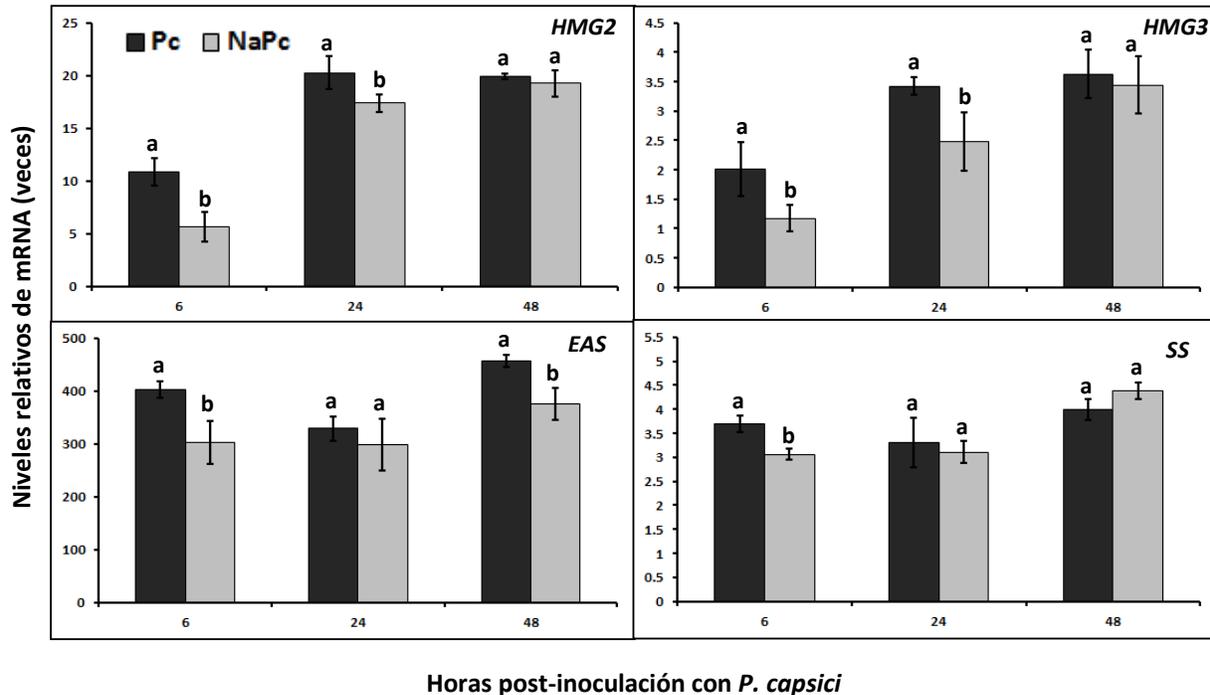


**Fig. 6.** Raíz de chile CM334 agallada por *Meloidogyne enterolobii* a 21 días post-inoculación. **Ag**, agalla; **Ha**, hembra adulta. **Pc**, zona de decapitación e inoculación con micelio de *Phytophthora capsici*.

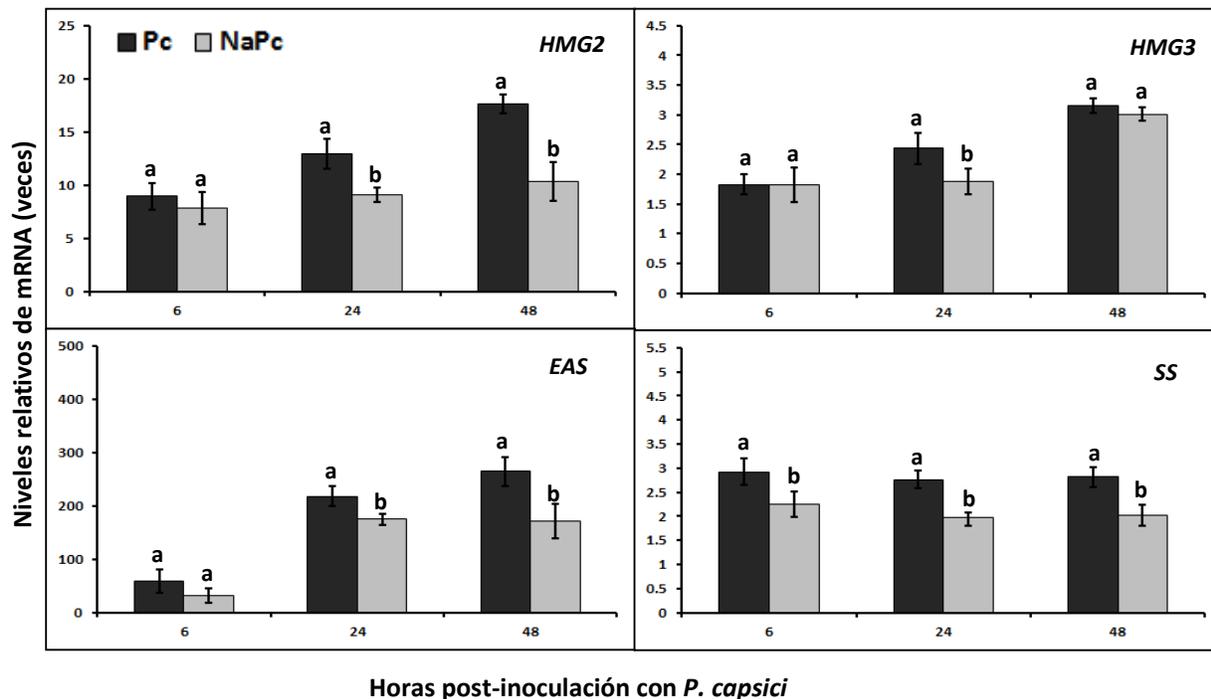
## **Acumulación de transcritos y de capsidiol en tallos de plantas CM334 infectadas por nematodos agalladores e inoculadas con *P. capsici*.**

### **Experimento 1, plantas CM334 inoculadas con *N. aberrans***

**Acumulación de transcritos.** En plantas de los tratamientos *Pc* y *NaPc*, que fueron inoculadas con el oomiceto a los 3 y 21 días posteriores a la inoculación con *N. aberrans* (grupos 3d y 21d, respectivamente), la sobre-expresión de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS* y *SS*, se observó en los tres tiempos evaluados (6, 24 y 48 h post-inoculación con el oomiceto, hpio) (Figuras 7 y 8). Generalmente la expresión tendió a incrementarse con el curso del tiempo. A 3 dpi con *N. aberrans* (grupo 3d), regularmente los niveles de transcritos en plantas del tratamiento *NaPc*, fueron significativamente inferiores a los del tratamiento *Pc* ( $P \leq 0.05$ ). Las diferencias fueron evidentes a las 6 y 24 hpio en *HMG2* (*NaPc*: 5.6, *Pc*: 10.8; y *NaPc*: 17.4, *Pc*: 20.3 veces, respectivamente) y *HMG3* (*NaPc*: 1.2, *Pc*: 2.00; y *NaPc*: 2.5, *Pc*: 3.4 veces, respectivamente); a las 6 y 48 hpio en *EAS* (*NaPc*: 302.6, *Pc*: 401.9; y *NaPc*: 375.4, *Pc*: 456.7 veces, respectivamente), y a las 6 hpio en *SS* (*NaPc*: 3.1, *Pc*: 3.7 veces) (Figura 7). En plantas del tratamiento *NaPc* inoculadas con el oomiceto a los 21 dpi con *N. aberrans* (grupo 21d), por lo general también se registró una acumulación de transcritos significativamente inferior ( $P \leq 0.05$ ) a la registrada en el tratamiento *Pc* correspondiente, a las 24 y 48 hpio para el caso de *HMG2* (*NaPc*: 9.1, *Pc*: 12.9; y *NaPc*: 10.3, *Pc*: 17.6 veces, respectivamente) y *EAS* (*NaPc*: 174.4, *Pc*: 217.9; y *NaPc*: 171.5, *Pc*: 264.8 veces, respectivamente), a las 24 hpio para *HMG3* (*NaPc*: 1.9, *Pc*: 2.4 veces), y a las 6, 24, y 48 hpio para *SS* (*NaPc*: 2.2, *Pc*: 2.9; *NaPc*: 2.0, *Pc*: 2.8; *NaPc*: 2.0, *Pc*: 2.8 veces, respectivamente) (Figura 8).

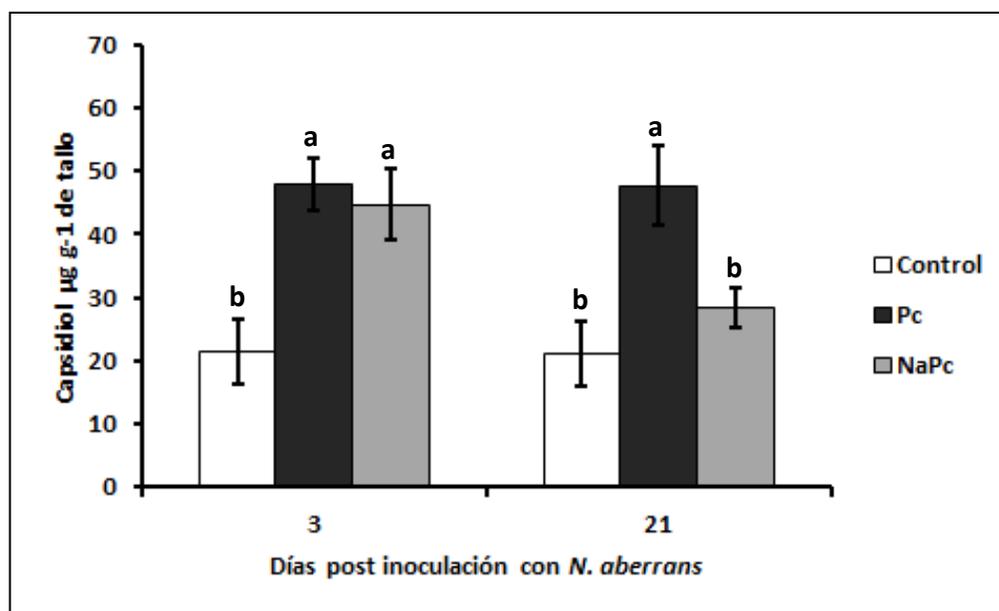


**Fig. 7.** Acumulación de transcritos de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS*, en tallos de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. Pc: inoculadas sólo con *P. capsici*; NaPc: inoculadas con *Nacobbus aberrans* y con *P. capsici*. Las plantas se inocularon con el oomiceto 3 días posteriores a la inoculación con el nematodo (grupo 3d). 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 Glicerilaldehído 3-fosfato 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,  $P < 0.05$ ). El experimento se repitió una vez.



**Fig. 8.** Acumulación de transcritos de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS* y *SS*, en tallos de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. Pc: inoculadas sólo con *P. capsici*; NaPc: inoculadas con *Nacobbus aberrans* y con *P. capsici*. Las plantas se inocularon con el oomiceto 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo (grupo 21d). 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 Glicerilaldehído 3-fosfato 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.

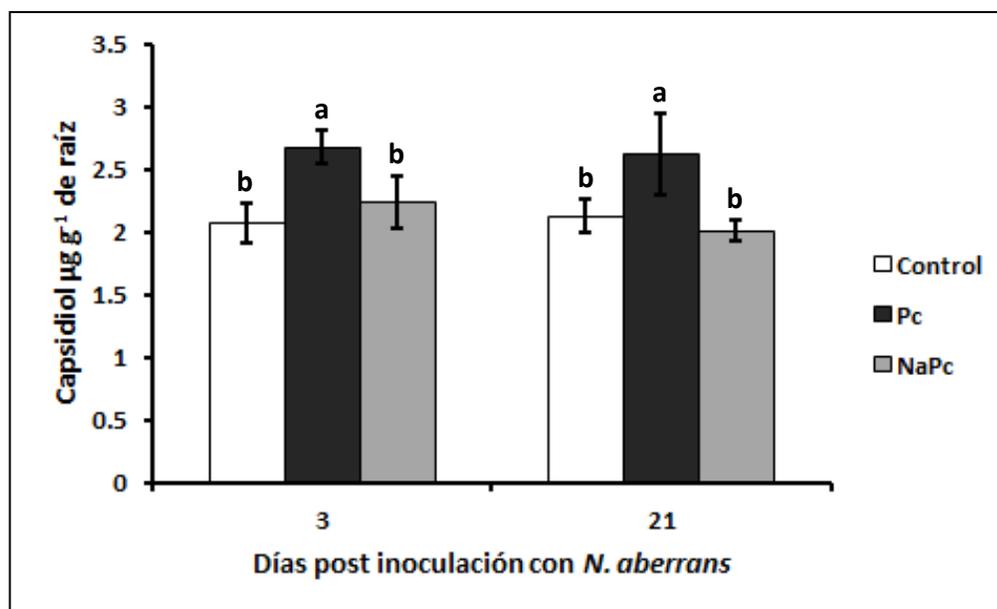
**Acumulación de capsidiol en tallos y raíces.** A las 144 horas posteriores a la inoculación con el oomiceto, los niveles de la fitoalexina en tallo generalmente fueron superiores en plantas inoculadas sólo con *P. capsici* (*Pc*) o con ambos patógenos (*NaPc*), en comparación con los de las plantas control ( $P \leq 0.05$ ), a los 3 y 21 dpi con *N. aberrans* (grupos 3d y 21d, respectivamente). Las diferencias entre los tratamientos *Pc* y *NaPc* fueron evidentes en plantas inoculadas con *P. capsici* hasta después de 21 días de haber inoculado a las plantas con el nematodo (47.6, y 28.4  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tallo, respectivamente) ( $P \leq 0.05$ ); en presencia del nematodo (*NaPc*), el contenido de capsidiol se redujo en un 40.3% con respecto a las plantas inoculadas solamente con el oomiceto (Figura 9).



**Fig. 9.** Acumulación de capsidiol en tallos de plantas de Chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. *Pc*: inoculadas sólo con *P. capsici*; *NaPc*: inoculadas con *Nacobbus aberrans* y con *P. capsici*; Control: plantas con medio V8 sin micelio. Los tallos de las plantas se inocularon con el oomiceto 3 ó 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo en la raíz (grupos 3d y 21d, respectivamente). Cada barra representa el promedio de tres extracciones y la línea en cada barra la desviación estándar. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). El experimento se repitió una vez.

En raíces de CM334 los máximos niveles de capsidiol se registraron en plantas del tratamiento *Pc*, en comparación con las inoculadas con ambos patógenos (*NaPc*) ( $P \leq 0.05$ ); el comportamiento fue similar tanto en plantas inoculadas con el oomiceto a

los 3, como a los 21 dpi con el nematodo. En aquellas correspondientes a 3 dpi con el nematodo, los niveles en el tratamiento *NaPc* ( $2.2 \mu\text{g g}^{-1}$  de raíz) fueron 18.5% inferiores a los registrados en *Pc* ( $2.7 \mu\text{g g}^{-1}$  de raíz); en ese mismo tratamiento la reducción fue mayor (23.1%, *NaPc*: 2.0 y *Pc*:  $2.6 \mu\text{g g}^{-1}$  de raíz) cuando el oomiceto se inoculó a 21 dpi con *N. aberrans* (Figura 10).



**Fig. 10.** Acumulación de capsidiol en raíces de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. *Pc*: inoculadas sólo con *P. capsici*; *NaPc*: inoculadas con *Nacobbus aberrans* y con *P. capsici*; Control: plantas con medio V8 sin micelio. Los tallos de las plantas se inocularon con el oomiceto 3 ó 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo en la raíz (grupos 3d y 21d, respectivamente). Cada barra representa el promedio de tres extracciones y la línea en cada barra la desviación estándar. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). El experimento se repitió una vez.

Los niveles de expresión los genes *HMG2*, *HMG3* y *EAS* estuvieron positivamente correlacionados en tallos de plantas de chile CM334 infectadas por *N. aberrans* e inoculadas con *P. capsici*. También los altos niveles de transcritos de *EAS* registrados a 48 hpio se correlacionaron positivamente con la acumulación de capsidiol (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre niveles de expresión de los genes *HMG2*, *HMG3* y *EAS*, y entre los niveles de *EAS* y el contenido de capsidiol en tallos de plantas CM334 infectadas por *Nacobbus aberrans* e inoculadas con *Phytophthora capsici*.

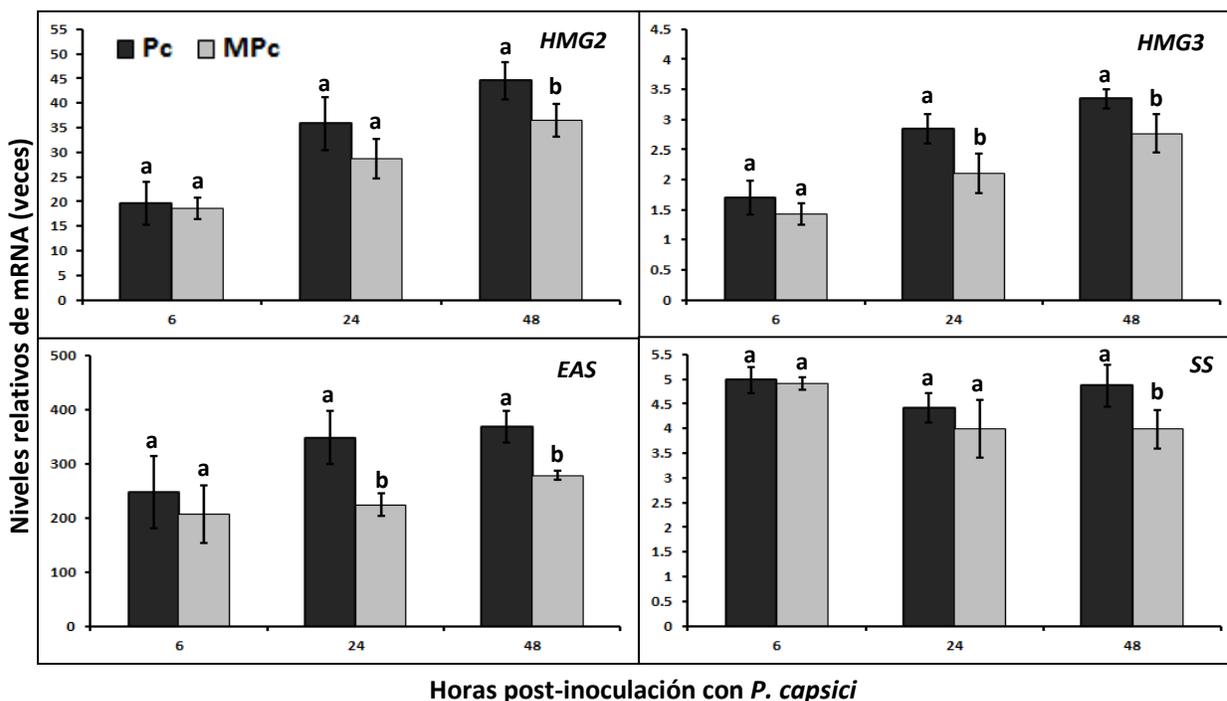
dpin <sup>¶</sup>		<i>HMG2</i>	<i>EAS</i>
3	<i>HMG3</i>	0.97*	0.79*
	<i>EAS</i>	0.85*	
	Capsidiol		0.98*
21	<i>HMG3</i>	0.93*	0.89*
	<i>EAS</i>	0.91*	
	Capsidiol		0.90*

<sup>¶</sup>Días posteriores a la inoculación con el nematodo. \* $P \leq 0.05$

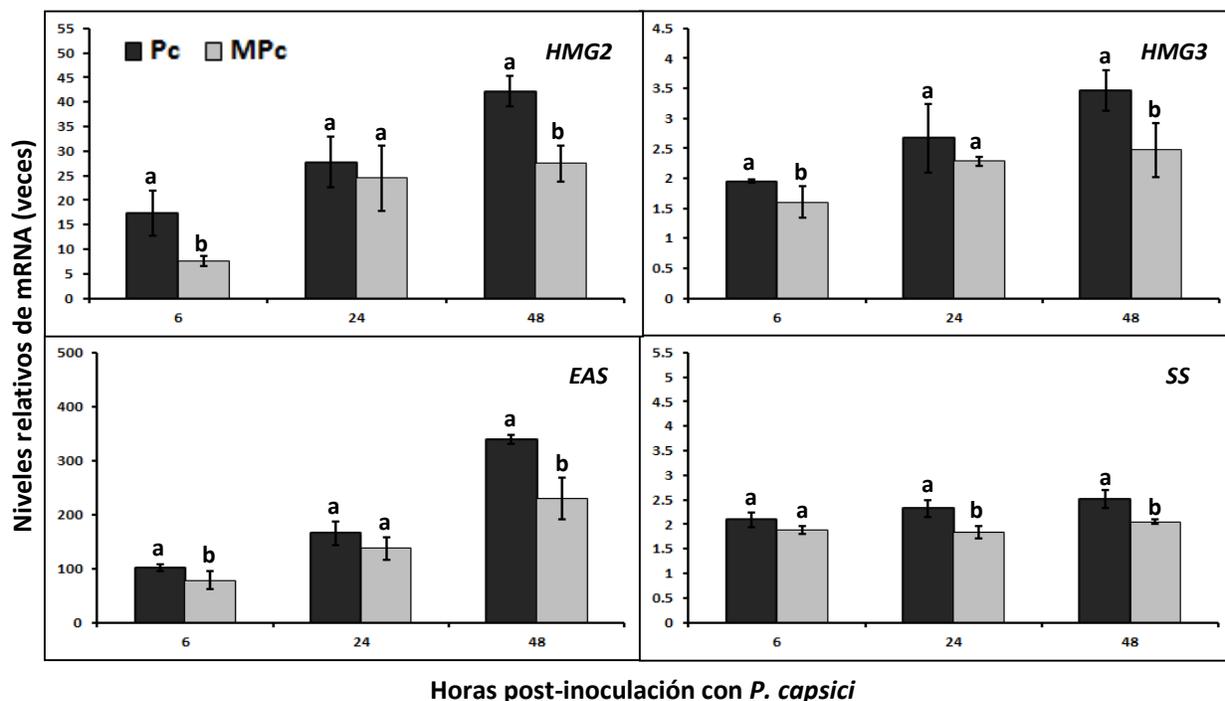
## Experimento 2, plantas CM334 inoculadas con *M. enterolobii*

**Acumulación de transcritos.** La sobre-expresión de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS* en plantas de los tratamientos *Pc* y *MPc*, que fueron inoculadas con el oomiceto a los 3 y 21 días posteriores a la inoculación con *M. enterolobii* (grupos 3d y 21d, respectivamente), tendió a incrementarse con el paso del tiempo en los tres tiempos evaluados (6, 24, y 48 h post-inoculación con el oomiceto, hpio) (Figuras 11 y 12). A 3 dpi con *M. enterolobii*, generalmente, la acumulación de transcritos fue significativamente ( $P \leq 0.05$ ) inferior a las registradas en el tratamiento *Pc*, a las 48 hpio para el caso de *HMG2* (*MPc*: 36.4, *Pc*: 44.5 veces), y a las 24 y 48 hpio para *HMG3* (*MPc*: 2.1, *Pc*: 2.8; y *MPc*: 2.8, *Pc*: 3.3 veces, respectivamente) y *EAS* (*MPc*: 224.1, *Pc*: 347.8; y *MPc*: 278.3, *Pc*: 367.6 veces, respectivamente), y a las 48 hpio para *SS* (*MPc*: 4.0, *Pc*: 4.9 veces) (Figura 11). En plantas del tratamiento *MPc* inoculadas con el oomiceto a los 21 dpi con *M. enterolobii* (grupo 21d), por lo general también mostraron una acumulación de transcritos significativamente ( $P \leq 0.05$ ) inferior a la registrada en el tratamiento *Pc* correspondiente, a las 6 y 48 hpio para el caso de *HMG2* (*MPc*: 7.6, *Pc*: 17.3; y *MPc*: 27.5, *Pc*: 42.1 veces,

respectivamente), *HMG3* (*MPC*: 1.6, *Pc*: 2.0; y *MPC*: 2.5, *Pc*: 3.5 veces, respectivamente), y *EAS* (*MPC*: 77.5, *Pc*: 101.6; y *MPC*: 229.1, *Pc*: 339.0 veces, respectivamente), y a las 24, y 48 hpio para *SS* (*MPC*: 1.8, *Pc*: 2.3; y *MPC*: 2.0, *Pc*: 2.5 veces, respectivamente) (Figura 12).

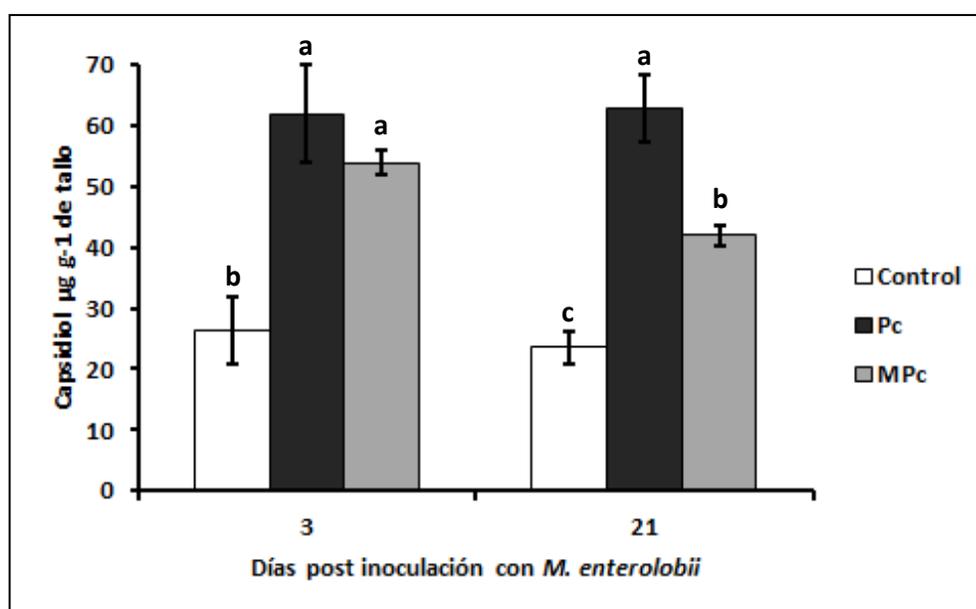


**Fig. 11.** Acumulación de transcritos de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS*, en tallos de plantas de chile CM334 resistentes a *P. capsici*. Pc: inoculadas sólo con *Phytophthora capsici*; MPC: inoculadas con *Meloidogyne enterolobii* y con *P. capsici*. Las plantas se inocularon con el oomiceto 3 días posteriores a la inoculación con el nematodo (grupo 3d). 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 Gliceraldehído 3-fosfato 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.



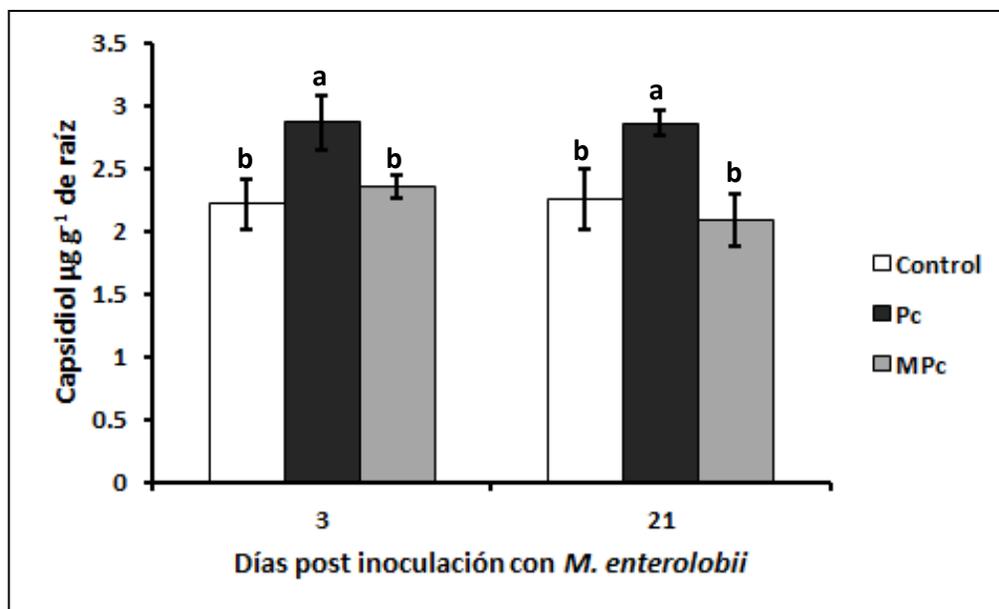
**Fig. 12.** Acumulación de transcritos de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS*, en tallos de plantas de Chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. Pc: inoculadas sólo con *P. capsici*; MPc: inoculadas con *Meloidogyne enterolobii* y con *P. capsici*. Las plantas se inocularon con el oomiceto 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo (grupo 21d). 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 Gliceraldehído 3-fosfato 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 tallos y raíces.** A las 144 horas posteriores a la inoculación con el oomiceto, los niveles de la fitoalexina en tallo generalmente fueron superiores en plantas inoculadas sólo con *P. capsici* (*Pc*) o con ambos patógenos (*MPc*), en comparación con los de las plantas control, a los 3 y 21 dpi con *M. enterolobii* (grupos 3d y 21d, respectivamente). Sin embargo, las diferencias entre los tratamientos *Pc* y *MPc* fueron significativas ( $P \leq 0.05$ ) solamente a los 21 dpi con el nematodo (62.7, y 41.9  $\mu\text{g g}^{-1}$  de tallo, respectivamente), los niveles en el tratamiento *MPc* fueron 33.2 % inferiores a los del tratamiento *Pc* (Figura 13).



**Fig. 13.** Acumulación de capsidiol en tallos de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. *Pc*: inoculadas sólo con *P. capsici*; *MPc*: inoculadas con *Meloidogyne enterolobii* y con *P. capsici*; Control: plantas con discos de medio V8 sin micelio. Los tallos de las plantas se inocularon con el oomiceto 3 ó 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo en la raíz (grupos 3d y 21d, respectivamente). Cada barra representa el promedio de tres extracciones y la línea en cada barra la desviación estándar. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). El experimento se repitió una vez.

En raíces de CM334 los niveles de la fitoalexina siempre fueron superiores en plantas cuyos tallos fueron inoculados únicamente con *P. capsici* (*Pc*), en comparación con las plantas control, y con las inoculadas con ambos patógenos (*MPc*) ( $P \leq 0.05$ ). Así, a 3 dpi con *M. enterolobii*, los niveles en el tratamiento *MPc* ( $2.4 \mu\text{g g}^{-1}$  de raíz) fueron 17.2% inferiores a los del tratamiento *Pc* ( $2.9 \mu\text{g g}^{-1}$  de raíz); y a 21 dpi, las diferencias entre ambos tratamientos fueron de 27.6% (*MPc*: 2.1, *Pc*:  $2.9 \mu\text{g g}^{-1}$  de raíz) (Figura 14).



**Fig. 14.** Acumulación de capsidiol en raíces de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. *Pc*: inoculadas sólo con *P. capsici*; *MPc*: inoculadas con *Meloidogyne enterolobii* y con *P. capsici*; Control: plantas con discos de medio V8 sin micelio. Los tallos de las plantas se inocularon con el oomiceto 3 ó 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo en la raíz (grupos 3d y 21d, respectivamente). Cada barra representa el promedio de tres extracciones y la línea en cada barra la desviación estándar. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). El experimento se repitió una vez.

Al igual que en el experimento con *N. aberrans*, a 3 ó 21 días post-inoculación con *M. enterolobii*, los niveles de expresión de *HMG2*, *HMG3* y *EAS* registrados en tallos de plantas de chile CM334 inoculadas con el oomiceto estuvieron positivamente correlacionados. Los altos niveles de transcritos de *EAS* a 48 hpio, también se correlacionaron positivamente con la acumulación de capsidiol registrada a 144 hpio (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre niveles de expresión génica, y entre los niveles de *EAS* y el contenido de capsidiol en tallos de plantas de chile CM334 infectadas por *Meloidogyne enterolobii* e inoculadas con *Phytophthora capsici*.

dpin <sup>†</sup>		<i>HMG2</i>	<i>EAS</i>
3	<i>HMG3</i>	0.97*	0.91*
	<i>EAS</i>	0.96*	
	Capsidiol		0.98*
21	<i>HMG3</i>	0.99*	0.97*
	<i>EAS</i>	0.97*	
	Capsidiol		0.95*

<sup>†</sup>Días posteriores a la inoculación con el nematodo. \* $P \leq 0.05$

## DISCUSIÓN

La amplificación exitosa de un único fragmento utilizando los iniciadores ITS de *N. aberrans* con DNA de juveniles J<sub>2</sub> de este nematodo es consistente con lo reportado por (Atkins *et al.*, 2005), pues el fragmento de la población mexicana de esta especie corresponde a ~173 pb. Con muestras de DNA de J<sub>2</sub> de *M. enterolobii*, utilizando los iniciadores específicos IGS2 o SCAR se obtuvo un único fragmento (~236 y ~520 pb, respectivamente), lo cual concuerda con lo reportado en la literatura correspondiente (Long *et al.*, 2006; Tigano *et al.*, 2010). A su vez, los iniciadores específicos SCAR de *M. incognita* generaron un único fragmento con DNA de J<sub>2</sub> de este nematodo y fue del tamaño esperado (~999 pb) (Meng *et al.*, 2004). La ausencia de amplificación del DNA de *N. aberrans*, *M. incognita* y de *M. enterolobii* con iniciadores improprios, confirman la especificidad de los primers utilizados y garantizan la pureza del DNA de cada muestra

de nematodos utilizados en este trabajo. Para *N. aberrans*, *M. enterolobii*, y *M. incognita*, los porcentajes de similitud de las secuencias correspondientes encontradas en el Genbank fueron altos; a excepción del fragmento de *M. enterolobii* (~520 pb) para el cual no se encontró correspondencia, debido a que en dicha base de datos no se encuentran registros de secuencias SCAR de este nematodo; sin embargo, exhibió el 100% de similitud con una secuencia SCAR proporcionada por los investigadores que diseñaron los iniciadores específicos para esta especie (Tigano *et al.*, 2010).

La línea de chile CM334 es altamente resistente al oomiceto *P. capsici* y a las tres principales especies de *Meloidogyne* (*M. incognita*, *M. javanica*, y *M. arenaria*) (Gil-Ortega *et al.*, 1991; Oelke *et al.*, 2003; Pegard *et al.*, 2005; Djian-Caporalino *et al.*, 2007); sin embargo, es susceptible al nematodo falso agallador *N. aberrans*, quien además compromete la resistencia al oomiceto en la raíz (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). Datos sobre la infección de raíces de chile CM334 por *N. aberrans* ya han sido documentados con anterioridad (Godínez-Vidal *et al.*, 2013; García-Espinoza, 2011). Los resultados del presente estudio muestran una tendencia similar a la reportada por García-Espinoza (2011), ya que la presencia de individuos dispuestos en forma de espiral o de "C" (peculiar de J<sub>3</sub>-J<sub>4</sub>) y la de hembras adultas se registró a los 21 y 40 días post-inoculación (dpi).

La infección de raíces de CM334 por *M. enterolobii* (= *M. mayaguensis*) fue clara y evidente, el nematodo completó su ciclo de vida y la descendencia infectó a nuevas plantas de chile CM334 y de jitomate, colocadas en las mismas macetas a los 75 días después de haber realizado la inoculación de las plantas de chile del Experimento 2. Como era de esperarse, el agallamiento inducido por *M. enterolobii* en CM334 y la presencia de hembras adultas se registró más tempranamente (21 dpi), mientras que para *N. aberrans* lo fue hasta los 40 dpi. Las diferencias en el ciclo de vida han sido documentadas. Se sabe que el ingreso de los juveniles J<sub>2</sub> de *Meloidogyne* spp. a la raíz ocurre entre las 3 y 48 horas post-inoculación, y una vez dentro migran intercelularmente e inmediatamente adoptan el hábito sésil, y completan su ciclo de vida entre 21 y 42 días dependiendo de las condiciones ambientales y del hospedante (Von

Mende, 1997; Abad *et al.*, 2009). En cambio, la migración de los juveniles J<sub>2</sub> de *N. aberrans* es intracelular y tienden a ingresar y salir de la raíz repetidamente, hasta adoptar el hábito sésil (estadio de hembra J4 o inmadura) completando su ciclo entre los 28 y 95 días (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Esto puede explicar el porqué del mayor número de J<sub>2</sub> por raíz registrados a 3 dpi para *M. enterolobii*, en comparación con *N. aberrans*. Para este último el mayor número de individuos en chile CM334 se registró entre los 7 y 21 dpi (Godínez-Vidal *et al.*, 2013; García-Espinoza, 2011).

*M. enterolobii* es una especie emergente considerada polífaga por su amplio rango de hospedantes, y por su notable capacidad patogénica para superar la resistencia de jitomate y chile a *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica* (Brito *et al.*, 2007; Castagnone-Sereno, 2012). En jitomate la resistencia a estas tres especies está gobernada por los genes *Mi-1*; mientras que en chile es conferida por los genes *Me1*, *Me3*, *Me7*, *N*, y *Tabasco* (Wang y Bosland, 2006; Djian-Caporalino *et al.*, 2007; Williamson y Roberts, 2009); sin embargo, se ha demostrado que los genes *Mi-1*, *N*, y *Tabasco* no son efectivos contra *M. enterolobii* (Brito *et al.*, 2007). La resistencia termoestable de la línea de chile CM334 a estas especies es dominante, y es conferida por el gen *Me7*; así, este material responde hipersensitivamente y exhibe una marcada acumulación de ácido clorogénico bloqueando la migración, desarrollo y reproducción exitosa del nematodo (Pegard *et al.*, 2005; Djian-Caporalino *et al.*, 2007); con base en lo anterior, los resultados del presente trabajo sugieren que estos mecanismos de resistencia fueron ineficientes para restringir el establecimiento de *M. enterolobii* en CM334.

La enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) es codificada por una familia de genes diferencialmente regulados en respuesta a estrés biótico y abiótico conduciendo a la biosíntesis de diferentes tipos de isoprenoides como esteroides y fitoalexinas sesquiterpénicas. En *Capsicum annum* L., se reportan al menos tres miembros: *HMG1*, *HMG2*, y *HMG3*, (Chappell, 1995; Ha *et al.*, 2003). En el presente trabajo en tallos de plantas de chile CM334 (Grupos 3d y 21d) de ambos experimentos (Experimento 1 con *N. aberrans*, y Experimento 2 con *M. enterolobii*), la sobre-expresión de los genes *HMG2* y *EAS* en respuesta a la inoculación con *P. capsici* (Figuras 7, 8, 11 y

12) se relacionó con la elevada acumulación de capsidiol en tallos, registrada a las 144 horas post-inoculación (hpi) con el oomiceto (Figuras 9 y 13). El gen *EAS* codifica para la enzima 5-epiaristológeno sintasa (EAS), una sesquiterpeno ciclasa (SC) implicada en la biosíntesis de capsidiol; y la expresión de *EAS* y *SC*, así como la acumulación de la fitoalexina en genotipos de Chile frecuentemente se asocia con la resistencia a *P. capsici* (Egea *et al.*, 1996a; Zavala-Paramo *et al.*, 2000; Silvar *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Silvar *et al.*, (2008) reportaron la sobre-expresión del gen *SC* en raíces de Chile CM331 inoculadas con *P. capsici* (interacción incompatible); un resultado similar, fue reportado por Fernández-Herrera *et al.*, (2012) en la interacción Chile CM334-*P. capsici*, donde los altos niveles de transcritos de *EAS* estuvieron asociados con una marcada acumulación de capsidiol. En la presente investigación, la expresión de *EAS* registrada en tallos de CM334 contrasta con los bajos niveles reportados en raíces de Chile por Fernández-Herrera *et al.*, (2012); es posible que el hecho de haber realizado un muestreo más localizado, tomando el tejido debajo del sitio donde se inoculó el oomiceto, se haya evitado la dilución de transcritos y por ende detectado mayores niveles de expresión.

La activación de *HMG2* por *P. capsici* ha sido documentada. Ha *et al.*, (2003) reportan la sobre-expresión de este isógeno en raíces de *C. annuum* (cv. Nockwang) en respuesta al ataque por el oomiceto, misma que estuvo coordinada con una fuerte expresión del gen *SC*, y la máxima expresión de ambos se detectó a 48 hpi y sugirieron que *HMG2* podría estar implicado en la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas. En tallos de plantas de Chile CM334 inoculadas con el oomiceto (*Pc*) también se hizo evidente la relación entre la expresión de *HMG2* y *EAS*, tanto en plantas inoculadas con *N. aberrans* como en las inoculadas con *M. enterolobii*, ambos genes estuvieron positivamente correlacionados. Similarmente, los altos niveles de transcritos de *EAS* se correlacionaron positivamente con los altos niveles de la fitoalexina (Cuadros 4 y 5). Tanto en plantas de Chile como de tabaco, el capsidiol se acumula de forma concordante con la sobre-expresión de *EAS* (Bohlmann *et al.*, 2002; Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012), quizá para restringir exitosamente el avance del patógeno. La correlación positiva entre la sobre-expresión de *HMG3* con la de *HMG2* y *EAS* (Cuadros 4 y 5), sugiere que aquel podría estar implicado en mecanismos de defensa

de CM334. Por ejemplo, en *Solanum tuberosum* los niveles de expresión de *HMG3* se incrementaron en respuesta al ataque por una raza incompatible de *P. infestans* y fueron similares a los de *HMG2*, ambos isógenos se han asociado con la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas (Choi *et al.*, 1992).

En el experimento con *N. aberrans*, la acumulación de transcritos de *HMG2*, *HMG3*, y *EAS* en tallos de plantas de chile CM334 inoculados con *P. capsici* a 3 días post-inoculación (dpi) con el nematodo (*NaPc*) (grupo 3d), fueron generalmente reducidos en contraste con aquellas inoculadas solo con el oomiceto (tratamiento *Pc*); la tendencia fue similar a 21 dpi con el nematodo (grupo 21d) (Figuras 7 y 8). Las alteraciones transcripcionales registradas a 21 dpi con *N. aberrans*, se reflejaron en el contenido de capsidiol en tallos de plantas CM334 (Figura 9); también en raíces de plantas del tratamiento *NaPc*, a 3 y 21 dpi con el nematodo, se registraron niveles reducidos de la fitoalexina en contraste con el tratamiento *Pc*. Tales modificaciones inducidas por el nematodo a nivel de raíz se expresaron sistémicamente alterando la magnitud de la respuesta a *P. capsici* en tallos de este genotipo. Con anterioridad Fernández-Herrera *et al.*, (2012), consignaron que en raíces de plantas CM334 inoculadas con *N. aberrans* y con *P. capsici*, en comparación con las inoculadas solamente con el oomiceto, hubo una expresión tardía de *EAS* y generalmente una acumulación reducida de capsidiol, mientras que en aquellas inoculadas sólo con el nematodo la expresión del gen y el contenido de la fitoalexina fueron mucho más reducidos. Por su parte, Godínez-Vidal *et al.*, (2010) reportan que hubo una menor acumulación de la fitoalexina en este genotipo, a 7 y 14 dpi con *N. aberrans*, en comparación con las plantas no inoculadas; la toxicidad de dicho compuesto para este nematodo también fue demostrada. Los efectos sistémicos de la infección por *N. aberrans* en CM334, se han documentado; por ejemplo, Villar-Luna *et al.*, (2009) reportan que en plantas CM334 a 21 dpi con el nematodo hubo un retraso de la respuesta hipersensitiva a *P. capsici* o a *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* en el follaje, y tal retraso se asoció con una reducción en el contenido de capsidiol. De igual manera, Sandoval-Luna (2011) encontró que en plantas CM334 infectadas por el nematodo e inoculadas con el oomiceto en hojas o tallos, la actividad de la enzima PAL (fenilalanina amonio liasa) y el contenido de FST (fenoles solubles totales) fueron reducidos en raíces,

tallos, y hojas; ambas respuestas están implicadas en defensa en interacciones incompatibles chile-*P. capsici* (Candela *et al.*, 1995; Godínez-Vidal *et al.*, 2008). A su vez, López-Martínez *et al.*, (2011) encontraron que en la interacción compatible CM334-*N. aberrans*, a 5 dpi con el nematodo, se registró una reducción en los niveles de ácido clorogénico tanto en raíz como en el follaje en contraste con la interacción incompatible CM334-*Meloidogyne incognita*; cabe destacar que la acumulación de este compuesto fenólico en chile CM334 se asoció con su resistencia a *M. incognita*, *M. arenaria*, y *M. javanica* (Pegard *et al.*, 2005).

Al igual que en el experimento con *N. aberrans*, en el experimento con *M. enterolobii*, generalmente se registraron niveles reducidos de transcritos de los genes *HMG2*, *HMG3*, y *EAS* en tallos de plantas CM334 inoculados con *P. capsici* a 3 ó 21 dpi con *Meloidogyne enterolobii* (*MPc*) (Figuras 11 y 12), en comparación con los registrados en plantas del tratamiento *Pc*. El contenido de capsidiol también fue reducido en tallos de plantas CM334 del tratamiento *MPc* solamente a los 21 dpi con el nematodo, en comparación con los del tratamiento *Pc* (Figura 13); pero en raíces los niveles fueron diferentes entre estos tratamientos en ambos tiempos de evaluación (3 y 21 dpi). La habilidad parasítica de *Meloidogyne* spp para atenuar los mecanismos de defensa en sus hospedantes e incluso comprometer la resistencia de la planta a otros patógenos está ampliamente documentada (Back *et al.*, 2002; Caillaud *et al.*, 2008; Abad y Williamson, 2010). Por ejemplo Marley y Hillocks (1994) encontraron que en plantas de *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (cv. ICP9145) resistentes a *Fusarium udum*, los niveles de la fitoalexina isoflanoide cajanol fueron reducidos en plantas infectadas por *M. incognita* y *M. javanica* y se comportaron como susceptibles al hongo.

Los nematodos agalladores, establecen una interacción íntima y sofisticada con sus hospedantes susceptibles e inducen la formación de células gigantes que constituyen los sitios especializados de alimentación (Gheysen y Fenoll, 2002; Gheysen y Mitchum, 2009). Durante este proceso ocurren alteraciones dramáticas en la expresión de genes de la planta hospedante (sobre-expresión y represión) que van desde efectos locales hasta sistémicos; así, para garantizar la conclusión exitosa de su ciclo de vida,

promueven la sobre-expresión de genes cuyos productos les favorecen, mientras que aquellos cuyos productos pueden restringir su establecimiento y reproducción, son reprimidos (Jammes *et al.*, 2005; Bird *et al.*, 2009; Gheysen y Mitchum, 2009; Li *et al.*, 2009). Al respecto, Kindt *et al.*, (2012) reportan que en brotes de plantas de *Oryza sativa* L. (cv. Nipponbare) infectadas en la raíz por *M. graminicola*, se registraron niveles reducidos de mRNA de genes que ejercen funciones clave de defensa en las rutas de ácido salicílico, de ácido jasmónico y de etileno, a 3 dpi con este nematodo. En la interacción compatible *Arabidopsis thaliana*-*M. incognita* se observó la supresión a nivel local de genes de defensa asociados con factores de transcripción WRKY, y con las rutas dependientes del ácido jasmónico y etileno (Jammes *et al.*, 2005; Caillaud *et al.*, 2008). También en la interacción compatible *Solanum lycopersicum*-*M. javanica* se registraron expresiones reducidas de genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis como peroxidasas (Bar-Or *et al.*, 2005).

El gen *SS* codifica para la enzima escualeno sintasa (SS), cuya actividad da lugar a la formación del escualeno, metabolito a partir del cual se sintetiza el 2, 3-oxidoescualeno, substrato utilizado por las oxidoescualeno ciclasas para la formación de esteroides y triterpenos (Suzuki y Muranaka, 2007). En plantas los tres principales esteroides son sitosterol, estigmaesterol, y campesterol; este último es el precursor para la síntesis de brasinoesteroides (BRs), una clase de hormonas involucradas en regulación del crecimiento y desarrollo, pero que además participan en respuestas de defensa de las plantas (Hartmann, 2004; Schaller, 2004). Por ejemplo, en plantas de tabaco tipo silvestre inoculadas con el *Tobacco mosaic virus* (TMV) (interacción incompatible) se detectó una mayor acumulación de 6-deoxocastasterona y castasterona, precursores biosintéticos del brasinólido (considerado como el más activo de los BRs) y que actúan como moduladores de mecanismos de defensa en estas plantas (Nakashita *et al.*, 2003). Además, está documentado que participan en la estimulación de la síntesis de proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) como quitinasas,  $\beta$ -1, 3-glucanasas, y peroxidasas (Bajguz y Hayat, 2009). Adicionalmente, se reporta que en *A. thaliana* las aplicaciones exógenas de brasinólido indujeron la expresión de los genes *OPR1* y *OPR3* que codifican para la 12-oxofitodienoato reductasa, implicada en la biosíntesis de ácido jasmónico (AJ),

molécula de señalización que activa múltiples respuestas de defensa contra patógenos (Goda *et al.*, 2002; Halim *et al.*, 2006; Müssig *et al.*, 2006). Cabe mencionar que en Chile CM334, la sobreexpresión de los genes que codifican para  $\beta$ -1, 3-glucanasas y peroxidases (*GLU* y *POX*, respectivamente), así como la del gen *OPR3*, se han asociado con su resistencia a *P. capsici* (Ueeda *et al.*, 2006; Fernandez-Herrera *et al.*, 2012). Con base en estos antecedentes y los resultados obtenidos en los Experimentos 1 y 2, se podría especular, que los altos niveles de transcritos de *SS* registrados en la interacción incompatible CM334-*P. capsici* (*Pc*), pudiesen estar asociados con síntesis de BRs moduladores de mecanismos de defensa en las plantas de Chile, como la activación de los genes *OPR3*, *GLU* y *POX*. A su vez, los niveles reducidos de transcritos de *SS* registrados en tallos de plantas de Chile CM334 inoculados con *P. capsici* particularmente a 21 dpi con *N. aberrans* o con *Meloidogyne enterolobii* (*NaPc* o *MPc*) en contraste con las del tratamiento *Pc*; sugieren que ambos nematodos podrían estar interfiriendo con la biosíntesis de BRs en este genotipo, que de alguna forma podrían comprometer su ciclo de vida.

En ambos experimentos, los niveles de transcritos del gen *EAS* (implicado en la biosíntesis de capsidiol) en tallos de CM334 inoculados solamente con *P. capsici* (tratamiento *Pc*), fueron muy superiores a los registrados para el gen *SS* (implicado en la biosíntesis de esteroides) en este mismo tratamiento. Tales resultados sugieren que podría existir una regulación coordinada en la expresión de ambos genes en respuesta a la infección por el oomiceto; así, aun cuando el ataque por *P. capsici* hipotéticamente promovió la defensa mediada por *SS*, ésta fue de menor magnitud que la mediada por *EAS*. Por ejemplo, en células en suspensión de *Nicotiana tabacum*, la elicitación con fragmentos de paredes celulares de *P. parasitica* condujo a una alta actividad de sesquiterpeno ciclasa y a una reducción de la actividad de escualeno sintasa (Vögeli y Chapell, 1988). Existe evidencia de que en la ruta del ácido mevalónico, el metabolismo de sesquiterpenos y esteroides está sujeto a una regulación tanto positiva como negativa; donde, bajo condiciones normales del crecimiento vegetal, cerca del 40% del flujo de carbono es dirigido a la biosíntesis de escualeno, el precursor común de esteroides; sin embargo, si la planta es atacada por un patógeno o tratada con elicitores, la biosíntesis de

esteroles es reducida y aproximadamente el 20% del flujo de carbono es desviado hacia la biosíntesis *de novo* de fitoalexinas sesquiterpénicas (Takahashi *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en este trabajo, indican que tanto *N. aberrans* como *M. enterolobii* se establecieron exitosamente en raíces de chile CM334, y a 3 ó 21 dpi modificaron los patrones de expresión de genes de la ruta mevalónica (*HMG2*, *HMG3*, *EAS*, y *SS*) a nivel sistémico (tallos), y los niveles de capsidiol a nivel sistémico y local (raíz), posiblemente para crear el ambiente favorable que les permitió completar su ciclo de vida.

## LITERATURA CITADA

**Abad, P., Castagnone-Sereno, P., Rosso, M. N., de Almeida, E. J., and Favery, B. 2009.** Invasion, feeding and development. *In*: Perry, R. N., Moens, M., y Starr, J. L. (Eds.). Root-knot nematodes. CAB International, Wallingford, UK. pp: 163-181.

**Abad, P., and Williamson, V. M. 2010.** Plant nematode interaction: a sophisticated dialogue. *Adv. Bot. Res.* 53: 147-192.

**Atkins, S. D., Manzanilla-López, R. H., Franco, J., Peteira, B., and Kerry, B. R. 2005.** A molecular diagnostic method for detecting *Nacobbus* in soil and in potato tubers. *Nematology* 7: 193-202.

**Back, M. A., Haydock, P. P. J., and Jenkinson, P. 2002.** Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. *Plant Pathol.* 51: 683-697.

**Bajguz, A., and Hayat, S. 2009.** Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 1-8.

**Bar-Or, C., Kapulnik, Y., and Koltai H. 2005.** A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Eur. J. Plant Pathol.* 111: 181-192.

**Bird, M. D., Opperman, C. H., and Williamson, V. M. 2009.** Plant infection by root-knot nematode. *In*: Berg, R. H., y Taylor, C. G. (Eds.). Cell biology of plant nematode parasitism. *Plant Cell Monographs.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp: 1-14.

**Bohlmann, J., Stauber, E. J., Krock, B., Oldham, N. J., Gershenzon, J., and Baldwin, I. T. 2002.** Gene expression of 5-epi-aristolochene synthase and formation of capsidiol in roots of *Nicotiana attenuata* and *N. sylvestris*. *Phytochemistry* 60: 109-116.

**Brito, J. A., Stanley, J. D., Kaur, R., Cetintas, R., Di Vito, M., Thies, J. A., and Dickson, D. W. 2007.** Effects of the *Mi-1*, *N* and *Tabasco* genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. *J. Nematol.* 39: 327-332.

**Bybd, D. W. Jr., Kirkpatrick, and Barker, K. R. 1983.** An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *J. Nematol.* 15: 142-143.

**Caillaud, M. C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., Engler, J. de A., Abad, P., Rosso, M. N., and Favery, B. 2008.** Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *J. Plant Physiol.* 165:104-113.

**Candela, M. E., Alcázar, M. D., Espín, A., Egea, C., and Almela, L. 1995.** Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathol.* 44:116-123.

**Candela, M. E., Egea, C., García-Pérez, M. D., Costa, J., and Candela, M. 2000.** Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Hort.* 522: 79-86.

**Castagnone-Sereno, P. 2012.** *Meloidogyne enterolobii* (= *M. mayaguensis*): profile of an emerging, highly pathogenic, root-knot nematode species. *Nematology* 14: 133-138.

**Chappell, J., VonLanken, C., and Vögeli, U. 1991.** Elicitor-inducible 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity is required for sesquiterpene accumulation in tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 97: 693-698.

**Chappell, J. 1995.** Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 521-547.

**Chávez-Moctezuma, M. P., and Lozoya-Gloria, E. 1996.** Biosynthesis of the sesquiterpenic phytoalexin capsidiol in elicited root cultures of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Rep.* 15: 360-366.

**Choi, D., Ward, B. L., and Bostock, R. M. 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.

**Choi, D., Bostock, R. M., Avdiushko, S., and Hildebrand, D. F. 1994.** Lipid-derived signals that discriminate wound and pathogen responsive isoprenoid pathways in plants: Methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 2329-2333.

**Djian-Caporalino, C., Fazari, A., Arguel, M. J., Vernie, T., VandeCastele, C., Faure, I., Brunoud, G., Pijarowski, L., Palloix, A., Lefebvre, V., and Abad, P. 2007.** Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theor. Appl. Genet.* 114: 473-486.

**Egea C., Alcazar, M. D., and Candela, M. E. 1996a.** Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* 98: 737-742.

**Egea, C., García, P. M. D., and Candela, M. E. 1996b.** Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* 149: 762-764.

**Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arro, M., and Boronat, A. 1994.** *Arabidopsis thaliana* contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:927-931.

**Enjuto, M., Lumberras, V., Marin, C., and Boronat, A. 1995.** Expression of the *Arabidopsis HMG2* Gene, Encoding 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues. *Plant Cell* 7: 517-527.

**Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996.** *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. 562 p.

**Fernández-Herrera, E., Rojas-Martínez, R.I., Guevara-Olvera, L., Rivas-Dávila, M. E., Valadez-Moctezuma, E., y Zavaleta-Mejía, E. 2012.** Defensa en chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici* e infectado por *Nacobbus aberrans*. *Nematopica* 42:96-107.

**Fernández-Pavia, S. 1997.** Host-Pathogen interactions in the root rot *Phytophthora capsici* / *Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph. D. Thesis. New Mexico State University. 109 p.

**García- Espinoza, J. A. 2011.** Expresión de los genes *SS* y *CAS* en chile CM334 inoculado con *Nacobbus aberrans* y con *Meloidogyne incognita*. Tesis de Maestría en Ciencias Colegio de Postgraduados Montecillo, Edo. de México. 43 p.

**Gheysen, G., and Fenoll, C. 2002.** Gene expression in nematode feeding sites. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40: 191-219.

**Gheysen, G., and Mitchum, M. G. 2009.** Molecular insights in the susceptible plant response to nematode infection. *In:* Berg, R. H., y Taylor, C. G. (Eds.). *Cell biology of plant nematode parasitism.* Plant Cell Monographs. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp: 45-81.

**Gil-Ortega, R., Palazon, E. C., and Cuartero, Z. J. 1991.** Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the pepper line "SCM-334" *Plant Breed.* 107: 50-55.

**Glosier, B. R., Ogundiwin, E. A., Sidhu, G. S., Sischo, D. R., and Prince, J. P. 2008.** A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiologica races of P. capsici in pepper*. *Euphytica* 162: 23-30.

**Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S. and Yoshida, S. 2002.** Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 130: 1319-1334.

**Godínez-Vidal, D., Rocha-Sosa, M., Sepúlveda-García, E. B., Lara-Reyna, J., Rojas-Martínez, R. I., and Zavaleta-Mejía, E. 2008.** Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 120:299-303.

**Godínez-Vidal, D., Soto-Hernández, M., Rocha-Sosa, M., Lozoya-Gloria, E., Rojas-Martínez, R. I., Guevara-Olvera, L., y Zavaleta-Mejía, E. 2010.** Contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por *Nacobbus aberrans* y su efecto en juveniles del segundo estadio. *Nematropica* 40:227-237.

**Godínez-Vidal, D. Rocha-Sosa, M., Sepúlveda-García, E. B., Lozoya-Gloria, E., Rojas-Martínez, R., Guevara-Olvera, L., and Zavaleta-Mejia, E. 2013.** Transcript accumulation of the mevalonate pathway genes and enzymatic activity of HMGCofA-r and EAS in chilli CM-334 infected by the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. *Plant Soil*. DOI: 10.1007/s11104-013-1743-8.

**Ha, S. H., Kim, J. B., Hwang, Y. S., and Lee, S. W. 2003.** Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced *Hmg2* from pepper (*Capsicum annuum*). *Biochim. Biophys. Acta* 1625:253–260.

**Halim, V. A., Vess, A., Scheel, D., and Rosahl, S. 2006.** The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. *Plant Biol.* 8: 307-313.

**Hartmann, M. A. 2004.** Sterol metabolism and functions in higher plants. *In: Daum, G.* (Ed.). *Lipid metabolism and membrane biogenesis. Topics in Current Genetics* 6. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp: 183-211.

**Jammes, F., Lecomte, P., de Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M. L., Renou, J. P., Abad, P., and Favery, B. 2005.** Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. *Plant J.* 44:447-458.

**Kiewnick, S., Dessimoz, M., y Franck, L. 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. *J. Nematol.* 41:134-139.

**Kyndt, T., Nahar, K., Haegeman, A., De Vleeschauwer, D., Höfte, M., and Gheysen, G. 2012.** Comparing systemic defence-related gene expression changes upon migratory and sedentary nematode attack in rice. *Plant Biol.* 14: 73-82.

**Li, Y., Fester, T., and Taylor, C. G. 2009.** Transcriptomic analysis of nematode infestation. *In:* Berg, R. H., y Taylor, C. G. (Eds.). *Cell biology of plant nematode parasitism.* Plant Cell Monographs. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. pp: 189-220.

**Long, H., Liu, H., and Xu, J. H. 2006.** Development of a PCR diagnostic for the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii*. *Acta Phytopathol. Sin.* 36: 109-115.

**Lopez-Martinez, N., Colinas-Leon, M. T., Peña-Valdivia, C. B., Salinas-Moreno, Y., Fuentes-Montiel, P., Biesaga, M., and Zavaleta-Mejía, E. 2011.** Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annum* L.) CM-334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant Soil* 338: 399-409.

**Maldonado-Bonilla, L. D., Betancourt-Jiménez, M., and Lozoya-Gloria, E. 2008.** Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *Eur. J. Plant Pathol.* 121:439-449.

**Manzanilla-López, R. H., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R.N., Lehman, P.S., Cid del Prado-Vera, I., Souza, R. M., and Evans, K. 2002.** The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32: 150-227.

**Marley, P. S., and Hillocks, R. J. 1994.** Effect of root-knot nematodes on cajanol accumulation in the vascular tissues of pigeonpea after stem inoculation with *Fusarium udum*. *Plant Pathol.* 43:172-176.

**Meng, Q. P., Long, H., and Xu, J. H. 2004.** PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. *Acta Phytopathol. Sin.* 34: 204-210.

**Müssig, C., Lisso, J., Coll-García, D., and Altmann, T. 2006.** Molecular analysis of brassinosteroid action. *Plant Biol.* 8: 291-296.

**Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., and Yoshida, S. 2003.** Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J.* 33: 887-898.

**Oelke, L. M., Bosland, P. W., and Steiner, R. 2003.** Differentiation of race specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annum*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 213-218.

**Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P., and Djian-Caporalino, C. 2005.** Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95: 158-165.

**Ristaino J, B., and Johnston, S. B. 1999.** Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Dis.* 83:1080-1089.

**SAS Institute Inc. 2002.** SAS Procedures Guide, Version 9.0 (Computer program). SAS Institute Inc., Cary, N.C.

**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.

**Schaller, H. 2004.** New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 465-476.

**Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. 2008.** Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nat. Protoc.* 3:1101-1108.

**Silvar, C., Merino, F., and Díaz, J. 2008.** Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* 165:1120-1124.

**Suzuki, M., and Muranaka, T. 2007.** Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis. *Lipids* 42: 47-54.

**Stermer, B. A., G. M. Bianchini, and K. L. Korth. 1994.** Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J. Lipid Res.* 35:1133-1140.

**Takahashi, S., Yeo, Y. S., Zhao, Y., O'Maille, P. E., Greenhagen, B. T., Noel, J. P., Coates, R. M., and Chapell, J. 2007.** Functional characterization of prenaspirodiene oxygenase, a cytochrome P450 catalyzing regio- and stereo-specific hydroxylations of diverse sesquiterpene substrates. *J. Biol. Chem.* 282: 31744-31754.

**Threlfall, D. R., and Whitehead, I. M. 1988.** Co-ordinated inhibition of squalene synthetase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* 27: 2567-2580.

**Tigano, M., de Siqueira, K., Castagnone-Sereno, P., Mulet, K., Queiroz, P., dos Santos, M., Teixeira, C., Almeida, M., Silva, J., and Carneiro, R. 2010.** Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* and development of a SCAR marker for this guava-damaging species. *Plant Pathol.* 59: 1054-1061.

**Trujillo-Viramontes, F., Zavaleta-Mejía, E., Rojas-Martínez, R. I., y Lara, J. 2005.** Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile. *Nematropica* 35:37-44.

**Ueeda, M., Kubota, M., and Nishi, K. 2006.** Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67:149-154.

**Vargas, E. M.T., Zavaleta-Mejía, E., y Hernández, A. A. M. 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., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R. I., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A. M., y Zavaleta-Mejía, E. 2009.** Respuesta hipersensitiva en el follaje de Chile CM.334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.

**Vögeli, U., and Chappell, J. 1988.** Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiol.* 72:864-869.

**Von Mende, N. 1997.** Invasion and migration behaviour of sedentary nematodes. *In:* Fenoll, C., Grundler, F. M. W., y Ohl, S.A. (Eds.). *Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp: 51-64.

**Vrain, T. C. 1977.** A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp and a comparison of eggs and larvae as inocula. *J. Nematol.* 9: 249-251.

**Wang, D., and Bosland, P. W. 2006.** The genes of *Capsicum*. *Hortscience* 41: 1169-1187.

**Weissenborn, D. L., Denbow, C. J., Laine, M., Lang, S. S., Yang, Z., Yu, X., and Cramer, C. L. 1995.** HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins: Molecular specialization within a complex pathway. *Physiol. Plant.* 93: 393-400.

**Williamson, V. M., and Gleason, C. A. 2003.** Plant-nematode interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:327-333.

**Williamson, V. M., and Roberts, P. A. 2009.** Mechanism and genetics of resistance. *In:* Perry, R. N., Moens, M., y Starr, J. L. (Eds.). *Root-knot nematodes*. CAB International, Wallingford, UK. Pp:301-325.

**Zavala-Páramo, G., Chávez-Moctezuma, M. P., García-Pineda, E., Yin, S., Chappell, J., and Lozoya-Gloria, E. 2000.** Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene

synthase gene (*gPEAS1*) from chilli pepper (*Capsicum annuum*). *Physiol. Plant.* 110: 410-418.

**Zavaleta-Mejía, E. 2002.** Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparasitos, una hipótesis. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 118-122.

**Zijlstra, C., Donkers-Venne, D. T. H. M., and Fargette, M. 2000.** Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified región (SCAR) based PCR assays. *Nematology* 2: 847-853.

## CAPÍTULO 3

### EXPRESSION OF TWO GENES ASSOCIATED WITH BIOSYNTHESIS OF SESQUITERPENE PHYTOALEXINS IN CHILLI CM334 INFECTED BY *Nacobbus aberrans* AND *Phytophthora capsici*

#### ABSTRACT

Plants of *Capsicum annuum* L. landrace CM334 show a high level of resistance to *Phytophthora capsici* and to some species of root-knot nematode *Meloidogyne* spp., but they are susceptible to *Nacobbus aberrans*. The resistance to the oomycete has been associated with capsidiol accumulation, a sesquiterpene phytoalexin. The genes *HMG2* and *EAS* which encode for the enzymes hydroxymethylglutaryl-CoA reductase and 5-epiaristolochene synthase, respectively, are associated with biosynthesis of sesquiterpene phytoalexins. In the present study it was determined the relationship between the expression of *HMG2* and *EAS* genes in CM334 chilli roots of plants inoculated with *N. aberrans*, and in combination with *P. capsici*. The levels of *HMG2* and *EAS* transcripts were significantly reduced ( $P \leq 0.05$ ) in a range from -1.57 to -1.28, and 2.93 to 4.84-fold, respectively, in the compatible interaction CM334/*N. aberrans*; whereas in roots inoculated only with the oomycete, the transcript accumulation for both genes occurred earlier and was more intense (*HMG2*: 1.52 to 3.54, and *EAS*: 14.51 to 27.93-fold). In plants inoculated with both pathogens, the expression of *HMG2* and *EAS* was greater, in comparison to those inoculated only with the nematode ( $P \leq 0.05$ ), but usually lower than the expression observed in plant roots inoculated only with the oomycete. The reduction in the expression of these defense-related genes in plants infected by the nematode, possibly contributes to create a favorable environment that allows *N. aberrans* to complete its life cycle in CM334 chilli roots.

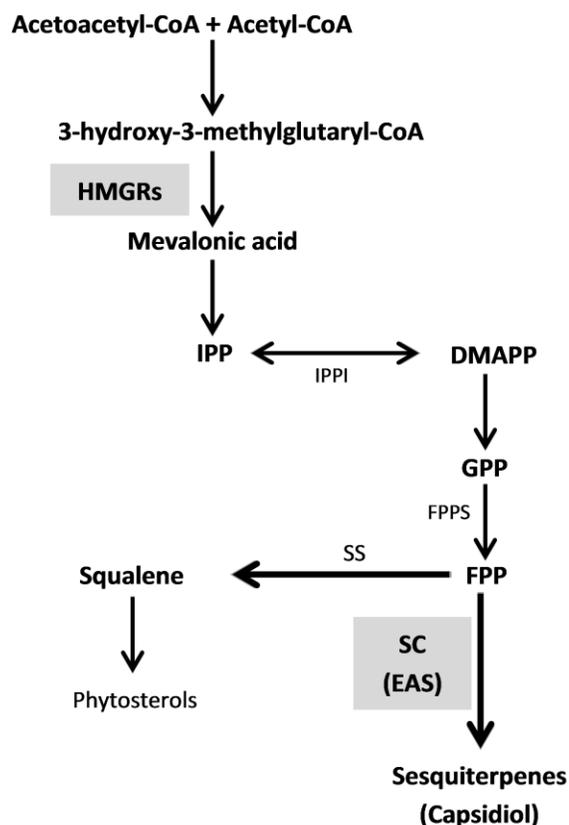
**Key words:** *Capsicum annuum*, real-time PCR, root-knot nematodes, capsidiol, *HMG2* gene, *EAS* gene.

## INTRODUCTION

The wilting induced by the oomycete *Phytophthora capsici* Leonian, is one of the main diseases that limit the production of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) in Mexico and worldwide (Redondo and Rodriguez, 1987; Erwing and Ribeiro, 1996). The use of genotypes resistant to the oomycete constitutes an economic and environmentally friendly strategy for disease management. The line known as “Criollo de Morelos 334” (CM334) displays a high level of resistance to multiple isolates of *P. capsici* worldwide; such resistance is expressed as a hypersensitive response in root, stem and foliage (Fernández-Pavia, 1997; Candela *et al.*, 2000; Ueeda *et al.*, 2006; Glosier *et al.*, 2008).

Plants have evolved a sophisticated arsenal of mechanisms to defend themselves against attacks by pathogens; those commonly involve the transcriptional activation of several defense-related genes. Such activation leads to the *de novo* synthesis of a variety of proteins and antimicrobial compounds (Yang *et al.*, 1997; Rushton and Somssich, 1998). In chilli pepper/*P. capsici* interactions increases in the expression of several defense-related genes have been observed, such as: *GLU* (Silvar *et al.*, 2008) which encodes for  $\beta$ -1, 3-glucanases (Egea *et al.*, 1999; Fernández-Herrera *et al.*, 2012); *POX* (Silvar *et al.*, 2008), for peroxidases (Fernandez-Pavia, 1997; Fernández-Herrera *et al.*, 2012); *OPR-3* for 12-oxophytodienoate reductase 3, associated with jasmonic acid biosynthesis (Ueeda *et al.*, 2006); and *HMG2*, *SC*, and *EAS* genes, which encode for hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, sesquiterpene cyclase, and 5-epiaristolochene synthase, respectively, which are involved in the biosynthesis of sesquiterpenic phytoalexins such as capsidiol (Zavala-Páramo *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2003; Silvar *et al.*, 2008) (Fig. 1). The enzyme hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGR), which catalyzes the mevalonate synthesis, is encoded by a multigene family that in *C. annuum* includes *HMG1*, *HMG2*, and *HMG3* (Ha *et al.*, 2003). In plants, these genes are differentially regulated and lead to the biosynthesis of different types of isoprenoids; thus, in *Arabidopsis thaliana*, the expression of *HMG1* and *HMG2* probably is associate with the biosynthesis of certain sterols and triterpenes (Enjuto *et al.*, 1994; Enjuto *et al.*, 1995). Also in *Solanum tuberosum*, *HMG1* is associated with the production of sterols,

whereas *HMG2* and *HMG3* are related to the biosynthesis of sesquiterpenic phytoalexins in response to attacks by pathogens (Choi *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1994); in *S. lycopersicum*, *HMG1* is probably associated with sterol biosynthesis, whereas *HMG2* is associated with defense responses against biotic and abiotic stress (Weissenborn *et al.*, 1995).



**Fig. 1.** Biosynthetic pathway of capsidiol (simplified scheme). Enzymes corresponding to the transcripts evaluated in this study are presented in a gray box. HMGRs: hydroxymethylglutaryl-CoA reductases; IPP: isopentenyl diphosphate; IPPI: IPP delta-isomerase; DMAPP: dimethylallyl diphosphate; GPP: geranyl diphosphate; FPP: farnesyl diphosphate; FPPS: (2*E*, 6*E*)-FPP synthase; SS: squalene synthase; SC: sesquiterpene cyclase; EAS: 5-epiaristolochene synthase.

Even though CM334 is highly resistant to the oomycete, the plants showed susceptibility when they were previously infected by the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* (Zavaleta-Mejía, 2002; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005), a phenomenon known as “resistance breaking”. This phenomenon, could partly be due to the transcriptional and biochemical changes induced by the nematode in the root of the host plant that affect, among other pathways, those involved in defense (Zavaleta-Mejía, 2002; Godínez-Vidal *et al.*, 2008; Villar-Luna *et al.*, 2009; Godínez-Vidal *et al.*, 2013; López-Martínez *et al.*, 2011; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Root-knot nematodes induce the formation of specialized feeding sites in their susceptible hosts, a process that involves the down-regulation and up-regulation of genes; for instance, in the interaction *Meloidogyne incognita*/ *A. thaliana*, genes involved in jasmonic acid/ethylene-dependent defense pathways, and also those involved in the synthesis of compounds with antimicrobial potential, were down-regulated locally; in contrast, there was an up-regulation of those related to the differentiation and maintenance of the specialized feeding site (Jammes *et al.*, 2005; Caillaud *et al.*, 2008). In CM334 chilli plants infected by *N. aberrans* and inoculated with *P. capsici*, there was a delay in *EAS* transcripts accumulation in comparison to those inoculated only with the oomycete, this event was related to a reduced accumulation of capsidiol (Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Thus, the reduction in the expression of defense-related genes could facilitate the establishment and successful reproduction of *N. aberrans* in chilli CM334, conditions which in turn could be favorable for the infection by *P. capsici*.

In order to generate information about the influence that *N. aberrans* has on the expression of the two main genes associated with the biosynthesis of sesquiterpenic phytoalexins, in the present study was determined the relationship between the expression of *HMG2* and *EAS* genes in CM334 plants inoculated with *N. aberrans*, and in combination with *P. capsici*.

## MATERIALS AND METHODS

### Chilli plants and inoculation with *N. aberrans* and *P. capsici*

Seeds of chilli CM334 sterilized with 1% sodium hypochlorite solution were germinated at  $28\pm 1$  °C in Petri dishes. After germination, the seedlings were transplanted singly into pots containing 25 mL of sterile sand, and were maintained in growth chambers at  $28\pm 1$  °C, and with a 14-hour photoperiod at a luminous intensity of 6768 lux (fluorescent light) and 10 hours of darkness. Plants were irrigated daily with sterile water, and fertilized weekly with nutrient solution (3.15 g of Nitrofoska™ 12-12-12 by liter of sterile water).

Inoculum preparation of both pathogens was carried out according to Villar-Luna *et al.*, (2009). Each plant was inoculated by pouring a suspension of *N. aberrans* (2000 second-stage juveniles) around the base of the stem at the stage of four to five expanded leaves. Twenty-one days after inoculation with the nematode, each plant was inoculated with 300 000 zoospores of *P. capsici* by pouring an appropriate volume of suspension around the base of the stem. In addition, susceptible chilli plants (var. J. E. Parker), were also inoculated as a pathogenicity reference of *P. capsici*, and of inoculation effectiveness.

### Assay establishment

There were four treatments: 1) non-inoculated CM334 plants (Control), 2) CM334 plants inoculated with *P. capsici* (*Pc*), 3) CM334 plants inoculated with *N. aberrans* (*N*), and 4) CM334 plants inoculated with both pathogens (*NPc*). Each treatment had 45 plants. At 6, 12 and 24 hours after inoculation with *P. capsici* (*haipc*), for each treatment and time the roots of 15 plants were removed from pots and washed in running tap water. Roots were immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80 °C. The experiment was repeated once.

## RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR

Total RNA was extracted from frozen root tissues using the RNeasy™ Plant mini kit and including a DNase treatment (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The purity and integrity of RNA was verified by spectrophotometry (ND-1000, Nanodrop Technologies) and by 1.2% denaturing agarose gel electrophoresis, respectively. First-strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using the oligo(dT<sub>15</sub>) primer (Promega) and M-MLV reverse transcriptase (Promega) following the manufacturer's instructions.

Gene expression levels were determined by real-time PCR on the ABI7500™ system (Applied Biosystems) in samples collected at different times after inoculation with the oomycete. The characteristics of the primers used in this study are shown in Table 1.

**Table 1.** Real-time PCR primers used in gene expression analysis.

Protein	Gene	Accession number <sup>†</sup>	‡Primers		PCR product (pb)
				Sequence (5' → 3')	
GAPDH	<i>GAPDH</i>	AJ246011	FW	GGCCTTATGACTACAGTTCACTCC	217
			RV	GATCAACCACAGAGACATCCACAG	
HMGR	<i>HMG2</i>	AF110383	FW	ATTACCTTCAGAAATGAATACGCT	316
			RV	CTCTCTATGTTTTGTGCTGGGT	
EAS	<i>EAS</i>	AJ005588	FW	GCTCAAGAAATTGAACCGCCGAAG	200
			RV	TCTTCATTATAGACATCGCCCTCG	

<sup>†</sup>NCBI (National Center for Biotechnology Information). GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, EAS: 5-epiaristolochene synthase, HMGR: hydroxymethylglutaryl-CoA reductase. <sup>‡</sup>All primers were designed by our working group.

The reaction mixture consisted of buffer 10X, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µM of each primer, 0.2 mM dNTPs, amplificase (Biotecmol), SYBR™ Green I (1:75000) (Molecular Probes, Eugene, OR) as the reporter fluorophore, 10 nM fluorescein as passive reference, 2 µL cDNA, and nuclease-free water were added to a final volume of 25 µL.

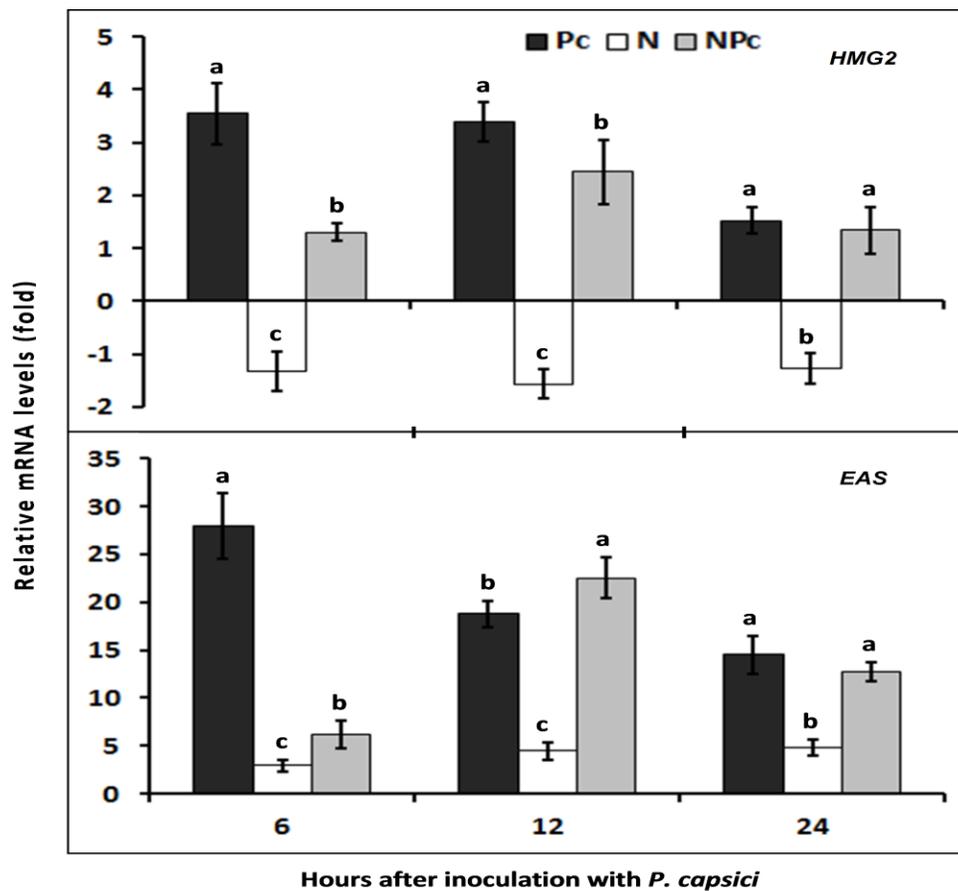
Amplification conditions consisted of an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 30 cycles at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 35 s, and extension at 72 °C for 35 s; the data were collected during the extension step. Dissociation curve analysis was performed to rule out amplification of non-specific products. Six technical replicates were performed for each treatment and each time. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene was used as internal reference to normalize expression level, and control plants to calibrate expression levels of the gene of interest, which were expressed as fold-change due to treatment in relation to the transcript basal levels in control plants (1x). Relative expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Schmittgen and Livak, 2008). PCR products were purified with QIAquick™ PCR purification Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and sequenced to confirm their identity. The data from each sampling time were submitted to analysis of variance in a completely randomized model, and when significant differences were detected, the means of treatments were compared using Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ). In addition, the Pearson's correlation coefficient was calculated to determine whether there was a relationship between the expression levels of *HMG2* and *EAS* genes. All statistical procedures were performed in SAS version 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

## RESULTS

At all times evaluated, the transcript levels of the gene *HMG2* were significantly reduced ( $P \leq 0.05$ ) in a range of -1.57 to -1.28-fold, in plant roots infected by *N. aberrans* alone (*N* treatment); the expression of *HMG2* in this treatment was below the basal expression registered in control plants. In contrast, plant roots inoculated with *P. capsici* alone (*Pc* treatment) showed the highest levels of expression (1.52 to 3.54-fold) ( $P \leq 0.05$ ), in this incompatible interaction (CM334-*P. capsici*) the maximum expression of the gene was observed at 6 haipc (3.54-fold) and then decreased at later time. At 6 and 12 haipc the transcript levels were reduced by 1.30 to 2.44-fold ( $P \leq 0.05$ ) in plants inoculated with both pathogens (*NPc* treatment) as compared to those in plants of the *Pc* treatment (1.52 to 3.54-fold), but at 24 haipc the reduction was not significant in comparison to the plants inoculated with the oomycete alone. In plants of the *NPc*

treatment there was a delay in the expression of the gene, as the maximum expression of *HMG2* was observed until the 12 haipc (2.44-fold) and decreased at 24 haipc (Fig. 2).

The expression of the gene *EAS* was significantly lower ( $P \leq 0.05$ ), in a range of 2.93 to 4.84-fold, in plant roots infected by *N. aberrans* alone; conversely, those inoculated only with *P. capsici* showed increases of 14.51 to 27.93-fold in the expression levels. The maximum accumulation of transcripts of this gene (27.93-fold) in plants of the *Pc* treatment was recorded at 6 haipc and then decreased at later time; such expression was greater ( $P \leq 0.05$ ) than that observed in plants of the *NPc* treatment (6.22-fold); however, at 12 haipc the levels in *NPc* (22.5-fold) surpassed those of the *Pc* treatment (18.78-fold), in both treatments the expression of *EAS* at 24 haipc was reduced. The transcript levels of plants inoculated with the two pathogens (*NPc*) were always superior ( $P \leq 0.05$ ) to those inoculated with the nematode alone (2.93 to 4.84-fold). The expression of this gene in plants of the three treatments (*Pc*, *N*, and *NPc*) was always greater than that observed in the control plants (Fig. 2).



**Fig. 2.** Relative transcript accumulation of *HMG2* and *EAS* genes in CM334 chilli plant roots resistant to *P. capsici*. *Pc*: inoculated with *P. capsici* alone; *N*: inoculated with *N. aberrans* alone; *NPc*: inoculated with *N. aberrans* and *P. capsici*. Relative expression was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Schmittgen and Livak, 2008). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene was used as internal reference to normalize expression, and control plants to calibrate expression levels of the gene of interest, which were expressed as fold-change due to treatment in relation to the basal level of transcripts in control plants (1x). Each bar represents the average of six technical replicates and the line in each bar the standard deviation. Bars with the same letter are not significantly different (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). The experiment was repeated once.

## DISCUSSION

The enzyme hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGR) catalyzes the first committed step of the mevalonate pathway for phytosterol and sesquiterpene biosynthesis; in plants is encoded by the *HMG* genes, a multigene family that in *C. annuum* L. includes *HMG1*, *HMG2*, and *HMG3* (Chappell, 1995; Ha *et al.*, 2003). These genes are differentially expressed during plant development and in response to pathogens or other stresses, for this particularity, HMGR is critical in the metabolic channeling of pathway intermediates towards specific end products, such as phytosterol and sesquiterpene metabolites, these last with antimicrobial properties (Stermer *et al.*, 1994; Chappell, 1995; Weissenborn *et al.*, 1995). In the present study, CM334 chilli plants inoculated only with the oomycete (*Pc* treatment) exhibited generally high levels of transcripts of *HMG2* and *EAS* (5-epiaristolochene synthase, *EAS*); this result was consistent with that documented in other *C. annuum*-*P. capsici* interactions (Zavala-Páramo *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2003; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). *EAS* is a sesquiterpene cyclase involved in capsidiol biosynthesis, a phytoalexin associated with the resistance to *P. capsici* in several genotypes of chilli, including CM334 (Egea *et al.*, 1996; Candela *et al.*, 2000). Fernández-Herrera *et al.* (2012) reported an early and intense expression of *EAS* gene in CM334 plants inoculated with the oomycete, and this response was associated with the accumulation of high levels of capsidiol. Also, Silvar *et al.*, (2008) found that in the resistant genotype CM331 inoculated with the oomycete, the expression of *SC* gene (sesquiterpene cyclase) was higher than that recorded in the susceptible cultivar Yolo Wonder.

Ha *et al.*, (2003) found that the increase in the expression of *HMG2* was related with a strong expression of *SC* gene (*i.e. EAS*) in *C. annuum* cv. NocKwang inoculated with *P. capsici*, the researchers suggest that the coordinated regulation of both genes, could be related with the accumulation of sesquiterpenic phytoalexins in response to the infection. A similar pattern was observed in the present study where the gene expression levels of *HMG2* and *EAS* were positively correlated ( $r=0.89$ ,  $p\leq 0.05$ ), thus, both genes displayed a similar trend through time. On the other hand, in plants inoculated with *P.*

*capsici* and infected by *N. aberrans* (*NPc* treatment), a lower accumulation of *HMG2* and *EAS* transcripts was evident at 6 haipc in contrast to the *Pc* treatment, whereas in plants infected by the nematode alone, the levels recorded were the lowest. This pattern was expected, since *N. aberrans* establishes a compatible interaction with chilli CM334. The differences between the treatments *Pc* and *NPc* in the expression of *EAS* gene at 12 haipc, suggest that the nematode could have induced a delay in the expression of both genes in plants inoculated with both pathogens. Fernández-Herrera *et al.*, (2012) report that in CM334 plants infected by the nematode and inoculated with the oomycete, the delay of the expression of *EAS* was associated with a reduction in capsidiol accumulation. The toxicity of capsidiol to this nematode was demonstrated by Godínez-Vidal *et al.*, (2010). Together, these data suggest that changes in gene-expression patterns of *EAS* and *HMG2*, can consequently result in a reduced accumulation of sesquiterpenic phytoalexins such as capsidiol, which in turn could promote the establishment and successful reproduction of both pathogens in chilli CM334. It is well-known, that this phytoalexin has toxic and lethal effects on the oomycete, condition that partly explains the resistance of CM334 to *P. capsici* (Egea *et al.*, 1996; Candela *et al.*, 2000).

Like *Meloidogyne*, *Heterodera*, and *Globodera* species, *N. aberrans* induces the formation of specialized feeding sites to obtain essential nutrients for its development and reproduction. Morphological changes in host root cells during the differentiation of these sites (giant cells or syncytia) are accompanied by dramatic alteration in gene-expression patterns, inducing profound modifications in normal metabolism (Davis *et al.*, 2000; Manzanilla-López *et al.*, 2002; Caillaud *et al.*, 2008). Down-regulation of genes involved in jasmonic acid/ethylene-dependent defense pathways, and also those involved in the synthesis of compounds with antimicrobial potential, has been reported in compatible plant-nematode interactions; in contrast, those related to the differentiation and maintenance of specialized feeding site, are up-regulated (Jammes *et al.*, 2005; Caillaud *et al.*, 2008). For instance, *Heterodera glycines* reduced the expression of *OPR1* and *OPR2* genes related to the jasmonic acid biosynthesis in a susceptible cultivar of *Glycine max* (Ithal *et al.*, 2007). In other compatible interactions, such as *A. thaliana-Meloidogyne incognita* the down-regulation of genes that encode for

pathogenesis-related proteins (PRs) and for WRKY transcription factors has been observed (Jammes *et al.*, 2005). As well in a susceptible tomato cultivar to *M. javanica*, the infection by the nematode was associated with a reduced expression of peroxidase genes (Bar-Or *et al.*, 2005).

The results obtained in the present study, suggest that *N. aberrans* reduced the expression of *HMG2* and *EAS* genes, and that such reduction was of greater magnitude when CM334 plants were infected only with the nematode in comparison to those inoculated with the two pathogens, *N. aberrans* and *P. capsici*. These changes could contribute to creating a favorable environment so that the nematode can complete its life cycle.

## REFERENCES

**Bar-Or, C., Kapulnik, Y., and Koltai H. 2005.** A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Eur. J. Plant Pathol.* 111: 181-192.

**Caillaud, M. C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., Engler, J. de A., Abad, P., Rosso, M.N., and Favery, B. 2008.** Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *J. Plant Physiol.* 165: 104-113.

**Candela, M. E., Egea, C., García-Pérez, M. D., Costa, J., and Candela, M. 2000.** Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Hort.* 522: 79-86.

**Chappell, J. 1995.** Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 521-547.

**Choi, D., Ward, B. L., and Bostock, R. M. 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.

**Choi, D., Bostock, R. M., Avdiushko, S., and Hildebrand, D. F. 1994.** Lipid-derived signals that discriminate wound and pathogen responsive isoprenoid pathways in plants: Methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 2329-2333.

**Davis, E. L., Hussey, R. S., Baum, T. J., Bakker, J., Schots, A., Rosso, M. N., and Abad, P. 2000.** Nematode Parasitism Genes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 365-396.

**Egea C., Alcazar, M. D., and Candela, M. E. 1996.** Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* 98: 737-742.

**Egea, E., Dickinson, M. J., Candela, M., and Candela, M. E. 1999.**  $\beta$ -1, 3-Glucanase isoenzymes and genes in resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* 107:312-318.

**Enjuto, M., Balcells, L., Campos, N., Caelles, C., Arro, M., and Boronat, A. 1994.** Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes, which encode microsomal forms of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:927-931.

**Enjuto, M., Lumbreras, V., Marin, C., and Boronat, A. 1995.** Expression of the Arabidopsis *HMG2* Gene, Encoding 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A reductase, is restricted to meristematic and floral tissues. *Plant Cell* 7: 517-527.

**Erwin, D. C., and Ribeiro, O. K. 1996.** *Phytophthora* diseases worldwide. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota. 562 p.

**Fernández-Herrera, E., Rojas-Martínez, R.I., Guevara-Olvera, L., Rivas-Dávila, M. E., Valadez-Moctezuma, E., y Zavaleta-Mejía, E. 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 interactions in the root rot *Phytophthora capsici* / *Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph. D. Thesis. New Mexico State University. 109 p.

**Glosier, B. R., Ogundiwin, E. A., Sidhu, G. S., Sischo, D. R., and Prince, J. P. 2008.** A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiologica races of P. capsici in pepper.* *Euphytica* 162: 23-30.

**Godínez-Vidal, D., Rocha-Sosa, M., Sepúlveda-García, E. B., Lara-Reyna, J., Rojas-Martínez, R. I., and Zavaleta-Mejía, E. 2008.** Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *Eur. J. Plant Pathol.* 120:299-303.

**Godínez-Vidal, D., Soto-Hernández, M., Rocha-Sosa, M., Lozoya-Gloria, E., Rojas-Martínez, R. I., Guevara-Olvera, L., y Zavaleta-Mejía, E. 2010.** Contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por *Nacobbus aberrans* y su efecto en juveniles del segundo estadio. *Nematropica* 40:227-237.

**Godínez-Vidal, D. Rocha-Sosa, M., Sepúlveda-García, E. B., Lozoya-Gloria, E., Rojas-Martínez, R., Guevara-Olvera, L., and Zavaleta-Mejia, E. 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. DOI: 10.1007/s11104-013-1743-8.

**Ha, S. H., Kim, J. B., Hwang, Y. S., and Lee, S. W. 2003.** Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced *Hmg2* from pepper (*Capsicum annuum*). Biochim. Biophys. Acta 1625:253–260.

**Ithal, N., Recknor, J., Nettleton, D., Maier, T., Baum, T. J., and Mitchum, M. G. 2007.** Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. Mol. Plant-Microbe Interact. 20: 510-525.

**Jammes, F., Lecomte, P., Engler, J. de A., Bitton, F., Martin-Magniette, M. L., Renou, J. P., Abad, P., and B. Favery. 2005.** Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. Plant J. 44: 447-458.

**López-Martínez, N., Colinas-León, M. T., Peña-Valdivia, C. B., Salinas-Moreno, Y., Fuentes-Montiel, P., Biesaga, M., and Zavaleta-Mejía, E. 2011.** Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM-334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. Plant Soil 338: 399-409.

**Manzanilla-López, R. H., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R.N., Lehman, P.S., Cid del Prado-Vera, I., Souza, R. M., and Evans, K. 2002.** The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, Distribution, Biology and management. Nematropica 32: 150-227.

**Redondo, E. J., y Rodríguez, R. M. 1987.** Mecanismos de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici*. Agrociencia 77: 123-137.

**Rushton, P. J., and Somssich, I. E. 1998.** Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. Curr. Opin. Plant Biol. 1: 311-315.

**SAS Institute Inc. 2002.** SAS Procedures Guide, Version 9.0 (Computer program). SAS Institute Inc., Cary, N.C.

**Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. 2008.** Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. Nat. Protoc. 3:1101-1108.

**Silvar, C., Merino, F., and Díaz, J. 2008.** Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. J. Plant Physiol. 165: 1120-1124.

**Stermer, B. A., Bianchini, G. M., and Korth, K. L. 1994.** Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. J. Lipid Res. 35: 1133-1140.

**Trujillo-Viramontes, F., Zavaleta-Mejía, E., Rojas-Martínez, R. I., y Lara, J. 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.

**Ueeda, M., Kubota, M., and Nishi, K. 2006.** Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67:149-154.

**Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R. I., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A. M., y Zavaleta-Mejía, E. 2009.** Respuesta hipersensitiva en el follaje de chile CM334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.

**Weissenborn, D. L., Denbow, C. J., Laine, M., Lang, S. S., Yang, Z., Yu, X., and Cramer, C. L. 1995.** HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins: Molecular specialization within a complex pathway. *Physiol. Plant.* 93: 393-400.

**Yang, Y., Shah, J., and Klessig, D. F. 1997.** Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621-1639.

**Zavaleta-Mejía, E. 2002.** Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparasitos, una hipótesis. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 118-122.

**Zavala-Páramo, G., Chávez-Moctezuma, M. P., García-Pineda, E., Yin, S., Chappell, J., and Lozoya-Gloria, E. 2000.** Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene synthase gene (*gPEAS1*) from chilli pepper (*Capsicum annuum*). *Physiol. Plant.* 110: 410-418.

## CAPÍTULO 4

### TRANSCRITOS DE GENES DE DEFENSA ACUMULADOS EN RAÍCES DE CHILE CM334 INOCULADAS CON *Nacobbus aberrans* O CON *Phytophthora capsici*

#### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue conocer la magnitud de las alteraciones transcripcionales de genes de defensa que *Nacobbus aberrans* induce a nivel local en raíces de chile CM334. En agallas de raíces infectadas por el nematodo (*Na*), se determinó, mediante qRT-PCR, la acumulación de transcritos de los genes *WRKY-a*, *WRKY1*, *POX* (peroxidasas), *PR-1* (proteína relacionada con patogénesis 1), y *EAS* (5-epiaristoloxeno sintasa); y se compararon con los registrados en la interacción incompatible CM334-*Phytophthora capsici* (*Pc*). Los niveles de *WRKY1*, *POX*, y *PR-1* fueron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) inferiores en plantas inoculadas con *N. aberrans* en contraste con los registrados en la interacción incompatible (CM334-*P. capsici*); mientras que los genes *WRKY-a* y *EAS* fueron reprimidos en presencia del nematodo en un rango de: -2.11 a -1.07, y -2.36 a -1.39 veces, respectivamente; en contraste, en la interacción incompatible (CM334-*P. capsici*), todos los genes fueron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) sobre-expresados. Lo anterior sugiere que las modificaciones inducidas por *N. aberrans* quizá pueden ser necesarias para garantizar la conclusión exitosa de su ciclo de vida en raíces de chile CM334; mientras que las inducidas por *P. capsici* restringirían el establecimiento del oomiceto.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum*, qRT-PCR, agallas, factores de transcripción, reprogramación génica.

## ABSTRACT

The objective of this study was to know the magnitude of transcriptional alterations of defense-related genes that *Nacobbus aberrans* locally induces in CM334 chili roots. In galls of nematode infected roots (*Na*), was determined by qRT-PCR, the transcripts accumulation of *WRKY-a*, *WRKY1*, *POX* (peroxidase), *PR-1* (pathogenesis-related protein 1), and *EAS* (5-epiaristolochene synthase); and they were compared with those recorded in the incompatible interaction CM334- *Phytophthora capsici* (*Pc*). The *WRKY1*, *POX*, and *PR-1* levels were significantly lower ( $P \leq 0.05$ ) in plants inoculated with *N. aberrans* in contrast with those recorded in the incompatible interaction (CM334-*P. capsici*), whereas the *WRKY-a* and *EAS* genes were repressed in presence of nematode in a range from -2.11 to -1.07, and -2.36 to -1.39-fold, respectively; in contrast, in the incompatible interaction (CM334-*P. capsici*), all genes were significantly overexpressed ( $P \leq 0.05$ ). This suggests that the alterations induced by *N. aberrans* could be necessary to ensure the successful completion of its life cycle in CM334 chili roots, while those induced by *P. capsici* would restrict the establishment of the oomycete.

**Keywords:** *Capsicum annuum*, qRT-PCR, galls, transcription factors, gene reprogramming.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas poseen mecanismos de defensa con los que responden a la infección por patógenos, que generalmente implican la activación transcripcional de varios genes de defensa que subsecuentemente conduce a la síntesis *de novo* de diversas proteínas y compuestos antimicrobianos (Yang *et al.*, 1997; Rushton y Somssich, 1998). La expresión de estos genes de defensa usualmente está regulada por factores de transcripción, que además regulan la expresión génica en otros procesos fisiológicos como los de desarrollo (Zhang, 2003; Eulgem, 2005). En plantas superiores, los factores WRKY constituyen una de las familias de proteínas más extensa de reguladores transcripcionales con funciones clave frente al estrés biótico causado por el ataque por hongos, bacterias y nematodos (Rushton *et al.*, 2010). Tales proteínas son codificadas por una familia multigénica, así por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., se reporta la existencia de 74 isogenes WRKY (Rushton *et al.*, 2010), 81 en *Solanum lycopersicum* L. (Huang *et al.*, 2012), mientras que para *Capsicum annuum* L., se han reportado a los isogenes WRKY-a, WRKY1, WRKYb, WRKYd, WRKY58, WRKY40, WRKY30, y WRKY2 (Park *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2011; Jingyuan *et al.*, 2011; Huh *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Dang *et al.*, 2013) que actúan como reguladores positivos o negativos, activando o reprimiendo genes, en interacciones de las plantas con su ambiente.

La línea de chile CM334 es altamente resistente al oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian y a las tres principales especies de nematodos agalladores [*Meloidogyne incognita* (Kofoid y White, 1919) Chitwood, 1949; *M. arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949; y *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 (Pegard *et al.*, 2005; Glossier *et al.*, 2008), pero susceptible al nematodo “falso nodulador” *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944 (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). La resistencia al oomiceto y a las especies mencionadas de *Meloidogyne*, se expresa como una respuesta hipersensitiva (Fernández-Pavia, 1997; Pegard *et al.*, 2005). Entre las defensas que se disparan en genotipos de chile resistentes a *P. capsici*, están los incrementos en la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) como: PR-1 (Fernández-Herrera *et al.*, 2012); GLU (Silvar *et al.*, 2008) que codifica para  $\beta$ -1, 3-glucanasas (Egea *et*

*al.*, 1999; Fernández-Herrera *et al.*, 2012); *POX* (Silvar *et al.*, 2008), que promueve una mayor actividad de peroxidasas (Fernández-Pavia, 1997; Fernández-Herrera *et al.*, 2012); y sobre-expresiones de otros genes de defensa como el *OPR-3* que codifica para la 12-oxofitodienoato reductasa, asociada con la biosíntesis de ácido jasmónico (Ueeda *et al.*, 2006); y los genes *HMG2*, *SC*, y *EAS*, que codifican para la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoenzimaA reductasa, sesquiterpeno ciclasa, y 5-epi-aristolóqueno sintasa, respectivamente, implicadas en la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas como el capsidiol (Zavala-Páramo *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2003; Silvar *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Por otro lado, la resistencia de ciertos genotipos de Chile a *M. incognita* se ha asociado con incrementos en la expresión de los genes *WRKY30*, *WRKY2* y *WRKY-a*, y a una marcada acumulación de ácido clorogénico (Pegard *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Jingyuan *et al.*, 2011). En contraste con lo anterior, en la interacción compatible CM334-*N. aberrans*, la expresión de los genes *PR-1*, *POX*, *GLU*, y *EAS* analizada en raíces completas, fue reducida considerablemente a 21 días posteriores a la inoculación con el nematodo (Fernández-Herrera *et al.*, 2012); tales alteraciones podrían favorecer el establecimiento y reproducción exitosa de *N. aberrans* en este genotipo.

Mediante la inducción de sitios especializados de alimentación (células gigantes o sincitios) los nematodos agalladores como *Meloidogyne* spp y *N. aberrans*, y los que se enquistan como *Globodera* spp y *Heterodera* spp, establecen una interacción íntima y sofisticada con sus hospedantes susceptibles para la conclusión exitosa de su ciclo de vida. La formación de los sitios especializados implica sobre-expresión de genes cuyos productos les favorecen y la represión de aquellos cuyos productos restringen su establecimiento y reproducción (Sijmons *et al.*, 1994; Abad *et al.*, 2003; Caillaud *et al.*, 2008). Así, por ejemplo, en raíces de soya (*Glycine max*, cv. Williams 82) inoculadas con una raza compatible de *Heterodera glycines*, la expresión de genes implicados en la biosíntesis del ácido jasmónico (*OPR1* y *OPR2*) fue localmente reprimida; el ácido jasmónico es una molécula de señalización involucrada en respuestas de defensa frente a estrés biótico o abiótico (Ithal *et al.*, 2007). Similarmente, en agallas de *A. thaliana* inducidas por *M. incognita*, se reprimió la expresión de varios genes relacionados con defensa como *PR-4* (proteína relacionada con patogénesis-4), *PAD4* (proteína tipo lipasa,

implicada en señalización del ácido salicílico), y 17 genes *WRKY*; así el establecimiento exitoso del nematodo se asoció con una supresión efectiva de los mecanismos de defensa (Jammes *et al.*, 2005).

Hasta ahora, se han descrito algunas de las alteraciones transcripcionales que *N. aberrans* induce a nivel de sistema radical completo en la interacción CM334-*N. aberrans*, pero se desconoce la magnitud de estas alteraciones a nivel local, esto es, en las agallas inducidas por el nematodo. Por lo anterior en el presente estudio se determinaron los niveles de expresión de los genes de defensa *WRKY-a*, *WRKY1*, *POX*, *PR-1*, y *EAS* en agallas inducidas por este nematodo; además dichos niveles se compararon con los registrados en la interacción incompatible CM334-*P. capsici*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Establecimiento del experimento**

Se estableció un experimento en el que se evaluaron los siguientes tratamientos: 1) plantas CM334 inoculadas solo con *N. aberrans* (Na), 2) plantas CM334 sin nematodo (Control), 3) plantas CM334 inoculadas solo con *P. capsici* (Pc), y 4) plantas CM334 sin oomiceto (Control). Para los tratamientos 1 y 2 se establecieron 20 plantas y para el 3 y 4 fueron 15 plantas. La inclusión de un mayor número de plantas en los tratamientos 1 y 2, fue con el fin de disponer de mayor cantidad de tejido radical agallado. Con la finalidad de que las plantas de todos los tratamientos estuvieran en la misma etapa fenológica al momento de realizar las evaluaciones de la expresión de genes, las inoculaciones con los patógenos se realizaron en tiempos diferentes; las del nematodo al momento de establecer el ensayo y la del oomiceto a los 49 días de haber realizado la inoculación con el nematodo y 24 h antes de obtener el tejido radical de las plantas de cada tratamiento para la comparación de la expresión génica.

Semillas de chile “tipo serrano” CM-334 resistente a *P. capsici* se germinaron bajo condiciones asépticas y una vez germinadas se trasplantaron individualmente en macetas conteniendo 25 cm<sup>3</sup> de arena estéril. Las macetas se mantuvieron en cámaras de crecimiento a temperatura de 28±1°C, con un fotoperiodo de 14 horas luz y 10 de

obscuridad. Las fertilizaciones se realizaron semanalmente aplicando una solución nutritiva [(630 g de Nitrofoska 12-12-12 en 20 L de agua estéril; dilución 1:10 (Nitrofoska:agua)]. El ensayo se estableció cuando las plantas presentaron de cuatro a cinco hojas verdaderas.

El inóculo de *N. aberrans* se obtuvo a partir de raíces de jitomate agalladas, procedentes de suelos naturalmente infestados del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. La extracción de huevecillos se realizó siguiendo la metodología descrita por Vrain (1977) y la obtención de juveniles del segundo estadio (J<sub>2</sub>) se efectuó según Villar-Luna *et al.*, (2009). El nematodo se inoculó en el momento en que se estableció el experimento, esto es cuando las plantas presentaron de cuatro a cinco hojas verdaderas, aplicando en el substrato una suspensión de 3000 J<sub>2</sub> de *N. aberrans* por planta.

La producción de inóculo de *P. capsici* se realizó según Villar-Luna *et al.*, (2009), el oomiceto se inoculó a los 49 días de haber realizado la inoculación con el nematodo y 24 h antes de que se llevara a cabo el muestreo de las agallas y raíces en las plantas de los tratamientos 1 y 2, respectivamente. Se inocularon 500 000 zoosporas alrededor de la raíz de cada planta. Como referencia de la patogenicidad de *P. capsici* y de la eficacia de la inoculación, se incluyeron plantas de chile cv. Yolo Wonder susceptibles al oomiceto.

A los 50 días posteriores a la inoculación con *N. aberrans* (dpin) en las 20 plantas del tratamiento 1 se separaron las agallas de las raíces y en las del tratamiento 2 sin nematodo, se separaron secciones de raíces. En los tratamientos 3 y 4 de las 15 plantas de cada tratamiento se obtuvieron las raíces a las 24 horas posteriores a la inoculación con el oomiceto (hpio). Las muestras de tejido agallado y de raíces fueron inmediatamente congeladas con N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80° C. El experimento se repitió una vez.

### **Extracción de RNA total, síntesis de cDNA, y PCR en tiempo real**

La extracción de RNA total se realizó a partir de tejido congelado (agallas, secciones de raíces, o raíces completas de CM334) utilizando el RNeasy® Plant mini kit (Qiagen) e incluyendo una digestión con DNasa, de acuerdo con las instrucciones del

fabricante (Qiagen). La pureza e integridad del RNA fue verificada por espectrofotometría (ND-1000, Nanodrop Technologies) y por electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante a 1.2%, respectivamente. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 2 µg de RNA total utilizando oligo dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen) y la enzima M-MLV reverse transcriptase (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La acumulación de transcritos fue determinada mediante PCR cuantitativa en un sistema ABI7500 (Applied Biosystems), la mezcla de reacción (volumen final de 25 µL) consistió de agua libre de nucleasas, buffer 10X, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µM de cada oligonucleótido, 0.2 mM de dNTPs, amplificasa (Biotecmol), SYBR Green I (1:75000) (Molecular Probes, Eugene, OR) como fluoróforo, 10 nM de fluorosceína como referencia pasiva, y 2 µL 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 3 min, seguido de 35 ciclos a 95° C por 15 s, alineamiento por 35 s, y extensión a 72° C por 35 s. La temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos del gen *WRKY-a* fue de 55°C, mientras que para el resto de los oligonucleótidos fue de 60°C. Los datos fueron colectados durante el paso de extensión. Adicionalmente se incluyó una curva de disociación para descartar la formación de productos inespecíficos. Los productos de PCR se purificaron con el QIAquick™ PCR purification Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenciaron para confirmar su identidad. 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 Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) para normalizar la expresión del gen de interés, y las plantas “control” para calibrar los niveles de expresión; así, en relación al nivel basal de transcritos en las plantas “control” (1x), los niveles del gen de interés se expresaron en “veces” en respuesta al tratamiento, y 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 version 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

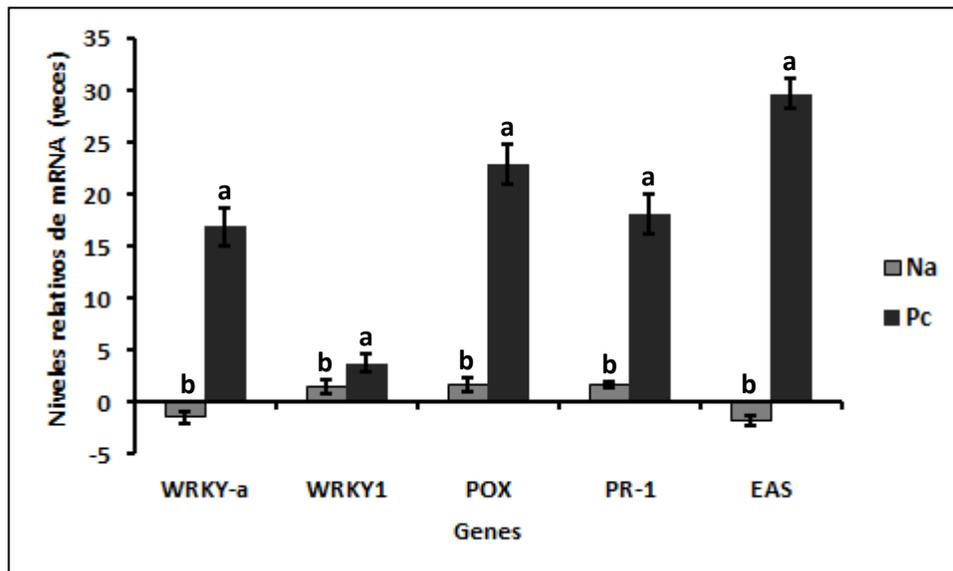
Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.

Proteína	Gen	Número de acceso <sup>†</sup>	‡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	
WRKY1	<i>WRKY1</i>	EF468464	‡Fw	CAGCAGCAAGAGGAAAGAAGT	335
			Rv	GGCAGTAGAACCCTGATTTAGC	
POX	<i>POX</i>	AF442386	‡Fw	CCAGTACGTGCCCAAGAGCTG	560
			Rv	GGATGCGTCGATTGAAGGGTC	
PR-1	<i>PR-1</i>	AF053343	‡Fw	GTTGTGCTAGGGTTCGGTG	301
			Rv	CAAGCAATTATTAAACGATCCA	

<sup>†</sup>NCBI (National Center for Biotechnology Information); GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; EAS: 5-epiaristoloueno sintasa. POX: peroxidasa. PR-1: proteína relacionada con patogénesis 1. ‡Diseñados por nuestro grupo de trabajo. <sup>‡</sup>Gayoso *et al.*, (2007).

## RESULTADOS

La sobre-expresión de los genes *WRKY1*, *POX*, y *PR-1* fue significativamente ( $P \leq 0.05$ ) menor en las plantas inoculadas con *N. aberrans* (*Na*, interacción compatible) en comparación con la interacción incompatible (*Pc*, CM334-*P. capsici*); en cambio los genes *WRKY-a* y *EAS* fueron reprimidos en presencia del nematodo. Los niveles de expresión de los genes *WRKY1*, *POX*, y *PR-1* en las plantas con nematodo estuvieron en un rango de: 1.02-2.31, 1.11-2.49, y 1.27-1.72 veces, respectivamente; y los de los genes *WRKY-a* y *EAS* fueron reducidos en un rango de: -2.11 a -1.07, y -2.36 a -1.39 veces, respectivamente. En contraste, en la interacción incompatible (*Pc*, CM334-*P. capsici*), todos los genes fueron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) sobre-expresados en un rango de: *WRKY-a* (15.35-18.89), *WRKY1* (3.09-4.76), *POX* (20.82-24.76), *PR-1* (16.34-20.11), y *EAS* (28.25-31.12 veces) (Figura 1).



**Fig. 1.** Acumulación de transcritos de los genes *WRKY-a*, *WRKY1*, *POX*, *PR-1*, y *EAS* en raíces de plantas de chile CM334 resistentes a *Phytophthora capsici*. *Na*: inoculadas solo con *Nacobbus aberrans* (interacción compatible); *Pc*: inoculadas sólo con *P. capsici* (interacción incompatible). Con la finalidad de que las plantas de todos los tratamientos estuvieran en la misma etapa fenológica al momento de realizar las evaluaciones de la expresión de genes, las inoculaciones con los patógenos se realizaron en tiempos diferentes; las del nematodo al momento de establecer el ensayo y las del oomiceto a los 49 días de haber realizado la inoculación con el nematodo y 24 h antes de obtener el tejido radical de las plantas de cada tratamiento para la comparación de la expresión génica. En plantas inoculadas con el nematodo los niveles de transcritos se evaluaron en las agallas de la raíz y en las inoculadas con el oomiceto se consideró la totalidad del sistema radical. Cada barra representa el promedio de tres réplicas y la línea en cada barra la desviación estándar. Los niveles de expresión se expresaron como cambios en veces en respuesta al tratamiento con relación al nivel basal registrado en las plantas testigo (1x) y se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Schmittgen y Livak, 2008), utilizando como referencia interna el gen que codifica para Glicer aldehído 3-fosfato 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.

## DISCUSIÓN

Los factores de transcripción WRKY, exclusivos de plantas, son codificados por una familia multigénica, y la mayoría de ellos se sobre-expresan en respuesta a estrés biótico (Eulgem y Somssich, 2007). Park *et al.* (2006) reportaron que en plantas *Capsicum annuum* el gen *WRKY-a* se sobre-expresó durante la respuesta hipersensitiva a *Tobacco mosaic virus* (TMV) y a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y sugirieron su implicación en la activación de mecanismos de defensa contra patógenos. En el presente trabajo, la sobre-expresión del gen *WRKY-a* en raíces de chile CM334 inoculadas con *P. capsici* (*Pc*, interacción incompatible) fue muy superior a la registrada en plantas infectadas por *N. aberrans* (*Na*, interacción compatible). La sobre-expresión de *WRKY-a* y de *WRKY2* fue reportada en la interacción incompatible *C. annuum* (cv. HDA149)-*Meloidogyne incognita* (Li *et al.*, 2008).

En el presente estudio, el gen *WRKY1* se sobre-expresó tanto en la interacción compatible (CM334-*N. aberrans*) como en la incompatible (CM334-*P. capsici*); sin embargo, la expresión fue menor en la interacción compatible en comparación con la incompatible. La activación diferencial de este gen por patógenos ha sido documentada, por ejemplo, Oh *et al.*, (2008) encontraron que en la interacción incompatible *C. annuum* (cv. ECW-20R)-*Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (*Xcv*) la expresión fue más temprana e intensa en comparación con la compatible [*C. annuum* (cv. ECW)- *Xcv*]; en estas interacciones también se sobre-expresó el gen *PR-1* con una tendencia similar en ambas interacciones, pero con mayor intensidad que *WRKY1*.

En la interacción compatible (CM334-*N. aberrans*) la expresión de *PR-1* y *POX* fue de menor magnitud en comparación con la interacción incompatible (CM334-*P. capsici*). Con anterioridad Fernández-Herrera *et al.* (2012) consignaron este mismo comportamiento en el sistema radical completo en interacciones CM334-*P. capsici* y CM334-*N. aberrans* para los genes *PR-1*, *POX*, y *GLU* ( $\beta$ -1, 3-glucanasa). También Silvar *et al.* (2008) indican que en la interacción incompatible chile CM331-*P. capsici*, se sobre-expresaron los genes que codifican para peroxidasa,  $\beta$ -1, 3-glucanasa, y la isoforma básica *PR-1*. Se menciona que la sobre-expresión de *PR-1* podría estar implicada en el

reforzamiento de paredes celulares de la planta hospedante en respuesta al ataque por patógenos (Vidhyasekaran, 2008). Con base en esto, quizá la fuerte sobre-expresión registrada en la interacción incompatible CM334-*P. capsici* podría contribuir con el confinamiento del oomiceto durante la reacción de hipersensibilidad en la raíz de CM334 (Fernández-Pavía, 1997). La sobre-expresión de *PR-1* registrada en agallas inducidas por *N. aberrans* pudiera estar asociada con las profundas modificaciones y reorganización de las paredes de las células que se constituyen en el sitio especializado de alimentación (sincitio). Por otra parte, las peroxidasas parecen contribuir al fortalecimiento de paredes celulares mediante la deposición de lignina y suberina constituyendo barreras físicas que pueden restringir el avance y establecimiento del patógeno (Van Loon, 1997); además, promueven la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la reacción de hipersensibilidad (Do *et al.*, 2003); por tanto la fuerte sobre-expresión del gen *POX* en la interacción incompatible CM334-*P. capsici*, quizás contribuye a la restricción del avance del patógeno mediante la lignificación y la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En contraste, los bajos niveles de expresión de *POX* registrados en la interacción compatible CM334-*N. aberrans*, podrían ser favorables al contribuir a la reestructuración de la pared celular del sincitio, necesario para el desarrollo y reproducción del nematodo. En agallas de raíces de plantas *Solanum lycopersicum* infectadas por *M. javanica*, la expresión de genes que codifican para PRs como peroxidasas fue reducida (Bar-Or *et al.*, 2005), mientras que dos isogenes *WRKY* fueron sobre-expresados; los autores sugieren que proteínas *WRKY* regularon negativamente a los genes que codifican PRs. Por otro lado, el análisis transcriptómico global de la interacción compatible *A. thaliana*-*M. incognita*-, indicó que el 70% de los genes alterados correspondían a genes asociados con las rutas dependientes del ácido jasmónico y etileno, y con factores de transcripción *WRKY* (asociados con mecanismos de defensa), todos ellos fueron reprimidos en agallas (Jammes *et al.*, 2005; Caillaud *et al.*, 2008).

La expresión del gen *EAS* fue considerablemente reducida en agallas inducidas por *N. aberrans*; *EAS*, codifica para la sesquiterpeno ciclasa (SC) 5-epiaristológeno sintasa, implicada en la biosíntesis de la fitoalexina sesquiterpenica capsidiol, frecuentemente asociada con la resistencia de genotipos de Chile a *P. capsici* (Egea *et al.*,

1996; Candela *et al.*, 2000) y posiblemente también a nematodos (Godínez-Vidal *et al.*, 2010). En contraste, en la interacción incompatible CM334-*P. capsici* se registró una fuerte sobre-expresión de dicho gen. Estos resultados son similares a los reportados previamente en raíces completas de CM334 infectadas por *P. capsici* o *N. aberrans* (Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Adicionalmente, se tiene evidencia de que el capsidiol es tóxico a juveniles del segundo estadio de *N. aberrans* (Godínez-Vidal *et al.*, 2010). A excepción del gen *EAS*, los niveles de expresión de los genes *PR-1*, y *POX* registrados en agallas, no fueron notablemente diferentes con respecto a los resultados obtenidos en raíz completa por Fernández-Herrera *et al.*, (2012).

Está documentado que varias proteínas WRKY actúan como reguladores positivos o negativos de genes de defensa (activación o represión transcripcional, respectivamente), para ello se unen a una secuencia consenso de la región promotora del gen blanco para regular su expresión, la secuencia consenso reconocida por los factores WRKY es conocida como caja W [(T)GACC/T] (Eulgem, 2005). La caja W es común en genes de defensa incluyendo los que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) (Eulgem *et al.*, 2000); el gen *EAS* implicado en la biosíntesis del capsidiol también presenta esta secuencia consenso en su región promotora (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008). La regulación negativa de mecanismos de defensa por el gen *WRKY1* fue demostrada por Oh *et al.*, (2008), donde el silenciamiento de este gen en plantas transgénicas de *C. annuum* (cv. Bukang) promovió los mecanismos de defensa frente a *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (naturalmente compatible), y los síntomas de la enfermedad fueron considerablemente reducidos en contraste con las plantas no transformadas. De igual manera, en plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc) sobre-expresando el gen *WRKY1*, se detectaron niveles reducidos de resistencia basal a *Tobacco mosaic virus* y las plantas transgénicas fueron incapaces de restringir el avance de la infección en comparación con las plantas control; en la mayoría de estas líneas transgénicas de tabaco, el tratamiento previo con ácido salicílico, condujo a una expresión reducida de genes de defensa que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (*PR1*, *PR2*, *PR4* y *PR5*), en comparación con las plantas no tratadas (Oh *et al.*, 2008). Todas estas evidencias sugieren que la proteína WRKY1 estaría actuando

como un regulador negativo de mecanismos de defensa. La reducida expresión del gen *WRK1* que se observó en la presente investigación quizá favoreció la sobre-expresión de los genes de defensa *WRKY-a*, *PR-1*, *POX*, y *EAS* en la interacción incompatible (tratamiento *Pc*); por otra parte, la tendencia similar de represión y sobre-expresión (tratamientos *Na* y *Pc*, respectivamente) exhibida por el gen *EAS* con respecto al gen *WRKY-a*, sugieren una posible regulación por proteínas *WRKY-a*.

En el presente estudio, la expresión de los genes de defensa *WRKY-a*, *WRK1*, *PR-1*, *POX*, y *EAS* fue significativamente reducida en la interacción compatible chile *CM334-N. aberrans*; mientras que en la incompatible *CM334-P. capsici* se registraron los máximos niveles de transcritos. Las alteraciones transcripcionales inducidas por *N. aberrans* pueden ser necesarias para garantizar la conclusión exitosa de su ciclo de vida en raíces de chile *CM334*; mientras que las inducidas por *P. capsici* restringirían el establecimiento del oomiceto.

## LITERATURA CITADA

**Abad, P., Favery, B., Rosso, M. N., and Castagnone-Sereno, P. 2003.** Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Mol. Plant Pathol.* 4: 217-224.

**Bar-Or, C., Kapulnik, Y., and Koltai H. 2005.** A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Eur. J. Plant Pathol.* 111: 181-192.

**Caillaud, M. C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., Engler, J. de A., Abad, P., Rosso, M. N., and Favery, B. 2008.** Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *J. Plant Physiol.* 165:104-113.

**Candela, M. E., Egea, C., García-Pérez, M. D., Costa, J., and Candela, M. 2000.** Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Hort.* 522: 79-86.

**Dang, F. F., Wang, Y. N., Yu, L., Eulgem, T., Lai, Y., Liu, Z. Q., Wang, X., Qiu, A. L., Zhang, T. X., Lin, J., Chen, Y. S., Guan, D. Y., Cai, H. Y., Mou, S. L., and He, S. L. 2013.** CaWRKY40, a WRKY protein of pepper, plays an important role in the regulation of tolerance to heat stress and resistance to *Ralstonia solanacearum* infection. *Plant Cell Environ.* 36: 757-774

**Do, H. M., Hong, J. K., Jung, H. W., Kim, S. H., Ham, J. H., and Hwang, B. K. 2003.** Expression of peroxidase-like genes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 196-205.

**Egea C., Alcazar, M. D., and Candela, M. E. 1996.** Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* 98: 737-742.

**Egea, E., Dickinson, M. J., Candela, M., and Candela, M. E. 1999.**  $\beta$ -1, 3-Glucanase isoenzymes and genes in resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Physiol. Plant.* 107:312-318.

**Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., and Somssich, I. E. 2000.** The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5: 199-206.

**Eulgem, T., and Somssich, I. E. 2007.** Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 366-371.

**Eulgem, T. 2005.** Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci.* 10:71-78.

**Fernández-Pavia, S. 1997.** Host-Pathogen interactions in the root rot *Phytophthora capsici* / *Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph. D. Thesis. New Mexico State University. 109 p.

**Fernández-Herrera, E., Rojas-Martínez, R.I., Guevara-Olvera, L., Rivas-Dávila, M. E., Valadez-Moctezuma, E., y Zavaleta-Mejía, E. 2012.** Defensa en chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici* e infectado por *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 42:96-107.

**Gayoso, C., de Ilárduya, O. M., Pomar, F., and de Cáceres, F. M. 2007.** Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* 118: 199-209.

**Glosier, B. R., Ogundiwin, E.A., Sidhu, G. S., Sischo, D. R., and Prince, J. P. 2008.** A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiologica races of P. capsici in pepper.* *Euphytica* 162: 23-30.

**Godinez-Vidal, D., Soto-Hernández, M., Rocha-Sosa, M., Lozoya-Gloria, E., Rojas-Martínez, R. I., Guevara-Olvera, L., y Zavaleta-Mejía, E. 2010.** Contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por *Nacobbus aberrans* y su efecto en juveniles del segundo estadio. *Nematropica* 40:227-237.

**Ha, S. H., Kim, J. B., Hwang, Y. S., and Lee, S. W. 2003.** Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced *Hmg2* from pepper (*Capsicum annuum*). *Biochim. Biophys. Acta* 1625:253–260.

**Huang, S., Gao, Y., Liu, J., Peng, X., Niu, X., Fei, Z., Cao, S., and Liu, Y. 2012.** Genome-wide analysis of WRKY transcription factors in *Solanum lycopersicum*. *Mol. Genet. Genomics* 287: 495-513.

**Huh, S. U., Choi, L. M., Lee, G. J., Kim, Y. J., and Paek, K. H. 2012.** *Capsicum annuum* WRKY transcription factor d (CaWRKYd) regulates hypersensitive response and defense response upon *Tobacco mosaic virus* infection. *Plant Sci.* 197:50-58.

**Ithal, N., Recknor, J., Nettleton, D., Maier, T., Baum, T. J., and Mitchum, M. G. 2007.** Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 510-525.

**Jammes, F., Lecomte, P., de Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M. L., Renou, J. P., Abad, P., and Favery, B. 2005.** Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in Arabidopsis. *Plant J.* 44:447-458.

**Jingyuan, Z., Xuexiao, Z., Zhenchuan, M., and Bingyan, X. 2011.** A novel pepper (*Capsicum annuum* L.) WRKY gene, *CaWRKY30*, is involved in pathogen stress responses. *J. Plant Biol.* 54: 329-337.

**Li, S. M., Mao, Z. C., Li, L., Feng, D. X., Yang, Y. H., and Xie, B. Y. 2008.** Isolation of WRKY genes in the incompatible interaction between *Meloidogyne incognita* and *Capsicum annuum*. *Acta Hortic. Sin.* 10:1467-1472.

**Lim, J. H., Park, C. J., Huh, S. U., Choi, L. M., Lee, G. J., Kim, Y. J., and Paek, K. H. 2011.** *Capsicum annuum* WRKYb transcription factor that binds to the *CaPR-10* promoter functions as a positive regulator in innate immunity upon TMV infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411: 613-619.

**Maldonado-Bonilla, L. D., Betancourt-Jiménez, M., and Lozoya-Gloria, E. 2008.** Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *Eur. J. Plant Pathol.* 121:439-449.

**Oh, S., Yi, S. Y., Yu, S. H., Moon, J. S., Park, J. M., and Choi, D. 2006.** CaWRKY2, a chili pepper transcription factor, is rapidly induced by incompatible plant pathogens. *Mol. Cells* 22: 58-64.

**Oh, S. K., Baek, K. H., Park, J. M., Yi, S. Y., Yu, S. H., Kamoun, S., and Choi, D. 2008.** *Capsicum annuum* WRKY protein CaWRKY1 is a negative regulator of pathogen defense. *New Phytologist* 177: 977-989.

**Park, C. J., Shin, Y. C., Lee, B. J., Kim, K. J., Kim, J. K., and Paek, K. H. 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.

**Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P., and Djian-Caporalino, C. 2005.** Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95: 158-165.

**Rushton, P. J., and Somssich, I. E. 1998.** Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 311-315.

**Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P., and Shen, Q. J. 2010.** WRKY transcription factors. *Trends Plant Sci.* 15: 247-258.

**SAS Institute Inc. 2002.** SAS Procedures Guide, Version 9.0 (Computer program). SAS Institute Inc., Cary, N.C.

**Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. 2008.** Analyzing real-time PCR data by the comparative  $C_T$  method. *Nat. Protoc.* 3:1101-1108.

**Sijmons, P. C., Atkinson, H. J., and Wyss, U. 1994.** Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:235-259.

**Silvar, C., Merino, F., y Díaz, J. 2008.** Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *J. Plant Physiol.* 165:1120-1124.

**Trujillo-Viramontes, F., Zavaleta-Mejía, E., Rojas-Martínez, R. I., y Lara, J. 2005.** Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile. *Nematropica* 35:37-44.

**Ueda, M., Kubota, M., and Nishi, K. 2006.** Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67:149-154.

**Van Loon, L. C. 1997.** Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.* 103: 753-765.

**Vidhyasekaran, P. 2008.** Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms. CRC Press. Boca Raton, FL. 509 p.

**Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R. I., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A. M., y Zavaleta-Mejía, E. 2009.** Respuesta hipersensitiva en el follaje de chile CM.334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *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. *J. Nematol.* 9: 249-251.

**Wang, Y., Dang, F., Liu, Z., Wang, X., Eulgem, T., Lai, Y., Yu, L., She, J., Shi, Y., Lin, J., Chen, C., Guan, D., Qiu, A., and He, S. 2013.** *CaWRKY58*, encoding a group I WRKY transcription factor of *Capsicum annuum*, negatively regulates resistance to *Ralstonia solanacearum* infection. *Mol. Plant Pathol.* 14: 131-144.

**Yang, Y., Shah, J., and Klessig, D. F. 1997.** Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11: 1621-1639.

**Zhang, J. Z. 2003.** Overexpression analysis of plant transcription factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 430-440.

**Zavala-Páramo, G., Chávez-Moctezuma, M. P., García-Pineda, E., Yin, S., Chappell, J., and Lozoya-Gloria, E. 2000.** Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi-aristolochene synthase gene (*gPEAS1*) from chilli pepper (*Capsicum annuum*). *Physiol. Plant.* 110: 410-418.