



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE LOS GENES *C4H* Y *COMT*, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE C4H, FENOLES SOLUBLES TOTALES, LIGNINA TOTAL Y DETERMINACION DE MONOLIGNOLES EN CHILE CM334 INFECTADO POR *Nacobbus aberrans* Y *Meloidogyne incognita*

ERIKA LAGUNES FORTIZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO


2016


La presente tesis, titulada: **ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE LOS GENES C4H Y COMT, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE C4H, FENOLES SOLUBLES TOTALES, LIGNINA TOTAL Y DETERMINACION DE MONOLIGNOLES EN CHILE CM334 INFECTADO POR *Nacobbus aberrans* Y *Meloidogyne incognita***, realizada por la alumna: **Erika Lagunes Fortiz**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:


**DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGIA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA: 
DRA. EMMA ZAVALETA MEJÍA

ASESORA: 
DRA. REYNA I. ROJAS MARTÍNEZ

ASESORA: 
DRA. JUANA JUÁREZ MUÑOZ

ASESOR: 
DR. BENITO REYES TREJO

ASESOR: 
DR. LUIS ALFONSO SÁENZ CARBONELL.

Montecillo, Texcoco, Estado de México, a Enero de 2016.

ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE LOS GENES *C4H* Y *COMT*, ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE C4H, FENOLES SOLUBLES TOTALES, LIGNINA TOTAL Y DETERMINACION DE MONOLIGNOLES EN CHILE CM334 INFECTADO POR *Nacobbus aberrans* Y *Meloidogyne incognita*

Erika Lagunes Fortiz, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2016.

RESUMEN

La resistencia del chile serrano CM334 a nematodos agalladores se asocia en parte con la estimulación de la ruta de los fenolpropanoides, a través de la cual se sintetizan fenoles, fitoalexinas, proanticiniadinas y los monolignoles *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) y siringil (S) que forman a la lignina. El tipo y abundancia de cada monolignol determinan las características de la lignina, la cual actúa como barrera física potencial contra el ataque de fitopatógenos; además en el caso de nematodos endoparásitos sedentarios su biosíntesis, composición y deposición en las paredes celulares pueden ser determinantes para la formación del sitio especializado de alimentación (células gigantes y sincitios). Los objetivos de la presente investigación fueron: comparar la acumulación de los transcritos de los genes *C4H* y *COMT* implicados en la síntesis de lignina, determinar la actividad de la enzima C4H y el contenido de fenoles solubles totales, de lignina total y de los monómeros H, G y S en raíces chile CM334- inoculadas con *N. aberrans* (interacción compatible) o con *M. incognita* (interacción incompatible). La acumulación relativa de los transcritos *C4H* a los 7 y 14 ddi fue mayor en la interacción compatible en comparación con la incompatible, pero a los 2 y 21 ddi ocurrió lo opuesto; la de los transcritos *COMT* también fue mayor en la interacción compatible en todos los tiempos evaluados y la actividad de la enzima C4H también lo fue, excepto a los 21 ddi. El mayor contenido de fenoles solubles totales a los 2 ddi se registró en la interacción compatible, pero a los 7, 14 y 21 ddi el patrón se invirtió, en cambio el de lignina y de los monómeros G y S siempre fue mayor en la interacción compatible, mientras que el monolignol H fue mayor hasta los 14 ddi, pero no a los 21 ddi. Los resultados obtenidos indicaron que el patrón de expresión de los genes *C4H* y *COMT*, la actividad de la enzima C4H y el contenido de fenoles y lignina fueron diferentes dependiendo del tipo de interacción planta-nematodo.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, lignina, guaiacil, siringil, defensa, nematodos agalladores.

TRANSCRIPTS ACUMULATION OF *C4H* AND *COMT* GENES, ENZYMATIC ACTIVITY, TOTAL SOLUBLE PHENOLIC, TOTAL LIGNIN AND MONOLIGNOL DETERMINATION IN CHILLI CM334 FINFECTED BY *Nacobbus aberrans* AND *Meloidogyne incognita*

Erika Lagunes Fortiz, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2016.

ABSTRACT

The Chilli pepper CM334 resistance to root-knot nematodes is partly associated with the stimulation of the phenylpropanoid pathway through which phenols, phytoalexins, proanticiadininas and the monolignols *p*-hydroxyphenyl (H), guaiacil (G) and syringyl (S), that integrated lignin, are synthesized,. The type and abundance of each monolignol determine the characteristics of the lignin, which acts as a potential physical barrier against phytopathogens; also in case of sedentary endoparasitic nematodes its biosynthesis, composition and deposition in the cell walls can be decisive for the formation of specialized feeding site (syncytia and giant cells). The aim of this study was to compare the transcripts accumulation of *C4H* and *COMT* genes, involved in lignin synthesis, determine C4H enzyme activity, total soluble phenols content, total lignin and monomers H , G and S quantification in chilli CM334- roots inoculated with *N. aberrans* (compatible interaction) or *M. incognita* (incompatible interaction). The relative accumulation of C4H transcripts at 7 and 14 pdi (days after inoculation) was higher in compatible interaction compared with the incompatible, but at 2 and 21 ddi occurred the opposite. The relative accumulation of *COMT* transcripts was higher in the compatible interaction at all times evaluated and the activity of the enzyme C4H too, except at 21 dpi. The results indicated that the expression pattern of *C4H* and *COMT* genes, the C4H enzymatic activity and the content of phenols and lignin were different depending on the type of plant-nematode interactions.

Keywords: *Capsicum annuum*, lignin, guaiacil, syringyl, defense, root-knot nematodes.

DEDICATORIA

Al creador de todas las cosas, por quien vivo y soy quien soy, por sostenerme, guiarme y darme la fortaleza para seguir adelante; con toda la humildad de mi corazón, dedico primeramente mi trabajo a Dios.

A Gala, mi hija.

Tu amor es el detonante de mi felicidad, de mi esfuerzo y mis ganas por superarme cada día, fuiste mi motivación más grande para concluir con éxito esta etapa de mi formación académica.

A mis padres, Miguel Lagunes y Sara Fortiz, y mis hermanos Miguel Antonio y Edgar Ricardo, por su amor y apoyo incondicional, verdaderos coautores de la presente investigación y sin los cuales no habría podido llegar hasta aquí.

Con mucho cariño, a las familias Fortiz Hernández, Zepeda Fortiz, Rey Fortiz, Fortiz Zumaya, Fortis Rodríguez, Castaño y Monsalvo.

A ti, amor.

AGRADECIMIENTOS

A **México**, mi hermoso país, que a través del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (COMACYT) me otorgó una beca que hizo posible mis estudios de posgrado, la realización de la presente investigación, así como la obtención del grado académico.

Al **Colegio de Posgraduados**, especialmente al **Programa de Fitosanidad**, por haberme brindado la oportunidad de continuar con mi preparación profesional.

A la **Dra. Emma Zavaleta Mejía**, por su invaluable apoyo durante mi formación académica, por ser fuente de admiración y respeto, por ser un ejemplo de constancia, respeto, dedicación y amor por la fitopatología, le agradezco su comprensión y tenacidad en momentos difíciles.

A la **Dra. Reyna I. Rojas Martínez**, por su apoyo, atinados consejos y disposición para la realización de la presente investigación.

A la **Dra. Juana Juárez Muñoz, Dr. Benito Reyes Trejo y Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell**, por el apoyo, acertadas observaciones y amistad brindadas en todo momento.

A la **Dra. Olga Gómez Rodríguez** por el apoyo y confianza brindada durante mi formación académica y para la realización de la presente investigación.

A los **profesores del Programa de Fitopatología** por compartir sus conocimientos, tiempo y experiencias, contagiándome su amor hacia la Fitopatología.

A mis **compañeros del Laboratorio 209**, por los agradables momentos compartidos durante mi estancia en el laboratorio.

Al **Dr. Federico Pomar Barbeito y mis compañeros del laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de A Coruña, España**, por su amistad y por hacer del laboratorio un lugar agradable a donde llegar y trabajar.

A mis **amigos**, la familia que yo elegí, por estar conmigo en todo momento y ser parte de mi vida.

NOTA

El presente trabajo se realizó gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304 para el Establecimiento y Operación de los Fondos para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Centro Público Colegio de Postgraduados.

CONTENIDO

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
CONTENIDO	vii
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
Chile serrano CM334.....	5
Nematodos endoparásitos sedentarios	6
<i>Nacobbus aberrans</i>	7
<i>Meloidogyne incognita</i>	8
Sitios especializados de alimentación inducidos por nematodos endoparásitos sedentarios...9	
Defensa de las plantas contra nematodos	12
Polímeros de la pared celular vegetal	13
Biosíntesis y composición de la lignina.....	14
Enzimas y genes involucrados en la síntesis de lignina.....	18
Biosíntesis de lignina durante la interacción planta-hospedante	20
Métodos de estudio de la lignina	23
Modificaciones en la síntesis y acumulación de lignina para la formación de sitios especializados de alimentación (SEA).....	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
Establecimiento del experimento.....	28
Producción de plantas de chile CM334	28
Obtención de inóculo de <i>Nacobbus aberrans</i> y <i>Meloidogyne incognita</i> e inoculación	29
Evaluación de la penetración e infección en raíces por nematodos.....	29
Expresión de <i>C4H</i> y <i>COMT</i>	29
Actividad enzimática del ácido cinámico 4-hidroxilasa (<i>C4H</i>).....	31

Extracción y cuantificación de fenoles solubles totales.....	32
Análisis estadístico de datos.....	34
4. RESULTADOS	35
Infección de raíces de chile CM334 por los nematodos <i>N. aberrans</i> y <i>M. incognita</i>	35
Acumulación de transcritos de los genes <i>C4H</i> y <i>COMT</i> en raíces de plantas de chile infectadas por <i>N. aberrans</i> y <i>M. incognita</i>	39
Actividad de la enzima ácido cinámico 4-hidroxilasa (<i>C4H</i>).....	40
Fenoles solubles totales	40
Contenido de lignina total.....	40
Identificación y cuantificación de monómeros de lignina (tioacidólisis)	41
5. DISCUSIÓN	43
6. CONCLUSIONES	49
7. LITERATURA CITADA	50

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Características de la lignina condensada y no condensada.....18

Cuadro 2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica de los genes *C4H* y *COMT*.....30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Biosíntesis de los monolignoles de la lignina. PAL (fenilalanina amonioliasa), C4H (cinamato-4-hidroxilasa), 4CL (4-cumarato: CoA ligasa), HCT (hidroxicinamoil-CoA:shikimato/quinata hidroxicinamoil transferasa), C3H (p-cumarato 3-hidroxilasa), CCR (cinamoil-CoA reductasa), CCoAOMT (cafeoil-CoA-3-O-metiltransferasa), F5H (ferulato 5-hidroxilasa), COMT (ácido cafeico O-metiltransferasa), CAD (cinamil alcohol deshidrogenasa), POX (peroxidasa), LAC (lacasa). Tomado de Tobimatsu *et al.*, (2013).....15
- Figura 2.** Estructura química de los principales monolignoles. A) monómero p-hidroxifenil (H), b) monómero guaiacil (G) y c) monómero siringil (S).....16
- Figura 3.** Número de individuos de *N. aberrans* y *M. incognita* dentro de raíces de chile CM334 inoculadas con los nematodos (A) y acumulación de transcritos de los genes *C4H* (B) y *COMT* (C) en el primer experimento. Cada barra representa el promedio de cinco raíces para el número de individuos (A) y el promedio de tres réplicas para los niveles de transcritos (B y C). La línea en cada barra corresponde a la desviación estándar. Barras con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).....36
- Figura 4.** Número de individuos de *N. aberrans* y *M. incognita* dentro de raíces de chile CM334 (A); acumulación de transcritos de los genes *C4H* (B) y *COMT* (C); actividad enzimática del ácido cinámico 4-hidroxilasa (D); contenido de fenoles solubles totales (E); y contenido de lignina total (F). En cada gráfica, las barras representan el promedio de los datos del segundo y tercer experimento. La línea en cada barra corresponde a la desviación estándar. Barras con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).....37
- Figura 5.** Penetración de *N. aberrans* en raíces de chile CM334 a los A) 2, B) 7, C) 14 y D) 21 días después de la inoculación.....38

Figura 6. Agallamiento en raíces de chile CM334 inoculadas con *N. aberrans* a los 40 días después de la inoculación. A) y B) Raíz de chile CM334 con agallas a los 40 ddi, C) y D) Hembra de *N. aberrans*. A: agalla, H: hembra.....38

Figura 7. Contenido de los monómeros A) guayacil (G), B) siringil (S) y C) *p*-hidroxifenil (H) en paredes celulares de raíces de plantas chile M334 inoculadas con los nematodos *N. aberrans* o *M. incognita*. El valor de cada punto en las gráficas corresponde al promedio del segundo y tercer experimentos.....42

1. INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annum* L.) es una de las hortalizas más importantes en México debido a su uso alimenticio; sin embargo, su calidad y rendimiento son afectados por la enfermedad conocida como “marchitez del chile” causada por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian (Redondo *et al.*, 1989). Aunque se han implementado diversas estrategias de control como aplicación de fungicidas y prácticas culturales, la mejor forma de controlar la enfermedad es mediante el uso de variedades resistentes (Parra y Ristaino, 2001). El genotipo de chile tipo serrano CM334 ha mostrado un alto grado de resistencia al oomiceto (Fernández-Pavia, 1997; Glosier *et al.*, 2008) y a otros patógenos como virus (PVY, virus Y de la papa y PeMV, virus del moteado del chile) y a tres especies del nematodo agallador *Meloidogyne* [*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood, *M. incognita* (Kofoid and White) Chitwood y *M. javanica* (Treub) Chitwood], pero es susceptible al nematodo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Alcantara y Bosland, 1994; Pegard *et al.*, 2005; Arnedo-Andrés *et al.*, 2006) y a *M. enterolobii* (Villar-Luna, 2013).

Cuando CM334 es previamente infectado por el nematodo *N. aberrans*, se comporta como susceptible al oomiceto, fenómeno conocido como “rompimiento de la resistencia”, éste se asocia con cambios metabólicos y fisiológicos resultantes de la reprogramación de la expresión génica inducida por el nematodo en la raíz del hospedante, que en turno provocan la alteración de algunas respuestas de defensa de las plantas generadas a través de las rutas del ácido mevalónico y de los fenilpropanoides, por ejemplo síntesis de capsidiol, compuestos fenólicos y lignina (Vargas *et al.*, 1996; Zavaleta-Mejía, 2002; López-Martínez y Zavaleta-Mejía, 2007, Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Godínez-Vidal *et al.*, 2008; López-Martínez *et al.*, 2010).

La lignina, producto de la vía de los fenilpropanoides, constituye una barrera física potencial contra la infección por nematodos y otros fitopatógenos. Está constituida principalmente por tres monómeros: *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) y siringil (S) (Vanholme *et al.*, 2008), siendo las unidades S las que incrementan el grado de rigidez y resistencia del tejido vegetal a la invasión por patógenos (Menden *et al.*, 2007).

Durante la biosíntesis de los diferentes monómeros de lignina, la L-fenilalanina amonio-liasa (PAL) y ácido cinámico 4-hidroxilasa (C4H) son enzimas tempranas clave para la síntesis de fenilpropanoides, al igual que la ácido ferúlico 5-hidroxilasa (F5H) la cual es requerida para la síntesis de unidades S (Meyer *et al.*, 1998). Posteriormente, las metiltransferasas ácido cafeico *O*-metiltransferasa (COMT) y cafeoil-CoA-3-*o*-metiltransferasa (CCoAOMT), emplean como sustratos al 5-hidroxiconiferaldehído y al cafeil-CoA, respectivamente. COMT es esencial para la síntesis de unidades S y la supresión de la CCoAOMT da lugar a la reducción del contenido de lignina total y disminuye la cantidad de unidades S/G, sugiriendo una participación en la biosíntesis de ambos monómeros (G y S) (Zhao *et al.*, 2002).

Debido a su lignificación la endodermis del cilindro vascular en raíces de plantas no es atravesada por muchos nematodos endoparásitos, excepto los formadores de quistes (Wuyts *et al.*, 2006). En general, plantas con altos contenidos de lignina son menos accesibles a microbios e insectos herbívoros, así, la presencia de este polímero en sus paredes celulares constituye una importante defensa preformada e inducida, contra de fitopatógenos (Quentin *et al.*, 2009). Los nematodos agalladores como *Meloidogyne* y *Nacobbus* inducen la formación de sitios especializados de alimentación (SEA) en el cilindro vascular de las raíces. Wuyts *et al.* (2007), mencionan que las paredes celulares lignificadas constituyen barreras físicas potenciales para la migración y alimentación de los nematodos, y que además pueden limitar el acceso a los polisacáridos de la pared celular por las enzimas producidas por el nematodo.

Bell (1981) menciona que el éxito de los nematodos agalladores depende del establecimiento y mantenimiento de las células gigantes, por lo que la composición química de la lignina constituye un factor que contribuye a determinar el tipo de interacción planta-patógeno resultante. Actualmente existe un debate, sobre el papel que desempeñan los monolignoles en la interacción planta-patógeno; algunos autores señalan que la síntesis de la lignina del tipo S puede ser particularmente inducida en interacciones incompatibles (De Ascensao y Dubery, 2000, Skyba *et al.*, 2013) por un lado como parte de la respuesta general de defensa, como ocurre también en interacciones compatibles (De Ascensao y Dubery, 2000), y también por su resistencia a la degradación enzimática por nematodos y hongos, por otro lado Turner y Rosales, (2005) señalan que los componentes liberados después de la degradación de la pared celular podrían resultar tóxicos para los diferentes invasores.

En oposición a lo anterior, algunos autores aseveran que la lignina S es más susceptible a la degradación por hongos degradadores en comparación con la lignina G, debido al tipo de enlaces que contiene, su bajo potencial redox, y el hecho de contar con más oxígenos en su estructura y un menor grado de entrecruzamiento, la hace más reactiva de tal manera que fitopatógenos, como los hongos selectivamente degradan aquellas regiones de la pared celular ricas en este monolignol (Vane *et al.*, 2006).

De manera similar lo que sucede con otros patógenos, el papel de los diferentes monolignoles en la interacción planta-nematodo es complejo, sin embargo se sugiere que la presencia y abundancia de los diferentes tipos de monolignoles en los tejidos del hospedante pueden afectar el ciclo de vida del nematodo. En plantas de *Arabidopsis thaliana* en las que se sobre-expresaron las enzimas C4H y F5H, hubo un incremento del 50% en el contenido de unidades S respecto con las plantas silvestres, mientras que la producción de unidades G se inhibió, ocasionando que en las plantas modificadas la cantidad de huevos, juveniles y por consiguiente la reproducción del nematodo *M. incognita* fuera menor en comparación con las plantas silvestres, a pesar de que la infección fue igual en ambos materiales (Wuyts *et al.*, 2006); el incremento de lignina S en los haces vasculares resultó desfavorable para el nematodo, la presencia de dichas unidades posiblemente impidieron el flujo de nutrientes a las células gigantes o dificultaron el proceso de alimentación de los nematodos en las células gigantes, afectando así la tasa de desarrollo del nematodo (Meyer *et al.*, 1998; Wuyts *et al.*, 2006).

También en plantas de tabaco en las que se bloqueó la expresión de la enzima isoflavona O-metiltransferasa (OMT), y en las que el contenido de unidades S se redujo 10% respecto a las plantas silvestres, hubo una disminución del tiempo en que *M. incognita* completó su ciclo de vida y con un mayor número de juveniles en comparación con las plantas no transformadas, por lo que la ausencia de unidades S en la interacción planta-nematodo favoreció la reproducción del nematodo (Atanassova *et al.*, 1995; Wuyts *et al.*, 2006).

En cambio, Quentin *et al.* (2009), encontraron que en plantas de *A. thaliana* en las que el nivel de lignina S se redujo debido al bloqueo de la actividad de la enzima COMT, el desarrollo del nematodo, así como su ciclo de vida fue similar al observado en plantas testigo, en las que no se bloqueó a la enzima COMT; esto es, la reducción del S no afectó ni positiva ni

negativamente el establecimiento del nematodo. Se menciona que *A. thaliana* es por naturaleza susceptible a *M. incognita*, lo que podría explicar porque en este caso las diferencias en el contenido de los monómeros de lignina (G o S) en los tejidos de la planta, no influyó en la infección y ciclo de vida del nematodo. Sin embargo, puede ser que en otras plantas modificaciones en la actividad de la enzima COMT, o cualquier otra implicada en la biosíntesis de los monolignoles determinen el tipo de interacción (compatible o incompatible) (Pegard *et al.*, 2005).

Con base en lo anterior y debido a la escasa investigación que se ha realizado en relación con los cambios inducidos por *N. aberrans* en la expresión de genes, la actividad de las enzimas, y la acumulación de metabolitos como fenoles solubles, monolignoles y lignina sintetizados a través de la ruta de los fenilpropanoides se realizó el presente estudio que tuvo por objetivos:

- 1) Comparar la acumulación de transcritos de los genes *C4H* y *COMT*, y la actividad de la enzima C4H, en la interacción compatible chile CM334-*N. aberrans* y en la incompatible chile CM334-*M. incognita*.
- 2) Determinar el contenido de fenoles solubles totales en raíces de chile CM334 inoculado con *N. aberrans* o con *M. incognita*.
- 3) Determinar el contenido de lignina, así como el contenido de unidades fenólicas G y S en paredes de células de la raíz de chile CM334 inoculado con *N. aberrans* o con *M. incognita*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Chile serrano CM334

El chile (*Capsicum annum* L.) tipo serrano CM334, también conocido como “Criollo de Morelos” es altamente resistente a la enfermedad conocida como “marchitez del chile” inducida por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leonian (Fernández- Pavia y Linddell, 1997; Ortega *et al.*, 1991, Glosier *et al.*, 2008). CM334 también es resistente a los virus *Potato virus Y* (PVY), *Pepper mottle virus* (PeMoV), *Ecuadorian rocoto virus* (ERV) y *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV) (Boiteux *et al.*, 1996; Janzac *et al.*, 2009), y a los tres nematodos agalladores de mayor importancia económica *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*; sin embargo, es susceptible al nematodo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Alcantara y Bosland, 1994; Pegard *et al.*, 2005; Arnedo-Andrés *et al.*, 2006) y a *M. enterolobii* (Villar-Luna, 2013).

La restricción del desarrollo y reproducción del nematodo y del oomiceto en CM334 se asocia con respuestas bioquímicas posteriores a la penetración, la reacción de hipersensibilidad y la presencia de compuestos fenólicos como ácido clorogénico; además las barreras físicas constituidas por las vellosidades en tallo y hojas, también dificultan la adherencia del oomiceto a la planta (Pegard *et al.*, 2005; Egea-Gilabert *et al.*, 2008). El oomiceto dispara una fuerte respuesta hipersensitiva (RH) a nivel de raíz, tallo y follaje en CM334 (Fernández-Pavía, 1997; Candela *et al.*, 2000, Ueeda *et al.*, 2006) y la generación de moléculas involucradas en procesos de señalización como el óxido nítrico, ácido jasmónico y ácido salicílico (Requena *et al.*, 2005; Ueeda *et al.*, 2006). También, se reportan cambios en la expresión de genes involucrados en defensa como aquellos responsables de la síntesis de la fitoalexina sesquiterpénica capsidiol (Ha *et al.*, 2003; Silvar *et al.*, 2008). Sy *et al.*, (2005) indican que la resistencia exhibida por CM334 contra los patógenos antes mencionados se debe a la expresión de tres genes regulados de manera independiente: *Me7* responsable de la expresión de la RH; *Mech*, que le confiere resistencia contra *M. chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo y Finley, 1980 y *Pvr4*, el cual inhibe la multiplicación del virus. Pegard *et al.*, (2005) sugieren que CM334 podría exhibir dos mecanismos de resistencia para nematodos: 1) la

presencia de barreras físicas o la exudación de algún compuesto nematostático, y 2) mecanismos que eviten la formación de agallas y masas de huevecillos a través del bloqueo de la migración, desarrollo y reproducción del nematodo.

Así mismo, en respuesta al ataque por *P. capsici* se reportan cambios en la expresión de genes relacionados con defensa como: *PAL*, que codifica para la fenilalanina amonio liasa; *GLU* para las β -1,3-glucanasas (Silvar *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012); *PR-1* y *POX*, proteína relacionada con la patogénesis y peroxidasas, respectivamente (Silvar *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012); *OPR-3*, para la 12-oxofitodienoato reductasa, proteína asociada con la síntesis de ácido jasmónico (Ueeda *et al.*, 2006); y algunos genes responsables de la síntesis de la fitoalexina sesquiterpénica capsidiol (*HMG2*: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoenzimaA reductasa, *SC*: sesquiterpeno ciclasa y *EAS*:5-epi-aristoloqueno sintasa) (Silvar *et al.*, 2008; Fernández-Herrera *et al.*, 2012). Igualmente se consignan incrementos en el contenido de la fitoalexina capsidiol (Egea *et al.*, 1996; Candela *et al.*, 2000) y fenoles con propiedades antimicrobianas como el ácido trans-cinámico (Candela *et al.*, 1995).

Nematodos endoparásitos sedentarios

Los nematodos parásitos de plantas son patógenos de gran importancia económica, ya que al alimentarse de raíces, tallos o follaje causan daño a los cultivos; tienen una gran cantidad de hospedantes y pueden clasificarse como nematodos ectoparásitos (los que viven fuera de la planta) o endoparásitos (que tienen un hábito migratorio o sedentario) (Goddijn *et al.*, 1993).

Los nematodos endoparásitos sedentarios, como los agalladores (*Meloidogyne* spp. y *Nacobbus* spp.) y los que se enquistan (*Heterodera* spp. y *Globodera* spp.), se caracterizan por invadir el sistema radical de la planta hospedante y migrar inter o intracelularmente hasta el cilindro vascular para inducir la formación de estructuras especializadas para su alimentación, ya sean células gigantes o sincitios, respectivamente (Jones, 1981; Goddijn *et al.*, 1993; Sijmons, 1993; Williamson y Hussey, 1996; Barthels *et al.*, 1997), que aunque son diferentes, comparten algunas características: sus núcleos y nucléolos se vuelven alargados, el citoplasma incrementa su volumen, incrementa el número de organelos celulares, y la pared

celular se invagina expandiendo el área que se encuentra en contacto con el xilema para favorecer un intercambio intensivo de solutos entre el sistema vascular del hospedante y el sitio de alimentación inducido por el nematodo (Goddijn *et al.*, 1993; Jones, 1981).

Nacobbus aberrans

El género de nematodos *Nacobbus*, también llamados “falsos agalladores”, está integrado por dos especies, *N. aberrans* (Thorne, 1935) y *N. dorsalis* Thorne y Allen (1944), están distribuidos principalmente en el norte y sur de América. *N. aberrans* es responsable de importantes pérdidas económicas en Chile, frijol, papa, tomate y remolacha azucarera (Manzanilla-López, 1999). Algunos factores que han dificultado el control de *N. aberrans* son la capacidad reproductiva del nematodo, pues la hembra puede producir cientos de huevecillos, tiene además su amplio rango de hospedantes y alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones climáticas (Manzanilla-López, 1999).

El género *Nacobbus* se distingue de otros miembros del orden Tylenchida, porque posee un marcado dimorfismo sexual, las hembras son obesas, con una sola gónada y glándulas esofágicas sobrepuestas dorsalmente al intestino, mientras que los machos son filiformes y con alas caudales terminales (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

La hembra madura deposita sus huevecillos en una matriz gelatinosa, la primera etapa juvenil del nematodo (J1) se desarrolla dentro del huevecillo y sufre la primera muda para dar lugar al J2 que emerge del huevo, migra en el suelo y penetra a la raíz, donde puede permanecer o entrar y salir en numerosas ocasiones (Clark, 1967; Manzanilla-López, 1999). El J2 se considera el principal estado infectivo y puede mudar dentro de la raíz o en el suelo, mientras que el J3 es menos activo y se localiza frecuentemente enrollado, en forma de “C”, en la corteza de la raíz. La muda del cuarto estadio juvenil, femenino o masculino, llamado también J4, ocurre en la raíz o en el suelo, sin embargo, el J4 masculino se asocia más con la corteza de la raíz (Manzanilla-López *et al.*, 2002), mientras que de la muda del J4 femenino, de forma de huso o globosa, emerge la hembra inmadura que migra a las células adyacentes del sistema vascular, donde establece su sitio especializado de alimentación (sincitio) (Clark, 1967), cuya formación comienza a partir de una sola célula, en la que su protoplasto se fusiona con el de

sus células vecinas a través del ensanchamiento progresivo de sus plasmodesmos, conformando un sincitio multinucleado (Jones, 1981).

Los juveniles del tercer y cuarto estadio (J3 y J4) son considerados relativamente inactivos a diferencia de los juveniles del segundo estadio (J2), los cuales son migratorios y activos. Tanto los estadios juveniles, como el estado adulto inducen una serie de cambios estructurales, químicos y fisiológicos que resultan en modificaciones celulares e histológicas en las raíces de su hospedante (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

En general, *N. aberrans* induce clorosis del follaje, marchitez súbita y reducción significativa del crecimiento (achaparramiento) en las plantas infectadas, mientras que en las raíces, el síntoma más característico es la formación de agallas, mismas que al inicio de la infección, se encuentran separadas y alojando en su interior una sola hembra, pero a medida que la infección aumenta también lo hace el número de agallas, adoptando el aspecto de cuentas de rosario que en algunos casos llegan a contener a más de una hembra (Cid del Prado, 1985; Manzanilla-López *et al.*, 2002).

Meloidogyne incognita

Las especies del género *Meloidogyne* son consideradas los nematodos de mayor importancia económica por su amplia distribución mundial y gran cantidad de hospedantes, a ellas se les atribuye más del 5 % de pérdidas económicas en los cultivos a nivel mundial (Eisenback y Triantaphyllou, 1981). De las casi 60 especies de nematodos agalladores del género *Meloidogyne*, las especies: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla* son las que causan daños considerables en hortalizas (Zuckerman *et al.*, 1994).

Los nematodos del género *Meloidogyne* presentan dimorfismo sexual. Las hembras son esféricas, mientras que los machos son elongados y vermiformes con cola redondeada, presentando espícula y gubernáculo muy notorios (Eisenback y Triantaphyllou, 1981).

El ciclo de vida del nematodo inicia cuando los huevos son depositados dentro de una matriz gelatinosa, producida por las células de las glándulas rectales de la hembra, antes y durante la producción de los huevos y secretada a través del ano; contiene proteínas, carbohidratos y

enzimas. Al momento de depositar los huevos la hembra se encuentra parcial o totalmente embebida en la raíz de su hospedante. El primer estadio juvenil se puede mover dentro del huevo, sin embargo no es muy activo. La primera muda ocurre en el huevo, poco después los juveniles del segundo estadio (J2) emergen, son atraídos a la raíz del hospedante y se introducen en ellas e inyectan proteínas secretadas por sus glándulas esofágicas para inducir la diferenciación de su sitio especializado de alimentación, proceso durante el cual el nematodo se vuelve sedentario. Los estadios J3 y J4 carecen de un estilete funcional, por lo que no se pueden alimentar, el tiempo transcurrido en dichos estadios es muy corto, y finalmente llega a la etapa adulta (Moens *et al.*, 2009; Eisenback y Triantaphyllou, 1981).

Sitios especializados de alimentación inducidos por nematodos endoparásitos sedentarios

Los nematodos endoparásitos sedentarios inducen la formación de sus sitios especializados de alimentación a través de la extensiva y coordinada modificación de la pared celular (PC) de las células que conformaran las células de alimentación, ya sean células gigantes o sincitios. En ambos sitios de alimentación, existe un incremento en la actividad metabólica y densidad citoplásmica, la formación de numerosas vacuolas pequeñas, proliferación de organelos, particularmente del aparato de Golgi, mitocondrias, plastidios, ribosomas y retículo endoplásmico (Rodiuc *et al.*, 2014). Dichas modificaciones podrían ser el resultado de alteraciones inducidas por el nematodo a través de la manipulación de la expresión de genes de su hospedante que codifican para proteínas tales como: extensinas (*EXT*), expansinas (α - y β *expansinas*), pectin acetilesterasas (*PAE*), pectato liasas (*PEL*) y endoglucanasas (*endo- β -1,4-glucanasas*). Estas enzimas, participan en la modificación de paredes celulares en células gigantes, mientras que en el caso de los sincitios se atribuye la participación de genes que codifican para expansinas (α - y β *expansinas*), endoglucanasas (*endo- β -1,4-glucanasas*), *EXT*, poligalacturonasas (*PG*) y pectin acetilasas (*PE*) (Rodiuc *et al.*, 2014). Sin embargo, en el proceso de rediferenciación celular y formación del sitio especializado de alimentación se presentan particularidades, dependiendo de si formará una célula gigante o un sincitio, cuya estructura es diferente.

Células gigantes. Los nematodos agalladores inducen la formación de las células gigantes cuando los J2 se alojan en la zona de diferenciación del cilindro vascular y cada individuo induce la diferenciación de cinco a siete células parenquimatosas en células gigantes multinucleadas (Abad *et al.*, 2009). La formación de las células gigantes inicia con la constitución de zonas de expansión a partir de las cuales comenzará el engrosamiento de la PC, las cuales se extienden progresivamente para abarcar grandes regiones de la misma (Rodiuc *et al.*, 2014); posteriormente, a partir de esas zonas de expansión se generan regiones altamente reticuladas que asemejan laberintos de PC llamadas “invaginaciones”, cuya principal función es intensificar el transporte de solutos hacia adentro y afuera de la célula gigante (Vieira *et al.*, 2012; Rodiuc *et al.*, 2014). Dichas invaginaciones se desarrollan progresivamente durante el proceso de maduración del nematodo y degeneran una vez que éste alcanza su madurez y completa su ciclo de vida (Rodiuc *et al.*, 2014). En las células gigantes, al igual que en los sincitios, pueden encontrarse restos o fragmentos de paredes celulares, cuya presencia se pensaba era originada por el rompimiento de la PC; sin embargo, autores como de Almeida Engler *et al.* (2004) señalan que la presencia de dichos fragmentos también podría ser resultado de la interrupción del proceso de expansión del fragmoplasto y formación de la PC (Jones y Payne, 1978; de Almeida Engler *et al.*, 2004; Rodiuc *et al.*, 2014).

Los plasmodesmos tienen además una importante función durante la formación de los SEA, son canales de membrana localizados en las paredes celulares que facilitan la continuidad citoplasmática entre las células, de tal manera que conforman una red de intercambio intercelular. A diferencia de una célula que no es invadida por nematodos, donde los plasmodesmos se encuentran distribuidos en la PC de forma dispersa, en aquellas donde se induce la formación de células gigantes se forma una gran cantidad de plasmodesmos entre las paredes de las células gigantes y también en las paredes de las células que las rodean (Hofmann *et al.*, 2010), lo cual sugiere la existencia de un sistema de transporte masivo de solutos vía simplasto (Hofmann *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2012). Adicionalmente, el flujo de nutrientes afuera y adentro de las células gigantes también puede estar mediado por proteínas de transporte especializadas localizadas en la membrana (Rodiuc *et al.*, 2014).

Sincitio. El sincitio en cambio es formado cuando los J2 se alojan cerca del cilindro vascular y a partir de una sola célula ocurre el ensanchamiento o dilatación progresiva de los plasmodesmos, hasta que la célula a partir de la cual se inició la formación del SEA, se fusiona con sus células vecinas por la disolución de las paredes celulares para constituir un gran sincitio multinucleado (Turner y Rowe, 2006). En las primeras etapas de la formación del sincitio ocurre la disolución de las paredes celulares, alteraciones en su configuración e incrementos en su síntesis con la finalidad de que se formen invaginaciones cerca del xilema, así como para contribuir al engrosamiento de la PC que rodea al sincitio (Golinowski *et al.*, 1996; Rodiuc *et al.*, 2014). Aunque las paredes de las células que integran el sincitio se rompen, las paredes celulares que lo delimitan se extienden y engrosan para resistir el aumento de presión generado dentro del SEA (Golinowski *et al.*, 1996). Los plasmodesmos son esenciales para la formación y expansión del sincitio, pues representan importantes puntos de inicio de degradación de paredes celulares, sin embargo, en etapas posteriores la presencia de plasmodesmos disminuye por la deposición temporal de calosa (Grundler *et al.*, 1998; Hofmann y Grundler, 2006; Hofmann *et al.*, 2010) y debido a la obstrucción los plasmodesmos existentes en etapas tempranas de formación del sincitio, los nutrientes son transportados desde el floema de forma apoplástica a través de transportadores transmembranales (Hofmann y Grundler, 2006; Rodiuc *et al.*, 2014).

La PC de los sincitios inmaduros se engrosa de manera uniforme, excepto en aquellos fragmentos de pared que están en contacto directo con los tubos cribosos, y que permanecen normales hasta el momento en que la PC del tubo criboso comienza a engrosar (Grundler *et al.*, 1998). Al igual que como ocurre con las células gigantes, durante la conformación del sincitio también se presenta la formación de invaginaciones de PC cerca del xilema y floema; sin embargo, éstas invaginaciones sólo son evidentes a los 5 ó 7 días después de ocurrida la infección, una vez que el proceso de formación del SEA está avanzado (Golinowski *et al.*, 1996) y entre los 4 y 7 después de la inoculación (ddi) incrementa la cantidad de plasmodesmos y disminuye la deposición de calosa; y en etapas posteriores, después de los 10 ddi, las células que conforman el sincitio se conectan a través de los plasmodesmos haciendo posible la transferencia de nutrientes (Hofmann y Grundler, 2006; Hofmann *et al.*, 2010).

Defensa de las plantas contra nematodos

Los nematodos, ocasionan heridas en el tejido de su hospedante durante la infección, así como durante su migración dentro de la planta y durante la formación y expansión del sitio de alimentación. Durante su migración, los nematodos agalladores previenen que la planta dispare fuertes respuestas de defensa, mientras que los nematodos formadores de quistes migran a través de las células corticales hacia el centro de la raíz causando necrosis desde su punto de entrada hasta el sitio del cual se alimentan (Wyss, 1997).

Las plantas reconocen y reaccionan a la invasión por patógenos activando diferentes mecanismos de defensa (Williamson y Hussey, 1996), como la producción de especies reactivas de oxígeno, señalizadores sistémicos y activación de genes de defensa que dan lugar a la producción y fortalecimiento de barreras estructurales o a la síntesis de metabolitos tóxicos; y dependiendo de si la respuesta es rápida o lenta la interacción resultará en incompatible o compatible, respectivamente. Una interacción incompatible se caracteriza por una respuesta hipersensible que da lugar a la muerte celular y necrosis, impidiendo el desarrollo y formación de los sitios de alimentación de los nematodos; adicionalmente a estas respuestas de defensa local en el sitio de infección, también se desencadenan respuestas sistémicas que pueden ayudar a la planta a contrarrestar el ataque por nematodos y otros fitopatógenos (Perry y Moens, 2006).

Se han reportado cambios en la expresión de genes de defensa en respuesta a la invasión por nematodos; en tomate, se indujo la actividad de genes de defensa en raíz a las 12 h después de la inoculación con nematodos agalladores, muchos de ellos son también inducidos en interacciones incompatibles pero con diferente magnitud y rapidez (Williamson y Hussey, 1996). Algunos de los genes que se activan son aquellos codificantes para peroxidasas, quitinasas, lipoxigenasas, extensinas y proteinasas, pero, en etapas tempranas del proceso de infección por nematodos también se activaron algunos genes codificantes en vías metabólicas que resultan en la síntesis de fitoalexinas o la deposición de barreras físicas como calosa y lignina (Perry y Moens, 2006).

La infección por nematodos promueve la síntesis de compuestos fenilpropanoides (Edens *et al.*, 1995; Balbridge *et al.*, 1998). La inducción de la biosíntesis de lignina ocurre como respuesta a estrés biótico y abiótico y se la considera un importante mecanismo de defensa durante la interacción planta-patógeno; si bien es cierto que en toda interacción planta-nematodo ocurrirá su inducción, también es cierto que la regulación de su síntesis y composición variará dependiendo de sí la interacción es compatible o incompatible. Ithal *et al.*, (2007) reportaron que en plantas de soya inoculadas con el nematodo *Heterodera glycines* se estimuló la actividad de genes implicados en la vía de los fenilpropanoides, favoreciendo la síntesis de una amplia variedad de metabolitos secundarios en las plantas, como flavonoides y antocianinas, y lignina y suberina componentes de las paredes celulares secundarias. La acumulación de fitoalexinas, la deposición de lignina y la acumulación de compuestos fenólicos caracterizan la respuesta de defensa de las plantas; sin embargo, la función de estos metabolitos secundarios en las interacciones planta-nematodo no están del todo claras, pues aunque su sobreexpresión podría ser parte de la respuesta de la planta a la infección por los nematodos en una interacción incompatible, estos componentes podrían desempeñar otro papel en una interacción compatible (Ithal *et al.*, 2007).

Polímeros de la pared celular vegetal

La lignina se deposita principalmente en la pared celular (PC) secundaria de ciertas células especializadas como las de los vasos del xilema, elementos traqueales, fibras del floema y peridermis, y en menor medida, en la región media de la lamela, entre las células; su síntesis puede ser inducida por condiciones de estrés biótico y abiótico, como heridas, infección por patógenos y estrés metabólico (Vanholme *et al.*, 2010).

La PC, es un complejo extracelular dinámico, compuesto básicamente de celulosa y otras sustancias como hemicelulosa, pectina, proteínas, lignina, cutina, suberina y sales minerales, entre otras (Bonawitz y Chapple, 2010; Dixon *et al.*, 2002); tiene diferentes funciones fisiológicas y estructurales en la planta: contribuye al sostén y constitución de los tejidos, brinda resistencia ante la presión interna de la célula, participa en el crecimiento vegetal, regula la difusión de sustancias a través del apoplasto y participa en la percepción y

señalización durante el desarrollo vegetal y los mecanismos de defensa (Underwood, 2012; Rodiuc *et al.*, 2014). La celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina constituyen alrededor de un 90% de la PC vegetal y las proteínas estructurales y las enzimas constituyen el 10% restante (Cosgrove, 1997). Estos últimos componentes tienen un papel crucial en la integración de la PC, el metabolismo y elongación celular, y en la señalización (Fry, 1995; Cosgrove, 1997).

La PC, está compuesta de tres capas: lámina media, PC primaria y PC secundaria. La lámina media, la capa más externa, es compartida por las células adyacentes en la mayoría de los tejidos vegetales y está constituida por pectinas y proteínas, y en menor proporción arabinanos, galactanos, arabinogalactanos y ramnogalacturonatos (Bonawitz y Chapple, 2010; Dixon *et al.*, 2002).

La PC primaria es sintetizada durante el crecimiento y elongación celular en etapas tempranas del desarrollo y se compone de celulosa, hemicelulosa, polisacáridos pécticos y proteínas como la extensina, que es rica en hidroxiprolina y serina (Carpita, 1996; Dixon *et al.*, 2002) y una vez que las células han dejado de elongarse, se sintetiza la PC secundaria gracias a la participación de un complejo de factores de transcripción tejido-específicos, algunos de los cuales contienen dominios protéicos NAC (cuyo nombre se atribuye a las iniciales de las tres primeras proteínas descritas que contienen el dominio de unión al ADN: NAM, ATAF1-2 y CUC) o MYB (llamado así por el oncogen *v-myb* del virus del mieloblastoma aviar, primer gen *myb* que se identificó). Tales dominios actúan como reguladores transcripcionales que al unirse a una región promotora específica (ej. elementos *cis*) de un gen, estimulan o reprimen su transcripción y por tanto tienen un papel importante en la expresión de genes en plantas (Bonawitz y Chapple, 2010). En plantas, la lignina se encuentra principalmente como componente de la PC secundaria (Bonawitz y Chapple, 2010).

Biosíntesis y composición de la lignina

Los compuestos fenólicos, como estilbenos, coumarinas, flavonoides, algunas fitoalexinas y lignina se sintetizan a través de la vía de los fenilpropanoides (Dixon *et al.*, 2002), la síntesis de esta última requiere la intervención de dos rutas metabólicas comenzando por la ruta del shikimato, para la producción de L-fenilalanina y L-tirosina, y luego la ruta fenilpropanoide desde la L-fenilalanina hasta la biosíntesis final de los alcoholes cinamílicos (Boerjan *et al.*,

2003), con la participación de 10 enzimas (Fig. 1): fenilalanina amonio liasa (PAL), tres citocromo P450-monoxigenasas (cinamato-4-hidroxilasa, *p*-cumarato-3-hidroxilasa y ferulato-5-hidroxilasa, C4H, C3H y F5H, respectivamente), dos metiltransferasas (cafeoil-CoA-*O*-metiltransferasa y cafeato-*O*-metiltransferasa, CCoAOMT y COMT, respectivamente) y dos oxidoreductasas (cinamil-CoA-reductasa y cinamil alcohol deshidrogenasa, CCR y CAD, respectivamente), además de las enzimas 4-cumarato CoA ligasa (4CL) e hidroxicinamoil-CoA shikimato (HCT) (Bonawitz y Chapple, 2010; Tobimatsu *et al.*, 2013).

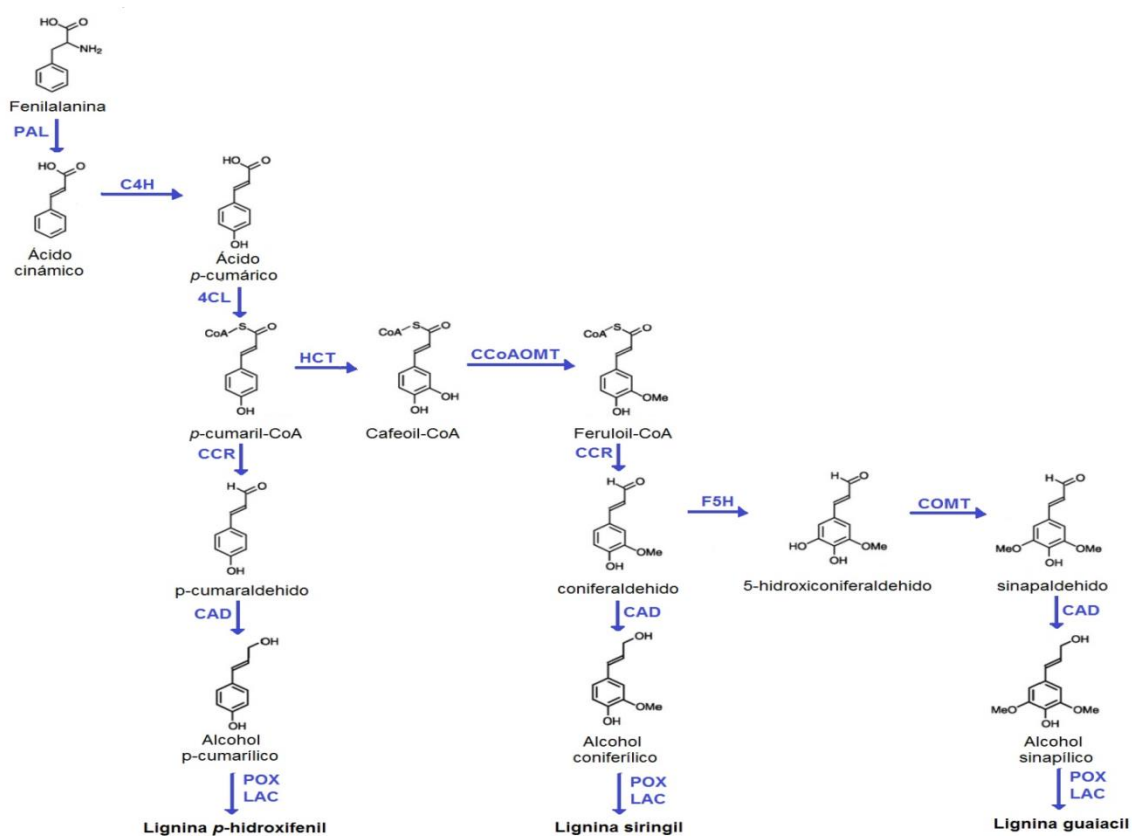


Figura 1. Biosíntesis de los monolignoles de la lignina. PAL (fenilalanina amonioliasa), C4H (cinamato-4-hidroxilasa), 4CL (4-cumarato: CoA ligasa), HCT (hidroxicinamoil-CoA:shikimato/quinata hidroxicinamoil transferasa), C3H (*p*-cumarato 3-hidroxilasa), CCR (cinamoil-CoA reductasa), CCoAOMT (cafeoil-CoA-3-*O*-metiltransferasa), F5H (ferulato 5-hidroxilasa), COMT (ácido cafeico *O*-metiltransferasa), CAD (cinamil alcohol deshidrogenasa), POX (peroxidasa), LAC (lacasa). Tomado de Tobimatsu *et al.*, (2013).

La síntesis de los monómeros de lignina, llamados monolignoles comienza con la desaminación de la fenilalanina para formar ácido cinámico, posteriormente, una serie de hidroxilaciones y subsecuentes reacciones de *O*-metilación modifican los anillos aromáticos del ácido cinámico reduciendo su cadena lateral de un ácido a un alcohol, lo que da como resultado la producción de los monolignoles: alcohol *p*-coumarílico (4-hidroxicinámico), alcohol coniferílico (3-metoxi 4-hidroxicinámico) y alcohol sinapílico (3,5-dimetoxi 4-hidroxicinámico); éstos difieren en su grado de metoxilación, el alcohol coniferílico presenta un grupo metoxilo (-OCH₃) en la posición 3 del anillo aromático, el sinapílico dos metoxilos en sus posiciones 3 y 5, y el *p*-coumarílico carece de sustituyentes en su anillo aromático (Fig. 2). Después de su incorporación al polímero lignina, estos monómeros se refieren como unidades *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) y siringil (S), respectivamente, y su disposición y abundancia en la PC determinan las propiedades físicas del tejido (Rastogi y Dwivedi, 2008; Vanholme *et al.*, 2008; Bonawitz y Chapple, 2010; Vanholme *et al.*, 2010; Tobimatsu *et al.*, 2013).

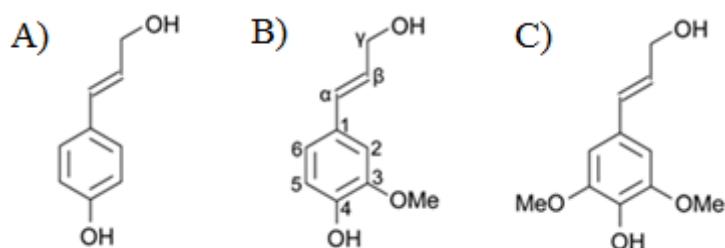


Figura 2. Estructura química de los principales monolignoles. A) monómero *p*-hidroxifenil (H), b): monómero guaiacil (G) y c) monómero siringil (S).

En general, los monómeros G y S son los principales componentes de la lignina en dicotiledóneas angiospermas, mientras que en gimnospermas la lignina consiste principalmente de monómeros de G con bajos niveles de unidades H, en cambio los pastos contienen mayor cantidad de unidades H que las dicotiledóneas (Bonawitz y Chapple, 2010). Además de los monómeros *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) y siringil (S), estudios recientes muestran que otros tipos de monómeros son sintetizados en órganos y tejidos específicos de la planta como los encontrados en la testa de semillas de vainilla (monocotiledónea),

sintetizada a partir del alcohol cafeílico, dando lugar a la producción de monómero catequil (C) (Chen *et al.*, 2012). Un estudio realizado a 130 diferentes especies de cactus (dicotiledónea) revelaron que algunos miembros de la familia Cactaceae también poseen lignina del tipo C en la testa de las semillas, mientras que otras poseen las unidades normales G/S y muy pocas especies contienen unidades 5 hidroxiguaiaicil (5H) (Chen *et al.*, 2013).

La unión de las unidades S y G se realiza mediante varios enlaces: β -O-4, β -5, β -1, 5-5, 4-O-5 y β - β , siendo β -O-4 la unión más frecuente; además de estas uniones, los monolignoles pueden entrelazarse con otros polímeros de la pared celular como polisacáridos y proteínas (Rastogi y Dwivedi, 2008). Los monómeros de lignina se unen covalentemente a hemicelulosas y proveen de fuerza y rigidez a la PC de la planta, permitiendo su crecimiento, y al sistema vascular le confieren la hidrofobicidad necesaria para el transporte de agua y solutos (Vanholme *et al.*, 2008); la lignina puede clasificarse en condensada y no condensada con base en el tipo de enlace que se establece entre monolignoles y otros componentes de la PC (Cuadro 1). En la composición de la PC también participan los ácidos *p*-hidroxicinámicos (principalmente *p*-cumárico y ferúlico), los cuales contribuyen a la unión de la lignina con la hemicelulosa mediante enlaces éster y éter; el ácido ferúlico es el principal responsable de los puentes entre la lignina y los polisacáridos, mientras que las uniones entre monómeros dan lugar a la conformación de una estructura tridimensional (Sun *et al.*, 2002).

Los monolignoles precursores de la lignina, se sintetizan en el retículo endoplásmico del citosol y posteriormente se transportan a la PC en donde finalmente se depositan (Santiago *et al.*, 2013). Dada su relativa toxicidad a la célula, se ha sugerido que se exportan en forma de monolignoles-glucósidos y ya en la PC son convertidos, mediante la acción de pexosidasas y/o lacasas, a las unidades H, G o S. La deposición de cada unidad en el tejido de la planta se controla espacial y temporalmente; primero se depositan las unidades H, enseguida las G y al final las S (Dixon *et al.*, 2002; Bonawitz y Chapple, 2010; Santiago *et al.*, 2013). La composición y características de la lignina, son determinadas por la abundancia de cada uno de los monolignoles y varían considerablemente entre taxones, tipos de células, e incluso entre capas de las paredes celulares; también contribuyen los factores ambientales y el desarrollo mismo de la planta (Boerjan *et al.*, 2003; Bonawitz y Chapple, 2010; Vanholme *et al.*, 2010; Weng y Chapple, 2010).

Cuadro 1. Características de la lignina condensada y no condensada.

Características	Condensada	No condensada
Tipo de enlace entre monolignoles	Enlaces C-C (β -5, β -1, 5-5 y β - β)	Enlaces aril-alquil éter (β -O-4 y 4-O-5)
Tipo de monolignoles	H y G	S
Estructura de la lignina	Ramificada	Lineal
Polimerización	Mayor polimerización	Menor polimerización
Degradabilidad	Más resistentes a la degradación, recalcitrante	Fácil degradación

C-C: enlaces carbono-carbono; H: *p*-hidroxifenil; G: guaiacil; S: siringil

Enzimas y genes involucrados en la síntesis de lignina

La biosíntesis de monolignoles es un proceso altamente coordinado y regulado por un conjunto de 10 enzimas, las cuales interactúan de manera armónica y coordinada para formar lignina. En *Arabidopsis*, se han identificado 14 genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de monolignoles, incluyendo dos *PAL*, una *C4H*, una *C3H*, una *F5H*, tres *4CL*, dos *CCR*, dos *CAD*, una *HCT* y una *COMT* (Costa *et al.*, 2003); sin embargo, la identificación completa y la función de las isoformas en muchos casos aún se desconoce. La existencia de multigenes sustrato-específicos dificulta la identificación de las isoformas de los genes específicamente involucradas en la lignificación, pese a esta problemática, en algunas especies de plantas se tienen reportados y secuenciados algunos de estos genes y sus isoformas. En el caso del Chile, se encuentran reportadas las secuencias de nueve de los genes que participan en la biosíntesis de monolignoles (*PAL*, *C4H*, *4CL*, *HCT*, *C3H*, *CCoAOMT*, *CCR*, *COMT* y *CAD*)

(Mazourek *et al.*, 2009), pero la identificación y caracterización de sus isoformas aún se desconoce.

Se ha intentado manipular el contenido y composición de la lignina a través de la sobre-expresión o bloqueo de la actividad de los genes que participan en la síntesis de los diferentes monolignoles; solo que para la manipulación de estos genes existe un límite, pues se ha observado el colapso vascular en plantas con grandes deficiencias en lignina (Piquemal *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2001; Ruel *et al.*, 2002), y puesto que éste polímero tiene una función crítica para el fortalecimiento y sostén de los elementos vasculares para el transporte de agua bajo una presión negativa, es razonable pensar que su alteración modifique su estructura y función en las plantas.

La PAL, participa en la síntesis de diferentes compuestos del metabolismo primario y secundario, cataliza la desaminación no oxidativa de la L-fenilalanina a ácido *trans*-cinámico y está involucrada en la biosíntesis de ácido salicílico (SA) y otros compuestos fenólicos como el ácido clorogénico y las fitoalexinas flavonoides con propiedades antimicrobianas, todos ellos implicados en la defensa en las plantas (Huang *et al.*, 2010). Consecuentemente, alteraciones en la expresión del gen *PAL* tienen un gran impacto durante las interacciones planta-patógeno (Sattler y Funnell-Harris, 2013), ya que participa en la formación de complejos enzimáticos, conocidos como metabolones (compartimentos metabólicos), responsables de la canalización metabólica para la síntesis de los diversos compuestos fenólicos (Rasmussen y Dixon, 1999). La síntesis de la enzima es inducida por estreses bióticos y abióticos (Dixon y Pavia, 1995; Mac Donald y D’Cunha, 2007).

La enzima C4H cataliza la hidroxilación del cinamato para producir 4-Coumarato, también conocido como *p*-coumarato (Fraser y Chapple, 2011), ésta y las enzimas F5H y C3H son monooxigenasas dependientes del citocromo P450 que están involucradas en la biosíntesis de monolignoles y pertenecen a las superfamilias CYP73, CYP84 y CYP98, respectivamente (Humphreys y Chapple 2002; Weng *et al.*, 2008). Las dos primeras desempeñan funciones importantes en el crecimiento y desarrollo, mientras que la familia CYP84 constituye un punto de control determinante para la síntesis de lignina tipo S y ésteres sinapato (Meyer *et al.*, 1996; Ehlting *et al.*, 2006; Boudet, 2007).

La enzima 4CL cataliza la formación de ATP dependiente del CoA tioester 4-coumaril CoA, también conocido como *p*-coumaroil CoA, que además de representar el punto de entrada para la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides, también lo es para otro tipo de metabolitos secundarios, como las proantocianidinas, taninos, flavonoides, isoflavonoides y fitoalexinas (Allina *et al.*, 1998; Ehlting *et al.*, 1999; Ehlting *et al.*, 2001; Fraser y Chapple, 2011). Al igual que PAL y C4H, 4CL existe como una familia de multigenes y aunque sus isoformas no han sido del todo caracterizadas parecen tener diferentes funciones en el metabolismo secundario de las plantas, pues su actividad en diferentes sustratos y patrones de expresión espacio-temporales, sugieren distintas funciones fisiológicas (Ehlting *et al.*, 1999; Ehlting *et al.*, 2001; Raes *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2005). Por ejemplo, en *Arabidopsis* las isoformas *At4CL1* y *At4CL2* parecen estar involucradas en la lignificación, mientras que *At4CL3* actúa durante la biosíntesis de flavonoides (Ehlting *et al.*, 1999) y *At4CL4* probablemente participa en la activación de sinapato (Hamberger y Hahlbrock, 2004).

Durante el último paso de la biosíntesis de monolignoles en gimnospermas, los aldehídos *p*-coumarílico, coniferílico y sinapílico, son transformados a su correspondiente alcohol por la enzima CAD (Fraser y Chapple, 2011), mientras que en angiospermas, la enzima SAD (sinapil alcohol deshidrogenasa) es requerida para la biosíntesis de unidades S (Li *et al.*, 2001); sin embargo, Lapierre *et al.*, (2004) demostraron que SAD no siempre es indispensable para la síntesis de unidades S, por lo que la vía de síntesis de lignina en angiospermas es variable (Goujon *et al.*, 2003; Sibout *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2014).

Biosíntesis de lignina durante la interacción planta-hospedante

La evidencia experimental indica que la vía de los fenilpropanoides, a través de la cual se sintetizan los monómeros de lignina, es activada en las plantas después de la infección por patógenos o después de la aplicación de elicitores (Pakusch y Matern, 1991; Menden *et al.*, 2007), de tal forma que la deposición de compuestos fenilpropanoides podría ser parte importante de las respuestas de defensa orientadas al reforzamiento de las paredes celulares en plantas en el sitio de invasión por patógenos (Nicholson y Hammerschmitt, 1992; Kauss *et al.*, 1993).

La lignificación es una respuesta de defensa que puede funcionar como barrera física contra la invasión por patógenos, además su deposición modifica químicamente las paredes celulares y las vuelve más resistentes a la actividad de enzimas degradadoras. Por otra parte, puede limitar la difusión de toxinas del patógeno hacia el hospedante y de nutrientes del hospedante hacia el patógeno, asimismo puede producir precursores tóxicos y radicales libres, así como contener al patógeno (Nicholson y Hammerschmit, 1992).

Los sitios especializados de alimentación de los nematodos se localizan principalmente en el cilindro vascular, donde los elementos vasculares son deformados y colapsados durante su formación, de tal manera que la modificación de la pared celular es un requisito importante para el establecimiento de los nematodos endoparásitos sedentarios, dichas alteraciones también sirven para incrementar la superficie de la membrana plasmática, con la finalidad de incrementar el transporte de solutos necesarios para la alimentación del nematodo (Hussey and Grundler, 1998). También se conoce que con excepción de los nematodos que se enquistan, la endodermis del cilindro vascular de la raíz no es atravesada por muchos nematodos endoparásitos, a causa de la lignificación (Wuyts *et al.*, 2006). Dado que los nematodos agalladores establecen sus sitios permanentes de alimentación dentro del cilindro vascular, estructura en la que ocurre un engrosamiento importante de la pared celular secundaria y abundante lignificación, es posible que la infección y reproducción de los nematodos agalladores sea afectada por cambios en el contenido y composición de la lignina.

De igual forma, la inducción de la biosíntesis de lignina se ha asociado frecuentemente con la respuesta a heridas o con otros mecanismos de defensa durante las relaciones planta-patógeno, además se ha observado que enzimas de la vía biosintética de los fenilpropanoides son inducidas en plantas después de la infección por nematodos (Edens *et al.*, 1995; Balbridge *et al.*, 1998); por consiguiente, la lignina podría desempeñar una importante función durante el establecimiento del sitio especializado de alimentación.

La ruta fenilpropanoide frecuentemente se asocia a importantes mecanismos de defensa de la planta contra la infección por nematodos. Uehara *et al.* (2010) encontró que los niveles de transcritos del gen *PAL* se incrementaron a los 3 días después de la inoculación con el nematodo endoparásito sedentario y formador de quistes *Globodera rostochiensis* en plantas

de tomate resistentes, tal información revela la importancia de *PAL* durante la interacción planta-nematodo.

La ausencia o la reducción de la actividad de *PAL*, clave en la ruta de síntesis de fenilpropanoides, así como la disminución de otros metabolitos producidos a través de esta ruta, podría ser un prerrequisito para el desarrollo de los sitios especializados de alimentación puesto que los fenilpropanoides tienen un importante papel en la defensa de plantas contra fitopatógenos y el ambiente (Goddijn, *et al.*, 1993).

Vaganan *et al.* (2014), señalan que la infección del plátano por el nematodo endoparásito migratorio *P. coffeae*, incrementó fuertemente la actividad de las enzimas *PAL* y *CAD* relacionadas con el proceso de lignificación, en raíces de bananos resistentes a nematodos, en comparación con las raíces de los cultivares susceptibles. Además de que las paredes celulares lignificadas constituyen barreras físicas potenciales para la migración y la alimentación del nematodo, éstas pueden limitar el acceso a los polisacáridos de la pared celular por las enzimas secretadas por el nematodo (Wuyts *et al.*, 2006).

Análisis químicos cuantitativos e histológicos realizados en plátano, mostraron que la inducción de la lignificación en materiales tanto resistentes como susceptibles a la infección por el nematodo *Radopholus similis* constituye un primer mecanismo general de defensa para proteger a los haces vasculares de la infección y/o daño; sin embargo, la ruta de los fenilpropanoides podría también redirigirse hacia la síntesis de otros compuestos relacionados con defensa, como los ácidos hidroxicinámicos unidos covalentemente a los polisacáridos de la pared celular para constituir una segunda barrera física (y química) para la alimentación y migración de los nematodos en el cortex de las raíces (Wuyts *et al.*, 2007). Durante el proceso de infección, los nematodos fitoparásitos secretan enzimas degradadoras de paredes celulares, como celulasas, pectatoliasas y poligalacturonasas, por lo que, la presencia de ácidos ferúlicos unidos a las paredes celulares, puede dificultar la actividad de éstas enzimas; por otro lado, ensayos *in vitro*, indicaron que el ácido ferúlico inhibe la movilidad de *R. similis* (Wuyts *et al.*, 2007), por lo que tal compuesto puede funcionar como barrera física y química contra la infección por nematodos.

Por otro lado, Quentin *et al.*, (2009) encontraron que en plantas de *A. thaliana* cuyo nivel de lignina S se redujo significativamente debido al bloqueo de la actividad de la enzima COMT, el desarrollo de *M. incognita* y su ciclo de vida fueron similares al observado en las plantas testigo en las que no se bloqueó dicha enzima, aunque se sabe que este nematodo agallador dispara la activación transcripcional de *COMT1*, el bloqueo de este gen no afectó la formación de agallas ni el desarrollo del nematodo. Aunque en este caso las diferencias en el contenido de los monómeros de lignina (G o S) en los tejidos, no influyó en la infección y ciclo de vida del nematodo en *A. thaliana*, no se puede excluir la posibilidad de que la actividad de la enzima COMT puedan determinar el tipo de interacción (compatibilidad o incompatibilidad) en otras especies de plantas (Pegard *et al.*, 2005).

Métodos de estudio de la lignina

Existe gran cantidad de métodos para el estudio de las ligninas, algunos orientados a la detección de su presencia y localización, mientras que otros a la determinación cuantitativa, estructura y composición (Stephen y Carlton, 1992).

Pruebas histoquímicas y citoquímicas para la detección de las ligninas. La presencia de gran cantidad de grupos funcionales en la lignina las vuelven capaces de reaccionar con diversos reactivos químicos para dar lugar a un amplio espectro de reacciones de color, que han sido utilizadas para estudios de detección cito e histoquímica. Entre las pruebas histoquímicas más comúnmente utilizadas está la reacción con azul de toluidina, el ensayo de Wiesner (específico para grupos cinamaldehído) y la reacción de Mäule (específica para grupos siringil y guaiacil) (Stephen y Carlton, 1992; Anterola y Lewis 2002). Otra característica importante de las ligninas que ha sido utilizada para poder detectar su presencia en los distintos tejidos vegetales, es su autofluorescencia en color azul cuando se iluminan con luz de 330-380 nm (Stephen y Carlton, 1992).

Métodos degradativos y analíticos para el estudio de las ligninas. La extracción con bromuro de acetilo, desarrollado por Johnson *et al.* (1961), permite la detección de lignina

total en pequeñas muestras de paredes (3-6 mg) de forma rápida y fácil. Sin embargo, este método presenta algunos problemas ya que el bromuro de acetilo degrada los xilanos, que son polisacáridos muy abundantes en todas las plantas lignificadas, produciendo un aumento de la absorbancia en la región entre 270-280 nm, zona en la que se cuantifican las ligninas, lo que trae como resultado que el contenido de lignina sea sobrevalorado (Hatfield *et al.*, 1999; Anterola y Lewis 2002). No obstante, el método resulta bastante adecuado para el estudio rutinario de pequeñas muestras debido a su rapidez y sencillez (Hatfield *et al.*, 1999).

En los métodos degradativos como la tioacidólisis, acidólisis, oxidación con permanganato, oxidación con nitrobenceno e hidrogenólisis, se lleva a cabo la despolimerización de la lignina a fenoles de bajo peso molecular, para de esta manera conocer la estructura y composición de los polímeros originales (Lapierre *et al.*, 1995). Tales métodos se basan en la ruptura de los enlaces más lábiles entre las subunidades que integran al polímero. La unión entre las subunidades de la lignina se hace mediante enlaces β -O-4, que son numerosos y bastante lábiles, y enlaces carbono-carbono (C-C) que son fuertes y estables (Stephen y Carlton, 1992).

La oxidación con nitrobenceno y óxido cúprico en medio alcalino son de los métodos más usados, siendo la oxidación con nitrobenceno bastante efectiva; sin embargo, todas las oxidaciones alcalinas tienen el problema de acortar las cadenas laterales de las ligninas, y algunas veces no proporcionan información sobre los grupos funcionales, ni sobre el tipo de enlace entre subunidades. Además, con muestras suberizadas, es decir que han formado corteza o corcho, existe un alto riesgo de interferencia entre las ligninas y otros fenoles de la pared que derivan en productos similares (Anterola y Lewis 2002).

El método de la acidólisis aporta mayor cantidad de información y menos interferencias, pues mantiene los esqueletos C6C3, pero, algunas veces el método desencadena algunas reacciones secundarias que podrían dificultar su análisis. Tales problemas no se presentan con la tioacidólisis, que consiste en una despolimerización ácida que actúa mediante la escisión de los enlaces β -O-4 y combina la acción de un ácido fuerte [trifluoruro de boro eterato (BF₃)] y un nucleófilo [etanotiol (EtSH)], de tal forma que se degrada la lignina a estructuras que mantienen las características de las cadenas originales, haciendo posible la identificación y

cuantificación de los diferentes monómeros, permitiendo además obtener gran cantidad de información sobre los grupos funcionales y la estructura de las ligninas (Stephen y Carlton, 1992; Anterola y Lewis 2002). La tioacidólisis solubiliza sólo la fracción de lignina no condensada, localizada principalmente en las paredes celulares secundarias (Anterola y Lewis 2002). Las condiciones de la solvólisis son suaves, lo que permite la ruptura selectiva de los enlaces éter aril-alkil haciendo posible, mediante el análisis de los productos de degradación de la tioacidólisis, la identificación y estimación del porcentaje de monómeros de lignina unidos por los enlaces β -O-4 (Lapierre *et al.*, 1995).

Modificaciones en la síntesis y acumulación de lignina para la formación de sitios especializados de alimentación (SEA)

Los SEA constituyen la única fuente de alimentación para los nematodos endoparásitos sedentarios y resultan esenciales para su crecimiento y reproducción, por ello los nematodos, a través de la inducción de cambios extensivos en la expresión de genes, deben inducir complejos cambios en la morfología, metabolismo y fisiología de las células hospedantes para su conformación. Los SEA se localizan en el cilindro vascular, asegurando el contacto necesario con el xilema y floema para proveer al SEA de nutrientes, por lo tanto, alteraciones en la morfología, grosor y composición de la PC son un requisito necesario para la formación y mantenimiento del SEA y por consiguiente para el establecimiento exitoso de los nematodos endoparásitos sedentarios (Mitchum *et al.*, 2013).

Los efectores, sintetizados en las glándulas esofágicas del nematodo y secretados a través de su estilete inducen la des-diferenciación y re-diferenciación de las células de la raíz en SEA, sin embargo la identificación de estas secreciones es limitada (Mitchum *et al.*, 2013). Se sabe que de las tres glándulas esofágicas, las dos subventrales tienen mayor actividad durante la invasión de la raíz y la migración de los nematodos en etapas tempranas, mientras que la glándula dorsal incrementa su actividad durante la formación y mantenimiento del SEA, es decir, en la etapa sedentaria del nematodo (Davis *et al.*, 2008; Mitchum *et al.*, 2013).

Nematodos como *Rotylenchulus* spp., *Tylenchulus* spp., *Nacobbus* spp. y *Xiphinema* spp. también inducen la formación de SEA en las raíces de sus hospedantes, aunque han sido poco

estudiados en comparación con aquellos inducidos por los nematodos agalladores *Meloidogyne* spp. (células gigantes) y los que se enquistan como *Globodera* spp. y *Heterodera* spp. (sincitios). Ambos tipos de SEA comparten algunas características estructurales pero su ontogenia es diferente (Jones y Northcote, 1972; Rodiuc *et al.*, 2014). Los nematodos agalladores inducen la formación de las células gigantes cuando los J2 se alojan en la zona de diferenciación del cilindro vascular y cada individuo induce la diferenciación de cinco a siete células parenquimatosas en células gigantes multinucleadas (Abad *et al.*, 2009); mientras que, el sincitio es formado cuando los J2 se alojan cerca del cilindro vascular y a partir de una sola célula ocurre el ensanchamiento o dilatación progresiva de los plasmodesmos, hasta que la célula a partir de la cual se inició la formación del SEA, se fusiona con sus células vecinas por la disolución de las paredes celulares para constituir una gran masa citoplasmática multinucleada (Turner y Rowe, 2006). En ambos sitios de alimentación existe un incremento en la actividad metabólica y densidad citoplásmica, numerosas vacuolas pequeñas, proliferación de organelos, particularmente del aparato de Golgi, mitocondrias, plastidios, ribosomas y retículo endoplásmico (Rodiuc *et al.*, 2014); sin embargo, el estado multinuclear del sincitio se atribuye a la disolución de la PC, contrario a la actividad mitótica responsable de la condición multinucleada de las células gigantes, la cual se origina por divisiones nucleares sin cariocinesis (Rodiuc *et al.*, 2014).

La infección por nematodos promueve la síntesis de compuestos fenilpropanoides (Edens *et al.*, 1995; Balbridge *et al.*, 1998). La inducción de la biosíntesis de lignina ocurre como respuesta a estrés biótico y abiótico y se le considera un importante mecanismo de defensa durante la interacción planta-patógeno; si bien es cierto que en toda interacción planta-nematodo ocurrirá su inducción, también es cierto que la regulación de su síntesis variará dependiendo de si la interacción es compatible o incompatible. Para que ocurra la reestructuración de las células del hospedante durante la formación de los SEA, son esenciales cambios en la expresión de una gran cantidad de genes. Al respecto, Jammes *et al.*, (2005) realizaron un análisis global del transcriptoma de *A. thaliana* durante su interacción compatible con *M. incognita* y encontraron que el 15% de 22089 genes monitoreados desplegaron una expresión diferencial durante el desarrollo de las células gigantes. Tanto, genes involucrados en la regulación del ciclo celular, procesamiento de DNA, energía y síntesis de proteínas, como aquellos asociados al metabolismo de la pared celular que

codifican para pectato liasas, expansinas, glucosido hidroxilasas, xiloglucano endotransglucosilasa y una glucosil oxidasa, presentaron altos niveles de expresión; en el reporte no se menciona si hubo alguna modificación en genes específicamente involucrados en la biosíntesis de lignina. De los genes reprimidos destacaron dos relacionados con defensa, patatina y una proteína similar a la germina, que fueron los más fuertemente reprimidos.

Las investigaciones sobre la función de la lignina y los monolignoles que la integran, y sobre la expresión y modificación de genes que codifican para las enzimas que participan en su síntesis durante las interacciones planta-nematodo son limitadas; no obstante, se sabe que la infección por nematodos en plantas induce la actividad de las enzimas involucradas en la vía de biosíntesis de los fenilpropanoides (Edens *et al.*, 1995; Balbridge *et al.*, 1998). En plantas infectadas, la ruta de biosíntesis de lignina, la composición de monómeros que la integran, así como el ciclo de vida de los nematodos que buscan establecerse en dicho hospedante se alteran (Wuyts *et al.*, 2006).

Wuyts *et al.*, 2007 reportaron que en plantas de *Musa* infectadas con *R. similis*, la proporción de unidades S incrementó significativamente en la endodermis y haces vasculares, a diferencia de las plantas testigo en donde las unidades S en su mayoría se encontraban acumuladas en la endodermis, por lo que la presencia del nematodo no sólo podría alterar la biosíntesis de la lignina total sino también la cantidad de cada uno de los monómeros que la integran. Estos mismos investigadores señalan que en función del tipo de interacción que se establezca entre el nematodo y su hospedante, la ruta de los fenilpropanoides se podría re-direccionar hacia la síntesis de compuestos relacionados con la resistencia, siendo los ácidos hidroxicinámicos unidos covalentemente a los polisacáridos de la PC una posible segunda barrera física (y química) para la alimentación y migración de los nematodos en el cortex de las raíces. Dada la importancia fisiológica de los productos de la ruta de los fenilpropanoides, ésta puede ser inducida en los dos tipos de interacciones con nematodos endoparásitos sedentarios, por un lado en las compatibles para la formación de los monómeros específicos para la biosíntesis de un tipo de lignina, que favorezca la conformación de un SEA funcional; mientras que en las incompatibles para la síntesis de una lignina que funcione como barrera física de defensa y de metabolitos con propiedades antimicrobianas como los ácidos fenólicos y las fitoalexinas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del experimento.

Se estableció un experimento que se repitió tres veces, la primera repetición se condujo en una cámara de crecimiento a 23°C de temperatura, un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, mientras que el segundo y tercero se establecieron en una cámara de crecimiento a 26°C, con un fotoperiodo de 14 h luz y 10 h de oscuridad. En los tres experimentos se tuvieron los siguientes tratamientos: 1) plantas de CM334 inoculadas con *N. aberrans*, 2) plantas de CM334 inoculadas con *M. incognita*, y 3) plantas de CM334 sin inocular (testigo). En el primer experimento se establecieron 210 plantas, de las cuales 70 se inocularon con *N. aberrans*, 70 con *M. incognita* y 70 no inoculadas. A los 2, 7, 14 y 21 días después de la inoculación (ddi) se tomaron 15, 15, 10 y 10 plantas/tratamiento/tiempo para evaluar la expresión génica, actividad enzimática y cuantificación de fenoles; adicionalmente en cada tiempo se tomaron cinco plantas para evaluar penetración e infección de raíces por el nematodo. En la segunda y tercer réplica del experimento, además de las 210 plantas, se establecieron 234 plantas extra, de las cuales 78 se inocularon con *N. aberrans*, 78 con *M. incognita* y 78 como testigo (sin inocular), y a los 2, 7, 14 y 21 ddi se tomaron 23, 19, 18 y 18 plantas/tratamiento/tiempo para realizar la extracción de paredes celulares y determinar el contenido de lignina total y monolignoles.

Producción de plantas de chile CM334

Semillas de chile CM334 se desinfectaron con hipoclorito de sodio (1%) durante 3 min, se enjuagaron con agua destilada estéril y se germinaron a 28±1°C en cajas Petri estériles conteniendo papel absorbente humedecido con agua destilada estéril. Las semillas germinadas se transfirieron a macetas de plástico con 25 cc de arena de río estéril y se mantuvieron en cámara de crecimiento a 28±1°C, con un fotoperiodo de 14 h a una intensidad luminosa de 6768 lux y 10 h oscuridad. Se realizaron riegos cada 24 h con agua estéril, fertilizando una

vez por semana con una solución nutritiva (3.15 g de Nitrofoska 12-12-12 por litro de agua estéril).

Obtención de inóculo de *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita* e inoculación

Se extrajeron masas de huevecillos de los nematodos *N. aberrans* y *M. incognita* de plantas de le chile y jitomate, respectivamente según Vrain (1977). Los huevecillos se incubaron a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ en cajas Petri con agua destilada estéril para obtener juveniles del segundo estadio (J2). Plantas de chile CM334 en etapa de 4-6 hojas verdaderas, se inocularon con 1000 J2 de *N. aberrans* o *M. incognita* por planta en la base del tallo. El testigo consistió en plantas sin inocular. A los 2, 7, 14 y 21 días después de la inoculación (ddi), se colectaron las raíces, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para su análisis posterior.

Evaluación de la penetración e infección en raíces por nematodos

Para monitorear la penetración e infección en las raíces de chile CM334, por los nematodos *M. incognita* o *N. aberrans*, las raíces de chile se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio durante 3 min, se enjuagaron en agua corriente hasta eliminar el exceso de hipoclorito y posteriormente se sumergieron en fucsina ácida. Las raíces se enjuagaron en agua corriente y se mantuvieron en glicerol hasta su montaje y observación en un microscopio óptico (Bybd *et al.*, 1983).

Expresión de *C4H* y *COMT*

Diseño de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos de los genes *C4H* y *COMT* se diseñaron a partir de secuencias completas de RNA de dichos genes en *C. annuum* L. reportadas en el GeneBank del NCBI (AF212318.1 y AF212316.1, respectivamente), utilizando los programas PRIMER 3, Oligo Analyzer 3.1., DNASTAR ® y PCR Virtual (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica de los genes *C4H* y *COMT*.

Gen	Número de acceso ^z	Secuencia de nucleótidos (5'→3')	Tamaño del producto de PCR (pb)
<i>GAPDH</i>	AJ246011	GGCCTTATGACTACAGTTCACTCC GATCAACCACAGAGACATCCACAG	217
<i>C4H</i>	AF212318.1	CACCCTCACATCCAACAGAA GGCAACTCCTCCTACCAACA	370
<i>COMT</i>	AF212316.1	TGTTGATGTTGGTGGTGGAA TGGGGTCTCTGGAAGTATGC	301

^z NCBI (National Center for Biotechnology Information); GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; C4H: ácido cinámico 4-hidroxilasa; COMT: ácido cafeico O-metiltransferasa.

Extracción de RNA total y síntesis de DNA complementario. El RNA total se extrajo a partir de 0.5 g de tejido de raíces congeladas de chile CM334 usando el Kit RNeasy® de QIAGEN de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad e integridad del RNA se verificó por espectrofotometría (ND-1000, Nanodrop Technologies) y electroforesis en gel de agarosa desnaturizante (1.2%).

La síntesis de DNA complementario (cDNA), se realizó a partir del RNA total, mediante retrotranscripción, para lo cual se incubó el RNA total en una primera mezcla de reacción (2 µg de RNA total, 1.0 µL de oligo dT₁₂₋₁₈-Promega®), aforado a un volumen de 12 µL con agua libre de RNAsas y DNAsas) a 70°C por 10 min, para consecutivamente agregar una segunda mezcla de reacción (6 µL de amortiguador 10x para retrotranscripción, 1 µL dNTP mix (10 mM) y 1 µL de M-MLV Reverse transcriptase-Promega®) e incubar durante 60 min a 37 °C y 10 min a 70°C. El cDNA obtenido se almacenó a 4°C para su posterior análisis.

PCR en tiempo real. La acumulación de transcritos de los genes *C4H* y *COMT* se determinó mediante PCR cuantitativa en raíces de plantas de chile CM332 inoculadas y no inoculadas. La mezcla de reacción de PCR en tiempo real consistió en buffer 10X para PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 0.4 μM de cada oligonucleótido, 0.2 mM de dNTP's, 1:75000 SYBR® Green (Molecular Probe, Eugene, OR), 10 nM de fluorosceína (referencia pasiva), 1 μL de cDNA, 0.125 uL de Amplicasa (Biotecmol®), y 2 μL de cDNA aforado a un volumen de 25 μL con agua libre de RNAsas y DNAsas. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 94 °C/4 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C/30 s, 60 °C/30 s y 72 °C/30 s de extensión. Los datos se colectaron en la última etapa y para descartar la formación de productos inespecíficos se incluyó una curva de disociación. El cálculo de la expresión relativa de cada gen se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) usando el gen de gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GAPDH) como gen de expresión constitutiva para normalizar la expresión; los niveles de transcritos del gen de interés se expresaron en “veces” en respuesta al tratamiento y en relación a los niveles basales de los transcritos en el tratamiento testigo.

Actividad enzimática del ácido cinámico 4-hidroxilasa (C4H)

La actividad enzimática C4H se determinó según Lamb y Rubery (1975). Para esto, 0.2 g de tejido fresco se homogeneizó en 2ml de buffer de fosfato de potasio 200 mM, pH 7.5 conteniendo 2mM de 2-mercaptoetanol, el homogeneizado se centrifugó a 10,000 g durante 15 min a 4°C y se determinó el contenido de proteínas mediante el ensayo BioRad siguiendo las indicaciones del fabricante. La curva estándar se obtuvo a partir de diferentes concentraciones de albúmina. Para la determinación de la actividad enzimática se tomó el equivalente a 100 μg de proteína y se mezcló con 4.8 ml de buffer de reacción (50 mM buffer de fosfato conteniendo 2 mM 2-mercaptoetanol, 2 mM ácido *trans*-cinámico y 0.5 mM NADPH) y se incubó durante 30 min a 30°C. Enseguida se agregaron 150 μl de HCl para detener la reacción y se ajustó el pH a 11 con NaOH (6 M). Se midió la absorbancia de las muestras a 310 nm en un espectrómetro Perkin Elmer Lambda Bio 10; de cada muestra de raíz de chile CM334 inoculado con cualquiera de los dos nematodos o sin inocular (testigo) se realizaron tres

extracciones de proteína, de cada extracción se realizó una reacción enzimática C4H, midiendo la absorbancia de cada reacción por triplicado.

Extracción y cuantificación de fenoles solubles totales

La extracción de fenoles solubles totales se realizó siguiendo la metodología reportada por Gayoso *et al.*, (2004) con algunas modificaciones. Se pesó 0.1 g de tejido de raíz y se colocaron en tubos Pirex a los cuales se agregaron 2 ml de MeOH al 80% y se incubó durante toda la noche a 4°C. El contenido del tubo se mezcló empleando un vortex y se incubó en baño maría a 80°C durante 15 min y se recuperó el sobrenadante. El contenido de fenoles se determinó utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu de acuerdo al método reportado por Singleton y Rossi (1965), para ello se utilizó una curva estándar obtenida previamente con diferentes concentraciones de ácido ferúlico. La cantidad de fenoles solubles totales se determinó en un espectrómetro Perkin Elmer Lambda Bio10 a 760 nm. Se realizó la extracción de fenoles de cada muestra de raíz por triplicado y cada dato correspondió al promedio de tres lecturas realizadas en el espectrómetro.

Contenido de lignina y de monolignoles

Obtención de paredes celulares. La cuantificación de lignina total y de los monómeros de lignina (H, G y S) mediante tioacidólisis se realizó a partir de paredes celulares, las cuales se extrajeron según el método descrito por Pomar *et al.*, (2002). Raíces completas de las plantas de Chile CM334/tratamiento/tiempo se maceraron en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido, el polvo obtenido se mezcló con 3 ml de agua destilada, se colectó en un tubo para centrífuga y se centrifugó a 1000xg (gravidades) durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó tres veces con Tritón X-100 al 1% agitando con ayuda del vortex y centrifugando a 1000xg durante 10 min en cada lavado. El precipitado se volvió a lavar tres veces con agua destilada bajo las mismas condiciones de agitación y centrifugación para eliminar el detergente; finalmente se hicieron tres lavados con etanol absoluto en las mismas condiciones de los lavados anteriores. El precipitado conteniendo las paredes celulares se filtró

al vacío sobre un disco de celulosa, empleando un sistema de filtración Millipore®; a continuación se hizo pasar éter dietílico a través del sistema de filtrado para lavar las paredes y facilitar su secado. Finalmente, las paredes celulares se colocaron en una estufa a 50°C por 2 h y se almacenaron en tubos tipo Falcon de 50 ml a temperatura ambiente para su posterior análisis.

Cuantificación de lignina total. Se utilizó el método del bromuro de acetilo descrito por Iiyama y Wallis (1988). Se colocaron 10 mg de paredes celulares en tubos de vidrio Pyrex y se agregaron 87 µl de bromuro de acetilo y 413 µl de ácido acético. La mezcla se incubó en baño maría a 70°C durante 30 min, transcurrido ese tiempo se dejó enfriar la mezcla y se añadió 1 ml de NaOH 2N, enseguida se enrasaron a 10 ml con ácido acético. Las muestras se dejaron reposar para que se sedimentaran partículas que pudieran haber quedado en suspensión y se midió la absorbancia en un espectrómetro Perkin Elmer Lambda Bio 10 a 290 nm frente a un blanco, el cual consistió en la mezcla de todos los reactivos sin paredes celulares. La cuantificación de lignina de cada muestra se hizo por triplicado y cada medición resultó del promedio de tres lecturas realizadas en el espectrofotómetro. El cálculo del contenido de ligninas se realizó con la siguiente fórmula utilizando el factor de absortividad de 20.091 g⁻¹cm⁻¹ según la estimación de Iiyama y Wallis (1988):

$$\text{Lignina (\%)} = \frac{100(A_m - A_b)V}{aW}$$

Donde:

A_m= Absorbancia de la muestra

A_b=Absorbancia del blanco

V= Volumen de la solución (l)

a= Absortividad estándar de la lignina (l g⁻¹cm⁻¹)

W= Peso de la muestra (g)

Identificación y cuantificación de monómeros de lignina. Para identificar y cuantificar los monómeros que integran la lignina contenida en las paredes celulares de las muestras de raíz de Chile CM334, éstas se sometieron a tioacidólisis, la cual se realizó según Pomar *et al.*, (2002). Para ello se pesaron 10 mg de paredes celulares y se colocaron en un tubo de vidrio Pirex con tapón de teflón, se mezclaron con 1 ml de etanotiol, 8.75 ml de dioxano, 250 µl de BF₃ (trifluoruro de boro eterato) 0,2 M y se incubaron a baño maría a 100 °C durante 4 h, agitando suavemente cada media hora. Transcurridas las 4 h, se añadieron 3 mL de agua destilada con el fin de detener la reacción y enfriar la mezcla. A continuación se ajustó el pH de la mezcla a un valor entre 3.0 y 4.0 con carbonato de sodio (0.4 M).

Una vez ajustado el pH, se realizaron tres extracciones con 30 mL de diclorometano, empleando un embudo de decantación, recuperando la fase orgánica y descartando la acuosa, para eliminar el agua arrastrada al diclorometano obtenido se añadió sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄) hasta observar la solución translúcida. A continuación, se procedió a la evaporación del diclorometano hasta sequedad en un rotavapor (Büchi) a 40 °C.

Finalmente el residuo obtenido se disolvió en 0.5 mL de diclorometano y 10 µL de la solución se mezclaron con 100 µL de BSTFA (N,O-bis (trimetilsilil) trifloroacetamida) y 10 µL de piridina (grado GC), para obtener los derivados de trimetil-sililo.

Para el análisis de las muestras procesadas, se utilizó un cromatógrafo Thermo Finnigan, Trace GC, equipado con una columna DB-XXLB, J&W, de 60 m x 0,25 mm de diámetro interno, usando helio como gas portador a un flujo constante de 1 ml·min⁻¹. El programa de temperatura fue desde 90° C hasta 270 °C, a una velocidad de 5 °C min⁻¹. El cromatógrafo se acopló a un detector de masas Thermo Finnigan, Polaris Q, que trabajó con una intensidad de impacto electrónico de 70 eV. Cada muestra de la segunda y tercera repetición se procesó y analizó una sola vez.

Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos en los ensayos de penetración e infección en raíces por nematodos, expresión génica, actividad enzimática, cuantificación de fenoles solubles totales y cuantificación de lignina total, se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a un

análisis de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) mediante el programa estadístico SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

4. RESULTADOS

Infección de raíces de chile CM334 por los nematodos *N. aberrans* y *M. incognita*

En los tres experimentos establecidos, la cantidad de individuos de *N. aberrans* (*Na*) que ingresaron a la raíz de chile CM334 fue significativamente mayor que la de individuos de *M. incognita* (*Mi*) (Fig. 3A y 4A). La infección en raíces de plantas de chile CM334 inoculadas con *Na* mostró una tendencia muy similar en los tres experimentos, desde los 2 ddi se encontraron nematodos dentro de la raíz (Fig. 5A); sin embargo, la mayor cantidad del estadio J2 de *Na* dentro de las raíces de chile se registró a los 7 ddi y se observaron agrupados en la región de elongación (Fig. 5B). En los tiempos posteriores de evaluación (14 y 21 ddi), el número de individuos dentro de la raíz disminuyó, generalmente se encontraron dispuestos de forma individual a lo largo de la raíz cerca de la corteza y con la típica postura en forma de “C” o de espiral característica del estadio J3 (Fig. 5C y D). A los 40 ddi se observó un agallamiento bien definido y la presencia de hembras adultas y masas de huevecillos del nematodo *Na* (Fig. 6).

En contraste a lo observado en plantas inoculadas con *Na*, en las raíces de chile CM334 inoculadas con *Mi* no se observó la penetración de nematodos en el primer experimento (Fig. 3A); mientras que, en el 2do y 3er experimento (Fig. 4A), en todos los tiempos evaluados se detectaron muy pocos nematodos (en promedio 2, 5, 3 y 1 individuos por raíz, a los 2, 7, 14 y 21 ddi, respectivamente) con las características propias del estadio J2. A los 40 ddi no se observó agallamiento de raíces, ni presencia de hembras adultas o huevecillos de *Mi* en las raíces de plantas inoculadas.

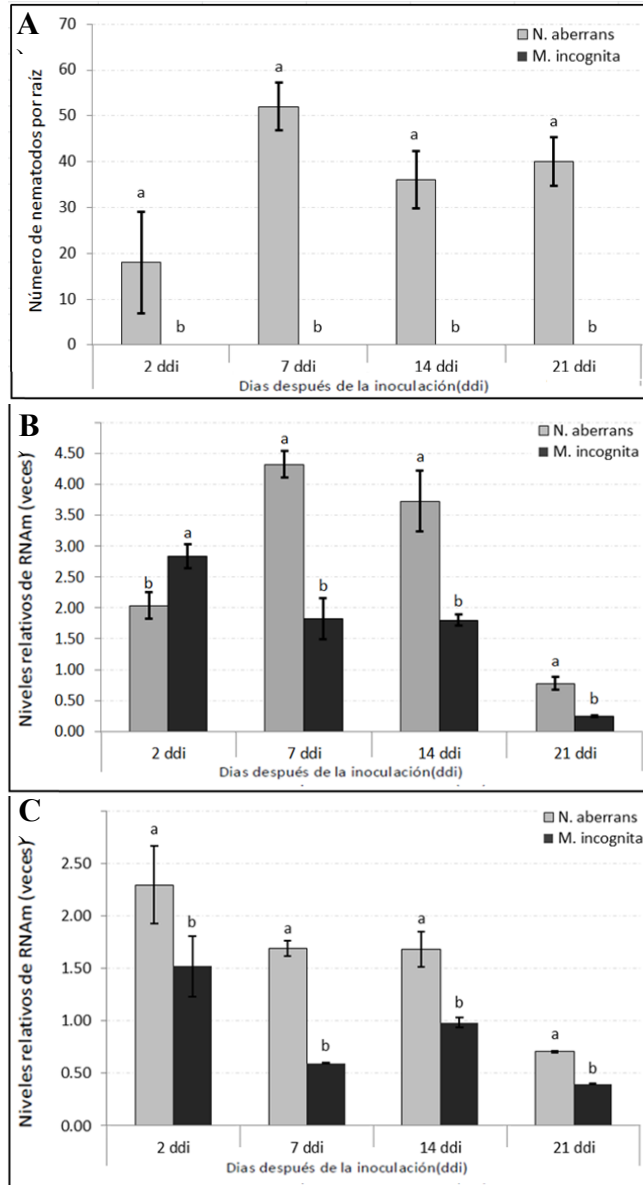


Figura 3. Número de individuos de *N. aberrans* y *M. incognita* dentro de raíces de chile CM334 inoculadas con los nematodos (A) y acumulación de transcritos de los genes *C4H* (B) y *COMT* (C) en el primer experimento. Cada barra representa el promedio de cinco raíces para el número de individuos (A) y el promedio de tres réplicas para los niveles de transcritos (B y C). La línea en cada barra corresponde a la desviación estándar. Barras con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

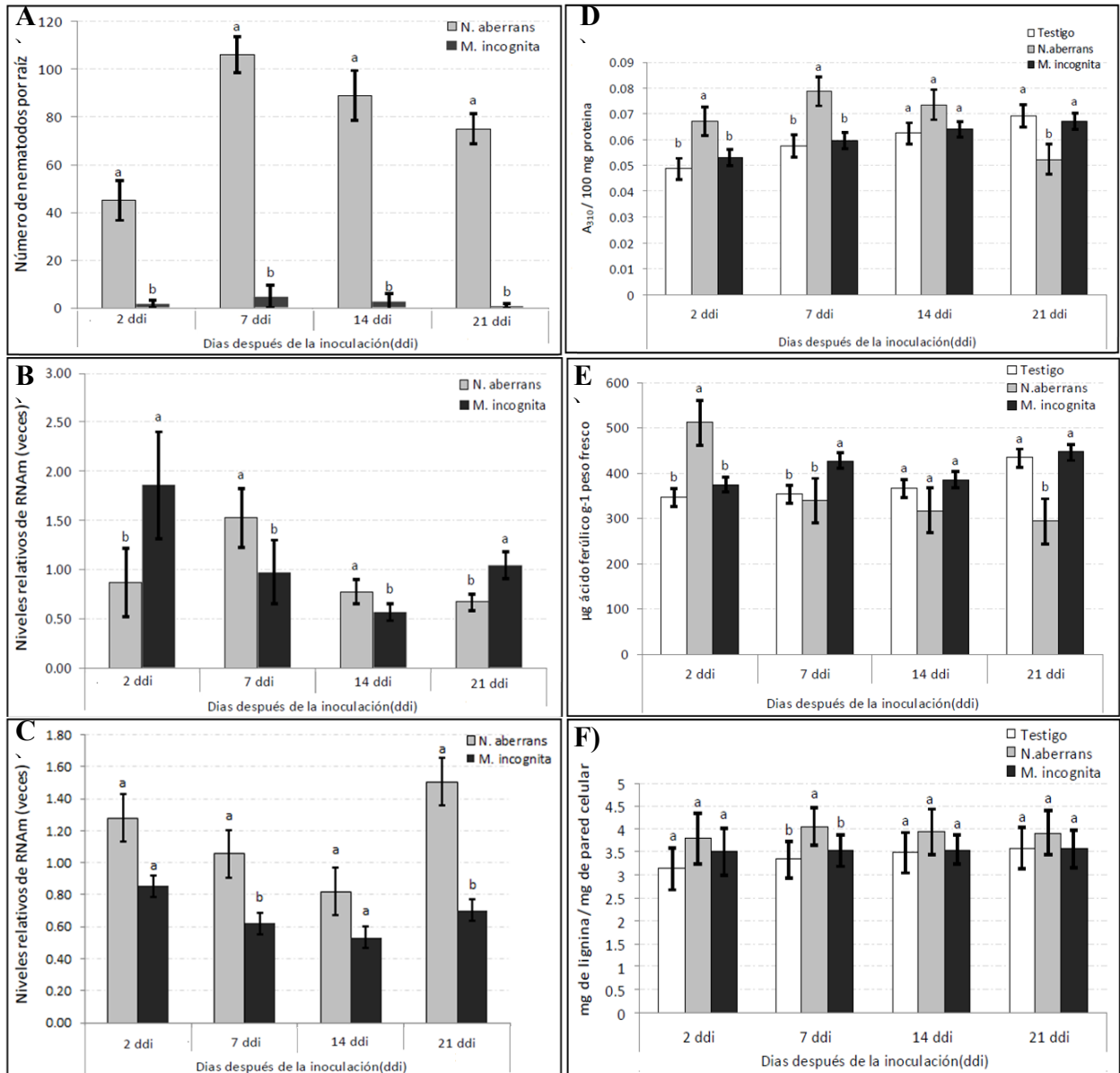


Figura 4. Número de individuos de *N. aberrans* y *M. incognita* dentro de raíces de Chile CM334 (A); acumulación de transcritos de los genes *C4H* (B) y *COMT* (C); actividad enzimática del ácido cinámico 4-hidroxilasa (D); contenido de fenoles solubles totales (E); y contenido de lignina total (F). En cada gráfica, las barras representan el promedio de los datos del segundo y tercer experimento. La línea en cada barra corresponde a la desviación estándar. Barras con letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

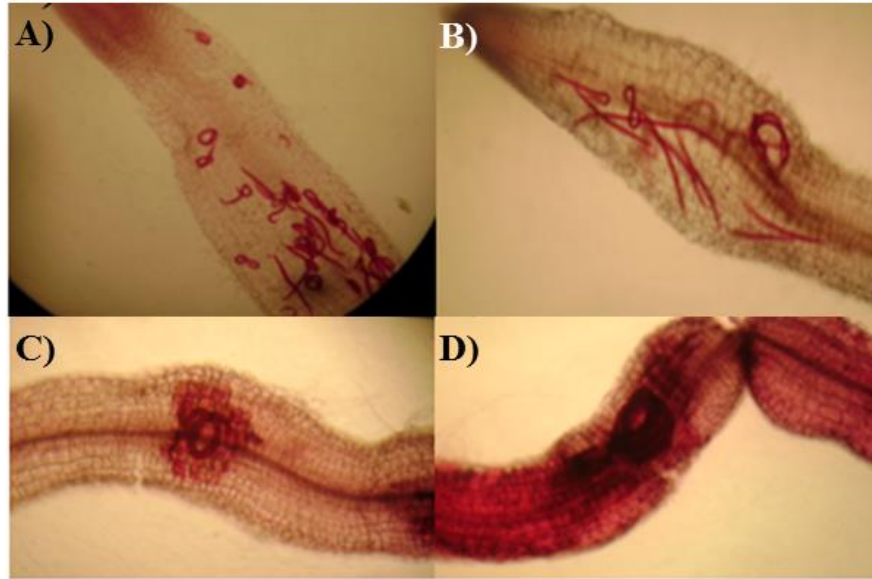


Figura 5. Penetración de *N. aberrans* en raíces de chile CM334 a los A) 2, B) 7, C) 14 y D) 21 días después de la inoculación.

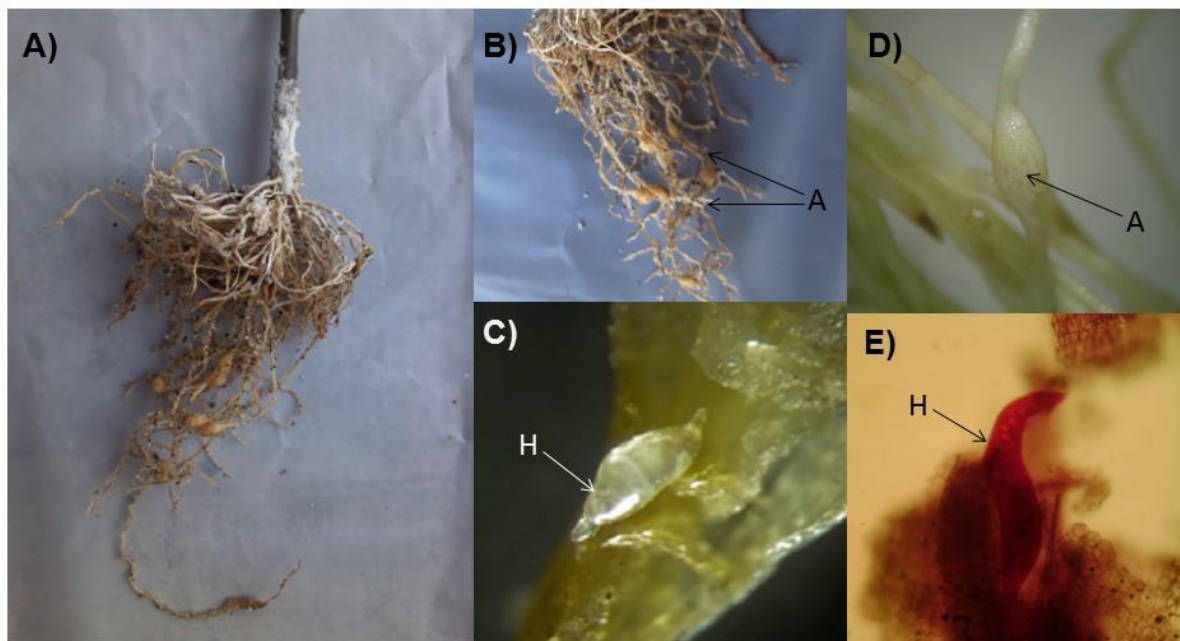


Figura 6. Agallamiento en raíces de chile CM334 inoculadas con *N. aberrans* a los 40 días después de la inoculación. A) y B) Raíz de chile CM334 con agallas a los 40 ddi, C) y D) Hembra de *N. aberrans*. A: agalla, H: hembra.

Acumulación de transcritos de los genes *C4H* y *COMT* en raíces de plantas de chile infectadas por *N. aberrans* y *M. incognita*

En todos los tiempos de evaluación, la acumulación relativa de los transcritos *C4H* y *COMT* fue mayor en las raíces de plantas de chile CM334 inoculadas con los nematodos (*Na* o *Mi*) en comparación con el testigo sin inocular. En los tres experimentos establecidos (Fig. 3B y 4B), la acumulación de los transcritos *C4H* fue significativamente mayor a los 7 y 14 ddi en la interacción compatible en comparación con la incompatible (7ddi: *Na*:1.53 y 4.32 veces, *Mi*: 0.98 y 1.82 veces; 14ddi: *Na*:0.77 y 3.72 veces, *Mi*: 0.56 y 1.80 veces), mientras que a los 2 ddi la cantidad de transcritos *C4H* fue significativamente mayor en la interacción incompatible (*Na*:0.87 y 2.04 veces; *Mi*: 1.86 y 2.83 veces). Para el último tiempo de muestreo (21ddi), en el 1er experimento la cantidad de transcritos del gen *C4H* en la interacción compatible fue significativamente mayor que en la incompatible (*Na*: 0.77 veces; *Mi*: 0.25 veces; Fig. 3B), mientras que en el 2do y 3er experimento fue significativamente menor (*Na*: 0.77 veces; *Mi*: 1.04 veces; Fig. 4B). En los tres experimentos, claramente se observó que en la interacción compatible a partir de los 7 ddi los niveles de expresión del gen *C4H* disminuyeron en los tiempos subsecuentes. En cambio en la interacción incompatible fue notorio que los mayores niveles de expresión del gen *C4H* se registraron a los 2 ddi y que en los tiempos posteriores (7 y 14 ddi) disminuyeron gradualmente.

La acumulación de transcritos del gen *COMT* (Fig. 3C y 4C), en los tres experimentos realizados, fue mayor en la interacción compatible, en comparación con la incompatible en los cuatro tiempos evaluados; en el 1er experimento, la mayor acumulación de transcritos de *COMT* ocurrió a los 2 ddi y en los tiempos posteriores disminuyó (*Na*: 2.29, 1.69, 1.67 y 0.71 veces a los 2, 7, 14 y 21 ddi, respectivamente), mientras que en el 2do y 3er experimentos la cantidad de transcritos disminuyó gradualmente en los tres primeros tiempos de muestreo (de 1.28 a 0.82 veces), pero aumentó 1.51 veces a los 21 ddi (Fig 4C). En cambio, en la interacción incompatible, la máxima expresión de *COMT* se registró a los 2 ddi (Fig. 3C y 5C), pero en todos los casos los niveles de transcritos fueron menores en comparación con la interacción compatible y generalmente las diferencias fueron estadísticamente significativas.

Actividad de la enzima ácido cinámico 4-hidroxilasa (C4H)

En los tres primeros tiempos de muestreo, la actividad enzimática de C4H fue mayor en la interacción compatible (17 a 37% de incremento) en comparación con aquellas del testigo, mientras que la actividad en la incompatible fue muy parecida a la del testigo (Fig. 4D); la máxima actividad enzimática de C4H se registró a los 7ddi en raíces inoculadas con *Na* ($A_{310}=0.078/100$ mg de proteína) y en los tiempos posteriores de muestreo disminuyó paulatinamente (Fig. 4D). Así, a los 21 ddi, la actividad enzimática disminuyó significativamente en la interacción compatible con respecto al testigo (24%) y al tratamiento con *Mi* (22%).

Fenoles solubles totales

A los 2 ddi el contenido de fenoles solubles totales en raíces de plantas de chile CM334 inoculadas con *Na*, fue significativamente mayor en comparación con la interacción incompatible (36%) y con el testigo (47%) (Fig. 4E). A los 7, 14 y 21 ddi el patrón se invirtió y en raíces de plantas de chile CM334 inoculadas con *Mi* se registraron los valores más altos (de 3 a 20% de incremento con respecto al testigo), mientras que en las inoculadas con *Na* disminuyeron de 3 a 32% con respecto al testigo.

Contenido de lignina total

Aunque generalmente no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en el contenido de lignina total (Fig. 4F), fue evidente que en las paredes celulares de raíces de plantas inoculadas con *Na* (interacción compatible) siempre se registró un mayor contenido en comparación con *Mi* (de 8 a 14% más) y el testigo (de 8 a 21% más). En paredes celulares de raíces de plantas inoculadas con *Na*, el mayor contenido de lignina

total se obtuvo a los 7ddi (4.053 mg de lignina/mg de pared celular). Los contenidos de lignina en plantas inoculadas con *Mi* y el testigo fueron muy similares en todos los tiempos.

Identificación y cuantificación de monómeros de lignina (tioacidólisis)

En todos los tiempos evaluados, los contenidos de los monómeros G y S siempre fueron mayores en la interacción compatible, en comparación con las plantas testigo y las del tratamiento *Mi* (Fig. 7A y B). El incremento de G fue de 19 a 100%, con respecto al testigo, y de 14 a 42%, con respecto a *Mi* y el de S fue de 35 a 67% y de 25 a 59%, respectivamente. En la interacción compatible, los mayores contenidos de G se registraron a los 7 y 14 ddi y los de S a los 7 y 21ddi.

Los mayores contenidos de H se obtuvieron a los 2 ddi en los tratamientos testigo y *Na* y con el curso del tiempo disminuyeron hasta en 68 y 32%, respectivamente, en comparación con el contenido inicial. En cambio en las plantas inoculadas con *Mi* el contenido de H fue 77% más bajo que *Na* y el testigo a los 2 ddi y a los 21 ddi se incrementó hasta 395% con respecto a su contenido inicial (Fig. 7C).

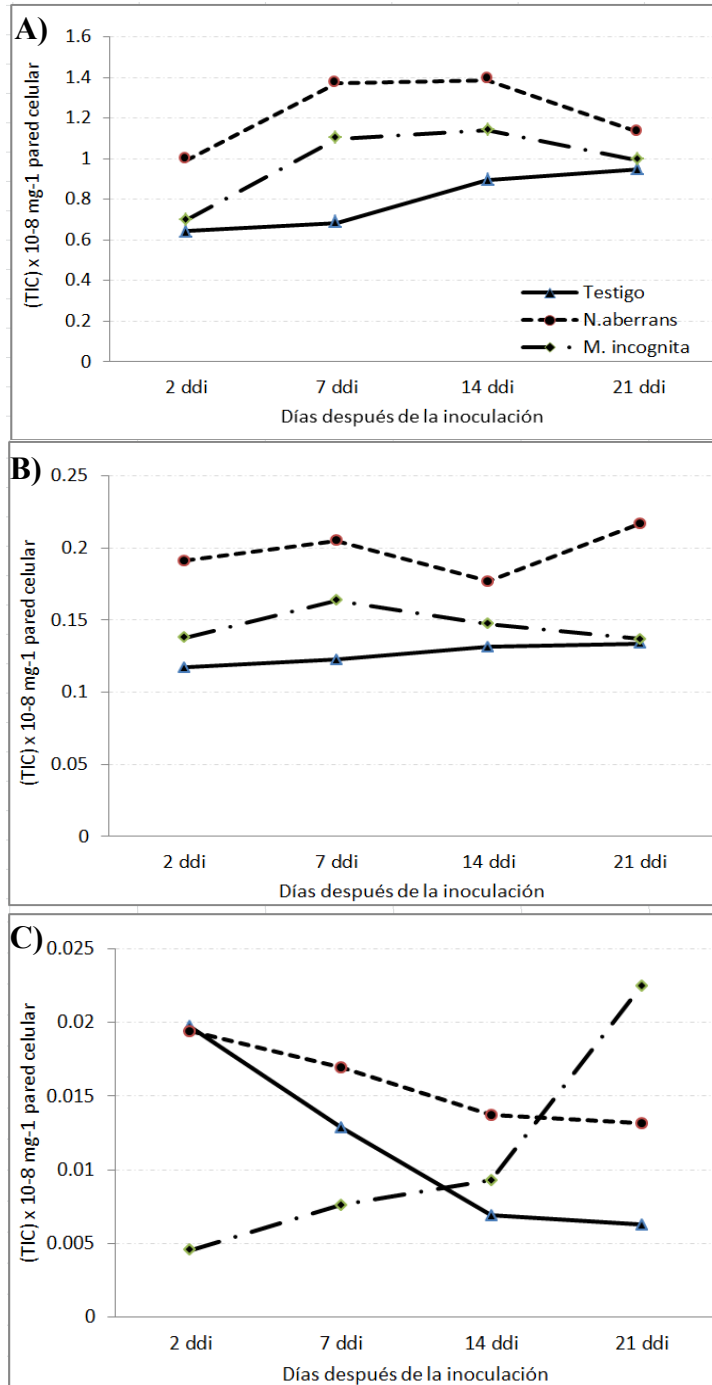


Figura 7. Contenido de los monómeros A) guayacil (G), B) siringil (S) y C) *p*-hidroxifenil (H) en paredes celulares de raíces de plantas chile M334 inoculadas con los nematodos *N. aberrans* o *M. incognita*. El valor de cada punto en las gráficas corresponde al promedio del segundo y tercer experimentos.

5. DISCUSIÓN

Los nematodos endoparásitos sedentarios formadores de SEA han desarrollado sofisticadas estrategias para la formación de dichos sitios altamente metabólicos, pues ellos los proveerán de los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo. La lignina es un polímero importante que además de fortificar las paredes celulares, constituye una barrera física potencial para los fitopatógenos. Dado que la biosíntesis, deposición y composición de la lignina, podrían alterar el ciclo de vida de los nematodos, es de primordial importancia conocer las modificaciones que ocurren dependiendo de si la interacción planta-nematodo es compatible o incompatible.

En la presente investigación, la mayor penetración de nematodos se registró en la interacción compatible (Fig. 3 y 4). La cantidad de individuos *Na* que ingresaron a la raíz fue mayor que la de individuos de *Mi*; a los 7 ddi se encontró la mayor cantidad de J2 de *Na* dentro de las raíces de chile, mientras que en tiempos posteriores (14 y 21 ddi) la cantidad de individuos disminuyó; la infección y desarrollo de *Na* en raíces de chile CM334 fue similar a la reportada por Godínez-Vidal (2010), García-Espinoza (2011) y Villar-Luna (2014). Respecto a la capacidad infectiva de *Mi*, sólo se observó la penetración de algunos individuos en el 2do y 3er experimento, dichos individuos correspondieron en todo momento al estado J2; los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por García-Espinoza (2011) y Pegard *et al.* (2005). Las divergencias en la penetración de raíces por *Mi* en el 2do y 3er experimento en comparación con el primero, podría deberse a que éste se estableció en otra cámara de crecimiento donde la temperatura (23°C) y el fotoperiodo (16 h luz y 8 h oscuridad) fueron diferentes. Tales diferencias, también pudieran explicar las diferencias que se observaron en el patrón de expresión de los genes entre el primero y los otros dos experimentos.

La existencia de múltiples isoformas de los genes involucrados en la ruta de biosíntesis de lignina, ha dificultado el esclarecimiento del proceso de lignificación (Bonawitz y Chapple, 2010) y por ende la identificación de los genes, cuya expresión es modificada durante la formación de los SEA, constituye un gran reto. Dicho conocimiento es necesario para dilucidar la forma en la que los nematodos provocan cambios en las células de su hospedante para inducir la formación de sus SEA. En la presente investigación, la expresión de los genes

C4H y *COMT* fue mayor en las raíces de plantas de Chile CM334 en las dos interacciones (compatible o incompatible) en comparación con las plantas testigo. En la interacción incompatible, la mayor expresión del gen *C4H* se registró a los 2 ddi (Fig. 4B), posiblemente como una respuesta rápida de defensa, dado que la enzima C4H participa en la etapa inicial de la síntesis de fenoles solubles con propiedades antimicrobianas (Xu *et al.*, 2011). El gen *C4H* constituye un importante componente en la ruta fenilpropanoide y aunque ha sido clonado en varias especies de plantas, solamente en muy pocas de ellas se han determinado las isoformas, como en *Populus tremuloides* (*PtreC4H1-4*), *P.trichocarpa* (*PtriC4H1-3*) (Li *et al.*, 2006) y en *Citrus sinensis* (*CsC4H1* y *CsC4H2*) (Betz *et al.*, 2001); por lo tanto, es posible que en la interacción incompatible la isoforma sintetizada se asoció con el metabolón que canaliza la ruta de los fenilpropanoides hacia la síntesis de metabolitos antimicrobianos (fenoles y fitoalexinas, por ejemplo) (Lee *et al.*, 2012). Puesto que el gen *C4H* también está implicado en los primeros pasos de biosíntesis de lignina, es factible especular que en el caso de la interacción compatible la isoforma sintetizada se ensambló con otras enzimas cooperantes para canalizar la ruta hacia la síntesis de metabolitos favorables para la reestructuración de las células que dan lugar a la formación de su SEA.

En general los niveles de transcritos del gen *COMT* fueron mayores en la interacción compatible en comparación con la incompatible en todos los tiempos evaluados (Fig. 4). Dicho gen está relacionado directamente con la biosíntesis del monolignol siringil (S), y por ende, la reprogramación de la expresión de este gen podría ser parte de los cambios que el nematodo induce en su hospedante para la reestructuración de la pared celular y constitución de su SEA (sincitio) en una interacción compatible. Al respecto, Ithal *et al.* (2007) reportaron que durante el desarrollo del sincitio en plantas de soya del cultivar Williams 82, susceptible al nematodo *Heterodera glycines*, se indujo la actividad de genes implicados en la vía de los fenilpropanoides, favoreciendo la síntesis de flavonoides, antocianinas, lignina y suberina, estos últimos componentes de las paredes celulares secundarias. En la interacción incompatible, la síntesis del monolignol S pudiera ser disparada como parte de la respuesta general de defensa de la planta, como lo mencionan Wuyts *et al.*, (2007), quienes encontraron que en raíces de bananos resistentes y susceptibles a *R. similis* se indujo la síntesis del monolignol S.

La actividad de la enzima C4H fue mayor en la interacción compatible a los 2, 7 y 14 ddi en comparación con la interacción incompatible; sin embargo, a los 21 ddi fue menor que la obtenida en la interacción incompatible y el testigo. Para la interacción chile-*N. aberrans* se observó cierta relación entre los niveles de expresión del gen con la actividad de la enzima (Fig. 4B y Fig. 4D); pero, esta tendencia no se presentó en la interacción incompatible. La existencia de múltiples isoformas del gen *CH4* (Betz *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006) por un lado, y por el otro, el desconocimiento que hasta ahora se tiene respecto al número de isoformas en *Capsicum annuum*, dificultan la interpretación de los resultados obtenidos, pues la actividad enzimática reportada en la presente investigación podría no corresponder a la actividad de la isoforma del gen monitoreado en los ensayos de expresión génica.

El contenido de fenoles solubles totales fue menor en la interacción compatible, excepto a los 2 ddi, en comparación con la interacción incompatible y el testigo (Fig. 4E). Este resultado era de esperarse, pues se ha documentado que la resistencia a nematodos agalladores se asocia con la acumulación de compuestos fenólicos (Pegard *et al.*, 2005). La mayor acumulación de fenoles a los 2 ddi en las plantas infectadas por *N. aberrans* es congruente con los resultados obtenidos con otros nematodos inductores de sincitio como *Heterodera* spp. y *Globodera* spp (Klink *et al.*, 2010; Matthews *et al.*, 2013). En éstos los J2 se mueven intracelularmente causando mayores alteraciones en los tejidos y en consecuencia las respuestas de defensa se expresan con mayor intensidad durante la migración (Wyss, 1992; Williamson y Hussey, 1996); sin embargo, *N. aberrans* generalmente se vuelve sésil hasta después de los 7 ddi y por consiguiente escapa a las respuestas iniciales de defensa disparadas, las cuales parecen no tener el mismo impacto nocivo como lo tienen contra las especies que se enquistan, que se vuelven sésiles alrededor de las 48 h después de penetrar en las raíces (Williamson y Hussey, 1996). En plantas de chile infectadas con *N. aberrans* el contenido de fenoles disminuyó significativamente a partir de los 7 ddi (Fig. 4E). La evidencia experimental indica que en las interacciones compatibles el nematodo interfiere con los mecanismos de defensa de la planta, como es el caso de los relacionados con la ruta de los fenilpropanoide (Edens *et al.*, 1995; Wuyts *et al.*, 2006; Godinez-Vidal *et al.*, 2008; López-Martínez *et al.*, 2010). En la interacción chile CM334-*N. aberrans* López-Martínez y colaboradores (2010) encontraron que la actividad de la enzima PAL, el contenido de fenoles solubles totales y del ácido clorogénico en particular fueron significativamente reducidos; ellos sugieren que tales efectos no solo

podrían ser consecuencia de la represión de genes, sino de mecanismos que operan a nivel post-transcripcional, o por metabolitos producidos por el nematodo o por el hospedante (estimulado por el nematodo) que interfieren con la síntesis o actividad de las enzimas o con la acumulación o toxicidad de los compuesto fenólicos.

En la presente investigación en la interacción incompatible se registró un mayor contenido de fenoles solubles totales a los 7, 14 y 21 ddi, estos resultados son congruentes con los reportados con anterioridad por Pegard *et al.* (2005), quienes asociaron la resistencia de CM334 a *M. incognita* con la presencia de barreras físicas en la raíz, con la reacción de hipersensibilidad y con la acumulación de compuestos fenólicos.

Durante el desarrollo de del sincitio ocurre el engrosamiento extensivo de las paredes celulares del mismo, y aunque la composición del nuevo material depositado no ha sido del todo caracterizado, se ha observado que el centro de las paredes corticales externas, así como en el centro de algunos fragmentos de pared celular, dentro de los sincitios, se tiñen con azul de toluidina, indicando la presencia de lignina y algunos polifenoles (Jones y Northcote, 1972), por lo que durante una interacción compatible el incremento en la síntesis y acumulación de la lignina podría destinarse a la formación de pared celular *de novo*, para ayudar a proteger y fortalecer el sincitio (Ithal *et al.*, 2007). En congruencia con lo anterior en la presente investigación el contenido de lignina total fue mayor en la interacción compatible (Fig. 4F), además la formación de la agalla inducida por *N. aberrans* que implica hiperplasia e hipertrofia de los tejidos demanda una mayor síntesis de lignina y otros polímeros de la pared celular (Jones y Northcote, 1972; Ithal *et al.*, 2007). En la interacción incompatible, el contenido de lignina total fue ligeramente más alto en comparación con el testigo, probablemente esas diferencias en el contenido de lignina total podría ser parte de la defensa de la planta contra la infección por nematodos, pues aunque la cantidad de individuos de *Mi* encontrados dentro en las raíces fue mínima, la presencia de unos pocos pudo haber sido el estímulo que indujo la síntesis de lignina en dichas planta. Se observó cierta relación entre la actividad de la enzima C4H y el contenido de lignina, sin embargo, ésta no fue directamente proporcional (Fig. 4).

El análisis del contenido de los monómeros que integran la lignina de las paredes celulares de raíces de plantas de chile CM334 reveló un mayor contenido de lignina G, en comparación

con lignina S y H (Fig. 7), lo cual es característico de las plantas angiosperma dicotiledónea, ésta tendencia en la síntesis de los diferentes monolignoles es similar a las reportadas por Pomar *et al.*, (2004) para *C. annuum*. En la interacción compatible los contenidos de G y S fueron mayores que en la incompatible y el testigo. El monolignol S, aporta una estructura más lineal, lo cual resulta en un arreglo más compacto de las cadenas de lignina en el complejo lignocelulósico, volviéndola más recalcitrante al ataque de por agentes oxidantes (Skyba *et al.*, 2013), por lo que en la interacción compatible, el nematodo *Na* podría inducir la síntesis de dicho monolignol para favorecer el fortalecimiento de las paredes celulares del SEA (sincitio). El contenido de siringil fue mayor en la interacción incompatible en relación al testigo; algunos autores señalan que la síntesis de este monolignol puede ser particularmente inducida en interacciones incompatibles (De Ascencao y Dubery 2000, Skyba *et al.*, 2013), por un lado, como parte de la respuesta general de defensa, como ocurre también en interacciones compatibles y por la resistencia, proveída por dicho monolignol a la degradación enzimática. En la presente investigación la mayor penetración de *Mi* se presentó a los 7 ddi, lo cual podría explicar que en dicho periodo de evaluación también se obtuvo el máximo contenido de S en la interacción incompatible. Los resultados muestran que la expresión del gen *COMT* y el contenido del monolignol S guardan cierta relación, pues tanto la cantidad de transcritos *COMT* como la cantidad del monolignol S, fueron mayores en la interacción compatible en comparación con la incompatible.

Dado de que síntesis del monolignol H está relacionada con mayor entrecruzamiento y resistencia de la pared celular a la degradación de los tejidos (Pomar *et al.*, 2004), se esperaba que en las raíces de chile CM334 en la relación incompatible se encontraran mayores contenidos de dicho monolignol, sin embargo ocurrió lo contrario en los tres primeros tiempos de muestreo (2, 7 y 14 ddi). La presencia de unos cuantos individuos de *Mi* en dichos tiempos aparentemente reprimió la síntesis del monolignol H y a los 21 ddi éste se incrementó de manera considerable, se desconoce si dicho monómero pueda tener otras funciones durante la interacción incompatible.

El patrón de síntesis del monolignol H en plantas inoculadas con *Na* y el testigo fue similar aunque en la interacción compatible hubo mayor síntesis de unidades H, esto por un lado pudo deberse al patrón normal de deposición de cada monolignol en el tejido de la planta, se sabe

que las unidades H son las que se depositan primero, seguidas de las G y finalmente las S (Dixon *et al.*, 2002; Bonawitz y Chapple, 2010; Santiago *et al.*, 2013) por otro lado, la invasión de juveniles de *Na* en las raíces de su hospedante se asoció con la síntesis de una mayor cantidad de unidades H en la interacción compatible, respecto al testigo.

6. CONCLUSIONES

El patrón de expresión de los genes *C4H* y *COMT*, la actividad de la enzima C4H el contenido de fenoles y lignina fueron diferentes dependiendo del tipo de interacción planta-nematodo:

La acumulación relativa de los transcritos *C4H* a los 7 y 14 ddi fue mayor en las plantas inoculadas con *N. aberrans* (interacción compatible) en comparación con las inoculadas con *M. incognita* (interacción incompatible), pero a los 2 y 21 ddi ocurrió lo opuesto; en cambio la acumulación de los transcritos *COMT* fue siempre mayor en la interacción compatible en todos los tiempos evaluados.

La actividad de la enzima C4H fue mayor en la interacción compatible en comparación con la incompatible, excepto a los 21 ddi.

El contenido de fenoles solubles totales a los 2 ddi fue mayor en la interacción compatible en comparación con la incompatible, pero a los 7, 14 y 21 ddi el patrón se invirtió.

El contenido de lignina total y de los monómeros G y S siempre fue mayor en la interacción compatible en comparación con la incompatible, mientras que el monolignol H fue mayor hasta los 14 ddi, pero no a los 21 ddi.

7. 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. and Starr J. L. 2009. Root-knot nematodes. CAB International, Wallingford, UK. pp:163-181.*
- Alcantara, T. P., and Bosland P. W. 1994. An inexpensive disease screening technique for foliar blight of chile pepper seedlings. *HortScience. 29:1182–1183.*
- Allina, S. M., Pri-Hadash A., Theilmann D. A., Ellis B. E. and Douglas C. J. 1998. 4-Coumarate: Coenzyme A ligase in hybrid poplar. Properties of native enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant enzymes. *Plant Physiology. 116:743-754.*
- Anterola, A. M. y Lewis N. G. 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry. 61:221-294.*
- Arnedo-Andrés, A. M. S., Arteaga M. L., and Ortega R. G. 2006. New inheritance studies related to Potato Virus Y (PVY) resistance in *Capsicum annum* L. “Serrano Criollo de Morelos-334”. *Euphytica. 151:95-101.*
- Atanassova, R, Favet N., Martz F., Chabbert B., Tollier M. T., Monties B., Fritig B., and Legrand M. 1995. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. *The Plant Journal. 8: 465–477.*
- Balbridge, G. D., O’Neill N. R., and Samac D. A. 1998. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: defense-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. *Plant Molecular Biology. 38: 999–1010.*
- Barthels, N., Van der Lee F. M., Klap J., Goddijn O. J. M., Karimi M., Puzio P., Grundler F. M. W., Ohl S. A., Lindesey K., Roberson L., Robertson W. M., Van Montagu M., Gheysen G., and Sijmons, P.C. 1997. Regulatory sequences of *Arabidopsis* drive reporter gene expression in nematode feeding structures. *Plant Cell. 9:2119-2134.*
- Bell, A. A. 1981. Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology. 32:21-81*

- Betz, C., McCollum T. G., Mayer R. T. 2001. Differential expression of two cinnamate 4-hydroxylase genes in ‘Valencia’ orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Molecular Biology* 46:741–748.
- Blount, J. W., Korth K. L., Masoud S. A., Rasmussen S., Lamb C., and Dixon R.A. 2000. Altering Expression of Cinnamic Acid 4-Hydroxylase in Transgenic Plants Provides Evidence for a Feedback Loop at the Entry Point into the Phenylpropanoid Pathway-*Plant Physiology* 1: 107-116.
- Boerjan, W. and Baucher M. R. 2003. Lignin Biosynthesis. *The Annual Review of Plant Biology*. 54:519-546.
- Boiteux, L. S., Cupertino F. P., Silva C., Dusi A. N., Monte-Neshich D. C., Van der Vlugt R. A., and Fonseca M. E. 1996. Resistance to potato virus Y (pathotype 1-2) in *Capsicum annuum* and *Capsicum chinense* is controlled by two independent major genes. *Euphytica*. 87:53-58.
- Bonawitz, N. D., and Chapple C. 2010. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual Review of Genetics*. 44:337-363.
- Boudet, A. M. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68:2722-2735.
- Bybd, D. W., Kirkpatrick Jr., and Baker K. R. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*. 15:142-143.
- Candela, M. E., Alcazar M. D., Espin A., Egea C., and Almela L. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*. 44:116-123.
- Candela, M. E., Ege C., García-Pérez M. D., Costa J., and Candela M. 2000. Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Horticulturae*. 522:79-86.
- Carpita, N. C. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 47:445-476.

- Chen, F., Tobimatsu Y., Havkin-Frenkel D., Dixon R. A., and Ralph J. 2012. A polymer of caffeyl alcohol in plant seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 109: 1772–1777.
- Chen, F., Tobimatsu Y., Jackson L., Nakashima, J. Ralph J., and Dixon R. A. 2013. Novel seed coat lignins in the Cactaceae: Structure, distribution and implications for the evolution of lignin diversity. *Plant Journal*. 73: 201–211.
- Cid del Prado-Vera, I. 1985. Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans* (Thorne,1935) Thorne y Allen, 1944. En: Marbán N. y Mendoza I. J. Thomason (eds.). *Fitonematología Avanzada*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México. pp. 57-65.
- Clark, S. A. 1967. The development and life history of the false root-knot nematode, *Nacobbus serendipiticus*. *Nematologica*. 13:91-101.
- Cosgrove, D. J. 1997. Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 13:171–201.
- Costa, M. A, Collins R. E., Anterola A. M., Cochrane F. C., Davin L. B., and Lewis N. G. 2003. An *in silico* assessment of gene function and organization of the phenylpropanoid pathway metabolic networks in *Arabidopsis thaliana* and limitations thereof. *Phytochemistry*. 64:1097–1112.
- Costa, M. A., Bedgar D. L., Moinuddin S. G., Kim K. W., Cardenas C. L., Cochrane F. C., Shockey J. M., Helms G. L., Amakura Y., Takahashi H., Milhollan J. K., Davin L. B., Browse J., and Lewis N. G. 2005. Characterization in vitro and in vivo of the putative multigene 4-coumarate:CoA ligase network in Arabidopsis: Syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation. *Phytochemistry*. 66:2072-2091.
- Davis, E. L., Hussey R. S., Mitchum M. G. and Baum T. J. 2008. Parasitism proteins in nematode plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 11:360-366.
- de Almeida Engler, J., Van Poucke K., Karimi M., De Groodt R., Gheysen G., and Engler G. 2004. Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. *Plant Journal*. 38:12–26.
- De Ascensao, A. R. D. C. F., and Dubery I. A. 2000. Panama disease: cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race four. *Phytopathology*. 90:1173-1180.

- Dixon, R. A., Achnine L., Kota P., Liu C. J., Reddy M. S. S., and Wang L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defense-a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*. 3:371-390.
- Dixon, R. A. y Pavia N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.
- Edens, R. M., Anand S. C., and Bolla R. I. 1995. Enzymes of the phenylpropanoid pathway in soybean infected with *Meloidogyne incognita* or *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*. 27:292-303.
- Egea, C., García D., and Candela M. E. 1996. Capsidiol accumulation on *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*. 49:762-764.
- Egea-Gilabert, C., Bilotti G., Requena M. E., Ezziyyani M., Vivo-Molina J. M., and Candela M. E. 2008. Pepper morphological traits related with resistance to *Phytophthora capsici*. *Biologia Plantarum*. 52:105-109.
- Ehlting, J., Büttner D., Wang Q., Douglas C. J., Somssich I. E., and Kombrink E. 1999. Three 4-coumarate: Coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represent two evolutionarily divergent classes in angiosperms. *The Plant Journal*. 19:9-20.
- Ehlting, J., Hamberger B., Million-Rousseau R., and Werck-Reichhart D. 2006. Cytochromes P450 in phenolic metabolism. *Phytochemistry Reviews*. 5:239-270.
- Ehlting, J., Shin J. K., and Douglas C. J. 2001. Identification of 4-coumarate:Coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. *The Plant Journal*. 27:455-465.
- Eisenback, D. J., and Triantaphyllou H. H. 1981. Root-knot Nematode: *Meloidogyne* species and races. *Journal of Nematology*. 2:26-32.
- Fernández-Pavia, S., and Linddell C. 1997. Resistance of *Capsicum annuum* CM334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. *Phytopathology*. 87:529.
- 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.

- Fraser, C. M., and Chapple C. 2011. The Phenylpropanoid Pathway in Arabidopsis. The Arabidopsis Book.
- Fry, S. C. 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 46:497-520
- 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, Campus Montecillo, Edo. de México. 43 p.
- Gayoso, C., Pomar F., Merino F., and Bernal M. A. 2004. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. Scientia Horticulturae. 102:1-13.
- Glosier, B. R., Ogundiwin E. A., Sidhu G. S., Sisco D. R., and Prince J. P. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. Physiological races of *P. capsici* in pepper. Euphytica. 162:23-30.
- Goddijn, O. J. M., Lindsey K., Van der Lee, F. M., Klap, J. C. and Sijmons, P. C. 1993. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harboring promoter-gusA fusion constructs. Plant Journal. 4:863-873.
- Godínez-Vidal, D., Rocha-Sosa M., Sepulveda-García E. B., Lara-Reyna J., Rojas-Martínez R. I., y Zavaleta-Mejía E. 2008. Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. European Journal Plant Pathology. 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.
- Golinowski, W., Grundler F. M. W., and Sobczak M. 1996. Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. Protoplasma. 194:103-116.

- Goujon, T., Sibout R., Eudes A., MacKay J., and Jouanin L. 2003. Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 41:677–687.
- Grundler, F. M. W., Sobczak M., and Golinowski W. 1998. Formation of cell wall openings in root cells of *Arabidopsis thaliana* following infection by the plant parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *The European Journal of Plant Pathology*. 104:545-551.
- 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*). *Biochimica Biophysica Acta*. 1625:253-260.
- Hamberger, B., and Hahlbrock K. 2004. The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America*. 101:2209-2214.
- Hatfield, R. D., Grabber J., Ralph J., y Brei K. 1999. Using the acetyl bromide assay to determine lignin concentrations in herbaceous plants: some cautionary notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 628-632.
- Hofmann, J., and Grundler F. M. W. 2006. Females and males of root parasitic cyst nematodes induce different symplasmic connections between their syncytial feeding cells and the phloem in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44:430-433.
- Hofmann, J., Banora M.Y., de Almeida-Engler J., and Grundler F. M. W. 2010. The role of callose deposition along plasmodesmata in nematode feeding sites. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. 23:549-557.
- Huang, J., Gu M., Lai Z., Fan B., Shi K., Zhou Y.H., Yu J.Q., and Chen Z. 2010. Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*. 153:1526–1538.
- Humphreys, J. M., y Chapple C. 2002. Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 224-229

- Hussey, R. S., and Grundler F.M. 1998. Nematode parasitism of plants. In Perry R.N., Wright J., (eds.), *Physiology and Biochemistry of Free-Living and Plant Parasitic Nematodes*. CAB International Press, Oxford, pp 213–243.
- Iiyama, K., and Wallis F.A. 1988. An improved acetyl bromide procedure for determining lignin in woods and wood pulps. *Wood Science and Technology*. 22:271–280.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20:510-525.
- Jammes, F., Lecomte P., de Almeida-Engler J., Bitton F., Martin-Magniette M. L., and Renou J. P. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 44:447–58.
- 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 Pathology*. 58:443-449.
- Johnson, D. B., Moore W. E., and Zank L. C. 1961: The spectrophotometric determination of lignin in small wood samples. *Tappi*. 44:793-798
- Jones, L., Ennos A. R., and Turner S. R. 2001. Cloning and characterization of irregular xylem 4 (*irx4*): A severely lignin deficient mutant of *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 26:205-216.
- Jones, M. G. K. 1981. Host cell responses to endoparasitic nematode attack: structure and function of giant cells and syncytia. *Annals of Applied Biology*. 97:353–372.
- Jones, M. G. K., and Northcote D. H. 1972. Nematode induced syncytium - a multinucleate transfer cell. *Journal of Cell Science*. 10:789-809.
- Jones, M. G. K., y Payne H. L. 1978. The structure of syncytia induced by the phytoparasitic nematode *Nacobbus aberrans* in tomato roots, and the possible role of plasmodesmata in their nutrition. *The Journal of Cell Science*. 23:299-313.
- Kauss, H., Franke R., Krause K., Conrath U., Jeblick W., Grimmig B., and Matern U. 1993. Conditioning of parsley (*Petroselinium crispum* L.) suspension cells increases elicitor-induced incorporation of cell wall phenolics. *Plant Physiology*. 102:459-466.

- Kim, D. S., and Hwang B. K. 2014. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene (PAL1) in salicylic acid-dependent signaling of the defense response to microbial pathogens. doi:10.1093/jxb/eru109
- Klink, V. P., Hosseini P., Matsye P., Alkharouf N., Matthews B. F. 2010. Syncytium gene expression in *Glycine max* roots undergoing a resistant reaction to the parasitic nematode *Heterodera glycines*. *Plant Physiol Biochem* 48:176–193.
- Lamb, C. J., and Rubery P. H. 1975. A spectrophotometric assay for Trans-cinnamic acid 4-Hydroxylase activity. *Analytical Biochemistry*. 68:554–561.
- Lapierre, C. B, Pollet B., and Rolando C. 1995. New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. *Research on Chemical Intermediates*. 21:397-412.
- Lapierre, C., Pilate G., Pollet B., Mila I., Leplé J.C., Jouanin L., Kim H., and Ralph J. 2004. Signatures of cinnamyl alcohol dehydrogenase deficiency in poplar lignins. *Phytochemistry*. 65:313–321.
- Lee, Y., Escamilla-Treviño L., Dixon R. A., and Voit E. O. 2012. Functional Analysis of Metabolic Channeling and Regulation in Lignin Biosynthesis: A Computational Approach. *PLoS Comput Biol*. 8:e1002769.
- Li, L., Cheng X. F., Leshkevich J., Umezawa T., Harding S. A., and Chiang V. L. 2001. The Last Step of Syringyl Monolignol Biosynthesis in Angiosperms Is Regulated by a Novel Gene Encoding Sinapyl Alcohol Dehydrogenase. *The Plant Cell*. 13:1567-1585.
- Livak, K. J., and Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods*. 25:402-408.
- López-Martínez, N., Colinas-León M. T., Peña-Valdivia C. B., Salinas-Moreno Y., Fuentes-Montiel P., Biesaga M., and Zavaleta-Mejía E. 2010. Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant Soil* DOI 10.1007/s11104-010-0553-5.
- López-Martínez, N., y Zavaleta-Mejía E. 2007. Respuestas de defensa en chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici* y *Nacobbus aberrans*. In: XXXIX Reunión anual.

Organización de Nematólogos de los Trópicos Americanos (ONTA). 29 de octubre-2 de noviembre. Córdoba, Argentina. Resumen O6.

- Lu, S., Zhou Y., Li L., and Chiang V. L. 2006. Distinct Roles of C innamate 4-hydroxylase Genes in Populus. *Plant Cell Physiol.* 47: 905–914
- Mac Donald, M. J., and D’Cunha G. B. 2007. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology.* 85:273-282.
- Manzanilla-López, R. H. 1999. Contribución al conocimiento del ciclo de vida de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen. 1944 (Nematoda: Pratylenchidae) en cultivos *in vitro*. *Fitopatología.* 34:197.
- 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 y Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica.* 32:149-227.
- Matthews, B. F., Beard H., MacDonald M. H., Kabir S., Youssef R. M. Hosseini P., and Brewer E. 2013. Engineered resistance and hypersusceptibility through functional metabolic studies of 100 genes in soybean to its major pathogen, the soybean cyst nematode. *Planta.* 237:1337–1357.
- Mazourek, M., Pujar A., Borovsky Y., Paran I., Mueller L. y Jahn M. M. 2009. A dynamic interface for capsaicinoid systems biology. *Plant Physiology.* 150:1806-1821.
- Menden, B., Kohlhoff M., and Moerschbacher B. 2007. Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochemistry.* 68:513–520.
- Meyer, K., Cusumano J. C., Somerville C., and Chapple C. 1996. Ferulate-5-hydroxylase from *Arabidopsis thaliana* defines a new family of cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 93:6869-6874.
- Meyer, K., Shirley A. M., Cusumano J. C., Bell-Lelong D. A., and Chapple C. C. S. 1998. Lignin monomer composition is determined by the expression of a cytochrome P450-dependent monooxygenase in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 95:6619–6623.

- Mitchum, M. G., Hussey R. S., Baum T. J., Wang X., Elling A. A., Wubben M., and Davis E. L. 2013. Nematode effector proteins: an emerging paradigm of parasitism. *New Phytologist*. 4:879-894.
- Moens, M., Perry R. N. and Starr J. L. 2009. *Meloidogyne* Species a diverse group of novel and important plant parasites. Pp. 1-17. In *Root-knot nematodes*. Perry, R. N., Moens, M., and Starr J. L. Eds. CABI Publishing. UK.
- Moon, H. S., Khan Z., Kim S. G, Son S. H, and Kim Y. H. 2010. Biological and structural mechanisms of disease development and resistance in chili pepper infected with the root-knot nematode. *The Plant Pathology Journal*. 26:149-153.
- Nicholson, R. L., and Hammerschmidt R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *The Annual Review of Phytopathology*, 30:369-389.
- Ortega, G. R., Palanzón E. C., and Cuartero J. Z. 1991. Genetics of resistance to *Phytophthora capsici* in the Mexican pepper SCM334. *Plant Breeding*. 107:50-55
- Pakusch A. E., and Matern U. 1991. Kinetic characterization of caffeoyl-coenzyme A specific 3-O-methyltransferase from elicited parsley cell suspensions. *Plant Physiology*. 96:327-330.
- Parra, G., and Ristaino J. B. 2001. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora* blight of bell pepper. *Plant Disease*. 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.
- Perry, R. N., and Moens M. 2006. *Plant Nematology*. CABI Publishing: Wallingford, UK. 447. ISBN-10: 1-84593-056-8; ISBN-13: 978-1-84593-056-1
- Piquemal, J., Lapierre C., Myton K., O'connell A., Schuch W., and Grima-Pettenati J. 1998. Downregulation of cinnamoyl-CoA reductase induces significant changes of lignin profiles in transgenic tobacco plants. *Plant Journal*. 13:71-83.
- Pomar, F., Caballero N., Pedreño M. A., and Ros Barceló A. 2002. H₂O₂ generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. *FEBS Letters*. 529:198-202.

- Pomar, F., Novo M., Bernal M. A., Merino F., and Ros Barceló A. 2004. Changes in stem lignins (monomer composition and cross-linking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. *New Phytologist*. 163:111-123.
- Quentin, M., Allasia V., Pegard A., Allais F., Ducrot P. H., Favery B., Levis C., Martinet S., Masur C., Ponchet M., Roby D., Schlaich N. L, Jouanin L., and Keller H. 2009. Imbalanced Lignin Biosynthesis Promotes the Sexual Reproduction of Homothallic Oomycete Pathogens. *Plos Pathogens*. 5:1-9.
- Raes, J., Rohde A., Christensen J. H., Peer Y.V., and Boerjan W. 2003. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 133:1051–1071.
- Rasmussen, S., and Dixon R. A. 1999. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *The Plant Cell*. 11:1537-1551.
- Rastogi, S., y Dwivedi U. N. 2008. Manipulation of lignin in plants with special reference to *O*-methyltransferase. *Plant Science*. 174:264-277.
- Redondo, E., Rodríguez R., Ortega M., Larqué A. y Engleman E. M. 1989. Mecanismo de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici*. *Agrociencia*. 77:123-137.
- Requena, M. E., Egea-Gilabert C., and Candela M. E. 2005. Nitric oxide generation during the interaction *Phytophthora capsici* of two *Capsicum annuum* varieties showing different degrees of sensitivity. *Physiologia Plantarum*. 124:50-60.
- Rodiuc N., Vieira P., Banora M. Y., and de Almeida-Engler J. 2014. On the track of transfer cell formation by specialized plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Plant Science*. 5:160.
- Ruel, K., Berrio-Sierra J., Derikvand M. M., Pollet B., Thévenin J., and Lapierre C. 2009. Impact of CCR1 silencing on the assembly of lignified secondary walls in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*. 184:99-113.

- Ruel, K., Montiel M. D., Goujon T., Jouanin L., Burlat V., and Joseleau J. P. 2002. Interrelation between Lignin Deposition and Polysaccharide Matrices during the Assembly of Plant Cell Walls. *Plant Biology*. 4:2-8.
- Santiago, R., Barros-Rios J., and Malvar R. A. 2013. Impact of Cell Wall Composition on Maize Resistance to Pests and Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 14:6960-6980.
- SAS Institute Inc. 2002. SAS Procedures Guide, Version 9.0 (Computer program). SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Sattler S. E., and Funnell-Harris D. L. 2013. Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens?. *Frontiers in Plant Science*. 4:70. DOI: 0.3389/fpls.2013.00070.
- Sibout, R., Eudes A., Pollet B., Goujon T., Mila I., Granier F., and Jouanin, L. 2003. Expression Pattern of Two Paralogs Encoding Cinnamyl Alcohol Dehydrogenases in Arabidopsis. Isolation and Characterization of the Corresponding Mutants. *Plant Physiology*. 132:848–860.
- Sijmons, P.C. 1993. Plant-nematode interactions. *Plant Molecular Biology*. 23:917-931.
- Silvar, C., Merino F., and Díaz J. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology*. 165:1120-1124.
- Singleton, V. L., and Rossi J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphor molybdic phosphotungstic acid reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-158.
- Skyba, O., Douglas C. J., and Mansfield S. D. 2013. Syringyl-rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 79:2560-71.
- Stephen, Y. L., and Carlton W. D. 1992. *Methods in Lignin Chemistry*. Springer series in wood science. 578 p.
- Sun, R. C., Sun X. F., Wang S. Q., Zhu W., and Wang X. Y. 2002. Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws,

maize stems, and fast-growing poplar wood. *Industrial Crops and Products*. 15:179-188.

- 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. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 130:75-78.
- Tobimatsu, Y., Chen F., Nakashima J., Escamilla-Treviño L. L., Jackson L., Dixon R. A., and Ralph J. 2013. Coexistence but independent biosynthesis of catechyl and guaiacyl/syringyl lignin polymers in seed coats. *Plant Cell*. 25:2587-600.
- Trujillo-Viramontes, F., Zavaleta-Mejía E., Rojas-Martínez R. I., y Lara R. 2005. Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici*, inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile (*Capsicum annum*). *Nematropica*. 35:37-44.
- Turner D.W., and Rosales F. E. 2005. Banana Root System: towards a better understanding for its productive management: Proceedings of an international symposium / Sistema Radical del Banano: hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo: Memorias de un simposio internacional. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France.
- Turner, S. J., and Rowe J. A. 2006. Cyst nematodes. *In*: Perry R. N., and Moens M. 2006. *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 annum* cv. SCM334. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 67:149-154.
- Uehara, T., Sugiyama S., Matsuura H., Arie T., and Masuta C. 2010. Resistant and susceptible responses in tomato to cyst nematode are differentially regulated by salicylic acid. *Plant Cell Physiology*. 51:1524-36.
- Underwood, W. 2012. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. *Frontiers in Plant Science*. 3:85.

- Vaganan, M. M., Ravi I., Nandakumar A., Sarumathi S., Sundararaju P., and Mustaffa M. M. 2014. Phenylpropanoid enzymes, phenolic polymers and metabolites as chemical defenses to infection of *Pratylenchus coffeae* in roots of resistant and susceptible bananas (*Musa* spp.). *Indian journal of experimental biology*. 52:252-60.
- Vane, C. H. Drage T. C., and Snape C. E. 2006. Bark decay by the white-rot fungus *Lentinula edodes*: Polysaccharide loss, lignin resistance and the unmasking of suberin. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 57:14-23.
- Vanholme R., Morreel K., Ralph J., and Boerjan W. 2008. Lignin engineering. *Current Opinion in Plant Biology*. 11:278-285.
- Vanholme, R., Demedts B., Morreel K., Ralph J., and Boerjan W. 2010. Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*. 153:895-905.
- Vargas-Escobedo, M. T., Zavaleta-Mejía E., y A. M. Hernández-Anguiano. 1996. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en chile serrano CM334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica*. 26:159-166.
- Vieira P., Engler G., and de Almeida Engler J. 2012. Whole mount confocal imaging of nuclei in giant feeding-cells induced by root knot nematodes in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. 195:488-496.
- Villar-Luna, E. 2013. Transcritos de genes de defensa acumulados en chiles CM334 infectado por *Nacobbus aberrans* o por *Meloidogyne enterolobii* e inoculado con *Phytophthora capsici*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados Montecillo, Edo. De México. 118 p.
- Vrain, T. C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. *Journal Nematology*. 9:249-250.
- Weng, J. K, Li X., Stout J., and Chapple C. 2008. Independent origins of syringyl lignin in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105:7887-7892
- Weng, J. K., and Chapple C. 2010. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist*. 187:273-285.
- Williamson, V. M., and Hussey, R. S. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell*. 8:1735-1745.

- Wuyts, N., Lognay G., Swennen R., and Waele D. D. 2006. Nematode infection and reproduction in transgenic and mutant *Arabidopsis* and tobacco with an altered phenylpropanoid metabolism. *Journal of Experimental Botany*. 57:2825-2835.
- Wuyts, N., Lognay G., Verscheure M., Marlier M., De Waele D., and Swennen R. 2007. Potential physical and chemical barriers to infection by the burrowing nematode *Radopholus similis* in roots of susceptible and resistant banana (*Musa* spp.) *Plant Pathology*. 56: 878-890
- Wyss, U. 1997 Root parasitic nematodes: an overview. *In*: Fenoll, C., Grundler, F. M. W. and Ohl, S. (eds) *Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode interactions*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 5-22.
- Xu, L., Zhu L., Tu L., Liu L., Yuan D., Jin L., Long L., and Zhang X. 2011. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and Histochemistry. *Journal of Experimental Botany*. 62:5607–5621.
- Zavaleta-Mejía, E. 2002. Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparásitos, una hipótesis. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20:118-122.
- Zhao, H. Y., Wei J. H., Zhang J. Y., Liu H. R., Wang T., and Song Y. R. 2002. Lignin biosynthesis by suppression of two O-methyltransferases. *Chinese science bulletin* 47:1092-1095.
- Zuckerman, B., Matheny M., y Acosta N. 1994. Control of plant-parasitic nematodes by a nematicidal strain of *Aspergillus niger*. *Journal of Chemical Ecology*. 20:33-43.