



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**"EXPRESIÓN DE LOS GENES *SS* Y *CAS* EN CHILE CM-334
INOCULADO CON *Nacobbus aberrans* Y CON *Meloidogyne
incognita*"**

JESÚS ANTONIO GARCÍA ESPINOZA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2011

La presente tesis titulada: "EXPRESIÓN DE LOS GENES SS Y CAS EN CHILE CM-334 INOCULADO CON *Nacobbus aberrans* Y CON *Meloidogyne incognita*" realizada por el alumno: JESÚS ANTONIO GARCÍA ESPINOZA bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce

ASESORA



Dra. Emma Zavaleta Mejia

ASESORA



Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez

ASESOR



Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Agosto de 2011

EXPRESIÓN DE LOS GENES SS Y CAS EN CHILE CM-334 INOCULADO CON *Nacobbus aberrans* Y CON *Meloidogyne incognita*

Jesús Antonio García Espinoza, MC.

Colegio de postgraduados, 2011

Los esteroides son compuestos que los nematodos fitopatógenos son incapaces de sintetizar y que deben obtenerlos de su hospedante. Los genes SS y CAS codifican las enzimas escualeno sintasa y cicloartenol sintasa, respectivamente, que son clave en la síntesis de esteroides en Chile. Este trabajo tuvo por objetivos, comparar la expresión de ambos genes mediante PCR en tiempo real, en la interacción compatible CM-334-*Nacobbus aberrans* y en la incompatible CM-334-*Meloidogyne incognita*, a los 2, 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación (ddi), así como cuantificar el número de nematodos por raíz a los 2, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 ddi. *N. aberrans* completó su ciclo de vida a los 42 ddi e indujo la sobreexpresión de SS y CAS hasta dos veces más que el testigo; su establecimiento exitoso en raíces de CM-334 podría estar relacionado con la síntesis de esteroides esenciales, como el estigmaesterol, compuesto indispensable para el desarrollo y reproducción de nematodos endoparásitos. *M. incognita* también indujo la sobreexpresión de SS, pero en menor proporción que *N. aberrans*, en cambio la expresión de CAS fue mayor en presencia de *M. incognita*; sin embargo, hubo penetración limitada y nula reproducción. La modificación en la expresión de dichos genes inducida por *M. incognita*, podría estar relacionada con la síntesis de esteroides como campesterol y sitoesterol, que se asocian con respuestas de defensa en *Capsicum annuum*. La sobreexpresión de los genes SS y CAS inducida por *N. aberrans* podría favorecer el establecimiento de otros fitopatógenos incapaces de sintetizar sus propios esteroides, como *Phytophthora capsici*.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, cicloartenol sintasa, escualeno sintasa, nematodos agalladores, PCR en tiempo real.

**Expression of genes SS and CAS in chilli CM-334 inoculated with
Nacobbus aberrans and *Meloidogyne incognita***

Jesús Antonio García Espinoza, MC.

Colegio de postgraduados, 2011

Sterols are compounds that phytoparasitic nematodes are incapable of synthesizing so must obtain them from their hosts. The genes SS and CAS code for the enzymes squalene synthase and cycloartenol synthase, respectively, which are key to the synthesis of sterols in plants. This work had as objectives comparison of the expression of the two genes by means of real-time PCR, in the compatible interaction chilli (*Capsicum annuum*) CM-334/*Nacobbus aberrans* and the incompatible interaction chilli CM-334/*Meloidogyne incognita* at 2, 7, 14, 21 and 28 days after inoculation (dai), and the quantification of the number of nematodes in the roots at 2, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 dai. *N. aberrans* completed its life cycle by 42 dai and induced the overexpression of SS and CAS up to twice the value in the control; its establishment success in roots of CM-334 could be related to the synthesis of essential sterols, such as stigmasterol, a compound that is indispensable for the development and reproduction of endoparasitic nematodes. *M. incognita* also induced the overexpression of SS, but to a lesser degree than *N. aberrans*; however, there was only limited penetration of the roots and no reproduction. The modification in the expression of these genes induced by *M. incognita* could be related to the synthesis of sterols such as campesterol and sitosterol, which are associated with defence responses in *C. annuum*. The overexpression of the SS and CAS genes induced by *N. aberrans* could favor the establishment of other phytopathogens incapable of synthesizing their own sterols, such as *Phytophthora capsici*.

Key words: *Capsicum annuum*, cycloartenol synthase, real-time PCR, root-knot nematodes, squalene synthase

DEDICATORIA

A mis padres **Imelda** y **Jesús**:

Por su perseverancia y esfuerzo para sacar adelante nuestra familia, espero me alcance la vida para corresponder a su apoyo y confianza.

A mi hermano **Ramón**:

Por el apoyo brindado estos dos años, lo mejor está por venir hermano.

A mi novia **Karely Aglae**:

Por entenderme, apoyarme y comprenderme incondicionalmente durante mi formación profesional, por amarme a pesar del tiempo y la distancia.

A toda mi **Familia Espinoza**:

Gracias por su preocupación constante hacia mi persona.

A mis amigos:

Jorge, Dagoberto, Manolo, Luis, Shema Sarmiento y Chema Fierro, por su amistad incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por confiar en mí y otorgarme una beca que me permitió financiar los gastos de mi postgrado.

Al **Colegio de Postgraduados**, en especial al personal del instituto de fitosanidad por su profesionalismo y dedicación.

A la **Dra. Emma Zavaleta Mejía** por dirigir con sabiduría este trabajo, por enseñarme que los límites son producto de nuestra imaginación, que nosotros decidimos hasta donde podemos llegar, que un excelente investigador puede ser también un excelente ser humano.

A la **Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce** que hizo posible esta gran aventura, gracias por su confianza y apoyo.

A la **Dra. Reyna Rojas Martínez** por atender y responder hasta las más tontas de mis ideas y cuestionamientos.

Al **Dr. Miguel Ángel Apodaca Sánchez** siempre al pendiente de mi formación profesional y personal, gracias Doc por su amistad y confianza depositada en mí.

A la **Dra. Olga Gómez Rodríguez** por su ánimo siempre positivo y motivante, su apoyo y disposición en el trabajo.

A la **Dra. Yolanda Rodríguez Pagaza** por sus consejos profesionales y personales, por atender todas mis dudas y solicitudes en el laboratorio. Todos los laboratorios deberían tener a una profesional como Yolita.

A mis compañeros, pero sobre todo amigos del laboratorio 209: **Lupita, Edgar, Alba, Moises, Martha, Abimael, Noe, Alicia y Lalo**, por generar siempre un ambiente positivo y de confianza que hacen más agradables las largas jornadas de trabajo.

A todos los profesores de postgrado que han hecho posible que me lleve más que un grado académico, una formación profesional integral.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN GENERAL	iii
GENERAL SUMMARY	iv
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	5
Marchitez del chile	5
Criollo de Morelos 334	6
Rompimiento de resistencia de CM-334 a <i>P. capsici</i> inducido por <i>Nacobbus aberrans</i>	7
Sitios especializados de alimentación y reprogramación génica del hospedante por los nematodos	8
Esteroles y brasinoesteroides en plantas	10
Escualeno sintasa (SS) y cicloartenol sintasa (CAS): enzimas clave en la síntesis de esteroles	12
Fitoesteroles: compuestos esenciales para los nematodos fitopatógenos	14
<i>Meloidogyne</i> spp.	15
<i>Nacobbus aberrans</i>	17
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Establecimiento de los experimentos	20
Obtención del inóculo	21
Evaluación de experimentos	22
Extracción de ARN y síntesis de ADNc	22
Oligonucleótidos	23
Análisis estadístico	24
RESULTADOS	25
Infección de chile CM-334 por <i>N. aberrans</i> y <i>M. incognita</i>	25
Expresión relativa de los genes SS y CAS	28

DISCUSIÓN	31
LITERATURA CITADA	35

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1	24

Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica de los genes *SS* y *CAS*.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	14

Resumen de la ruta de los isoprenoides, dirigida hacia la producción de esteroides en plantas.

Figura 2	20
----------	----

Fuente de inóculo de *N. aberrans*. A) Raíces de tomate agalladas, B) masa de huevecillos, C) hembra madura dentro de agalla, y D) huevecillos.

Figura 3	21
----------	----

Fuente de inóculo de *M. incognita*. A) Raíces de frijol agalladas, B) hembra madura, C) masa de huevecillos, y D) huevecillos.

Figura 4	22
----------	----

Montaje de raíces teñidas con fucsina ácida.

Figura 5	26
----------	----

Número de individuos de *N. aberrans* y *M. incognita* dentro de raíces de chile CM-334. A) Experimentos 1 y 2. B) Experimento 3. Cada barra representa el promedio de cinco raíces analizadas y la línea en cada barra representa la desviación estándar. Para cada tiempo, barras con letra diferente son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figura 6	26
----------	----

Desarrollo de *N. aberrans* a través del tiempo en raíces de chile CM-334. N= nematodo, M= masa de huevecillo, H= huevecillos, E= estilete.

Figura 7	27
----------	----

Plantas de CM-334 60 ddi con *N. aberrans*, del tercer experimento. A= agalla, M= masa de huevecillos, H= hembra adulta, Hu= huevecillos, Ma= macho vermiforme.

Figura 8	28
----------	----

Regiones necróticas en raíces de CM-334 asociadas con *M. incognita* a distintos tiempos. N= nematodo, H= hembra inmadura, Ne= necrosis.

- Figura 9 Niveles relativos de expresión del gen *SS* en raíces durante la interacción compatible chile CM-334-*N. aberrans* y la incompatible chile CM-334-*M. incognita*, en veces con respecto al testigo sin inocular. Cada barra representa el promedio de seis repeticiones y la línea en cada barra representa la desviación estándar. Para cada tiempo, barras con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). C) Tendencias de expresión en ambos experimentos, cada punto representa el promedio de 12 repeticiones. 29
- Figura 10 Niveles relativos de expresión del gen *CAS*, en raíces de chile CM-334 durante la interacción compatible chile CM-334-*N. aberrans* y la incompatible chile CM-334-*M. incognita*, en veces con respecto al testigo sin inocular. Cada barra representa el promedio de seis repeticiones y la línea en cada barra representa la desviación estándar. Para cada tiempo, barras con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). C) Tendencias de expresión en ambos experimentos, cada punto representa el promedio de 12 repeticiones. 30

INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) representa un alimento básico en la dieta de los mexicanos. Su importancia económica y alimenticia es similar a la del maíz y frijol (ASERCA, 1998). El chile verde es una de las principales hortalizas que se siembran en México, según el SIAP (2008) en el 2008 se sembraron más de 145,000 has; sin embargo, el rendimiento se reduce año tras año debido a problemas fitosanitarios. Dentro de éstos, la enfermedad conocida como “marchitez del chile”, ocasionada por el oomiceto *Phytophthora capsici* Leo es devastadora en cultivos de chile de todo el mundo. *P. capsici* ocasiona tanto pudrición en raíces y en la base del tallo, como tizones aéreos que afectan a hojas, frutos y tallos (Ristaino y Johnston, 1999). Pozo (1983), reportó que esta enfermedad reduce el rendimiento hasta un 40% de la producción total en México.

Una de las alternativas más eficientes para el manejo de la enfermedad, es la utilización de materiales con resistencia genética a *P. capsici* (Andrés-Ares *et al.*, 2005). Sin embargo, materiales resistentes a hongos y oomicetos, pueden mostrar susceptibilidad cuando son previamente infectados por nematodos fitopatógenos, fenómeno conocido como “rompimiento de resistencia” (Zavaleta-Mejía, 2009, 2002; Back *et al.*, 2002; Vargas-Escobedo *et al.*, 1996). Este fenómeno, no se explica por las heridas causadas a la raíz por el estilete del nematodo, ya que resultados de experimentos utilizando plantas con doble sistema radical, en las que existe una separación física entre los dos patógenos, indican que en estas condiciones la planta muestra susceptibilidad (Vargas-Escobedo *et al.*, 1996; Bowman y Bloom 1966).

Los nematodos agalladores y formadores de quistes, tienen la capacidad de inducir la formación de sitios especializados de alimentación, células gigantes o sincitios (Goverse *et al.*, 2000), producto de la alteración de la expresión génica de las células hospedantes. En interacciones compatibles, las modificaciones en la expresión génica de las células de la raíz, provocan, entre otras cosas, una respuesta lenta y débil de los mecanismos de defensa de la planta, adelgazamiento de paredes celulares, crecimiento y división celular excesiva (Gheysen y Fenoll, 2002; Goverse *et al.*, 2000; Williamson y Hussey, 1996).

El genotipo de chile criollo tipo serrano, conocido como CM-334, es altamente resistente a *P. capsici* (Fernández-Pavia y Liddell, 1997; Vargas *et al.*, 1996), a los nematodos *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949, *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949 y *M. incognita* (Kofoid y White, 1919) Chitwood (1949) (Pegard *et al.*, 2005), y a los virus Y de la papa (PVY) y moteado del chile (PeMV) (Janzac *et al.*, 2009; Echer y Costa, 2002); pero susceptible a *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen, 1944. A pesar del alto grado de resistencia al oomiceto, cuando plantas de CM-334 son inoculadas previamente con el nematodo *N. aberrans*, se comportan como susceptibles al oomiceto (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Vargas-Escobedo *et al.*, 1996). Cabe destacar, que *M. incognita* no rompe la resistencia en CM-334 (Comunicación personal, Dra. Sylvia Fernández Pavia). Zavaleta-Mejía (2009, 2002) propuso la hipótesis de que el rompimiento de resistencia está asociado con cambios en la expresión de genes que codifican para enzimas clave de las rutas de los fenilpropanoides y de isoprenoides, cuya actividad catalítica permite la acumulación de aquellos metabolitos que favorecen el establecimiento de *P.*

capsici, o que la ausencia de su actividad resulta en la reducción o ausencia de metabolitos que inhiben su crecimiento.

Los esteroides son isoprenoides que no pueden ser sintetizados por nematodos fitopatógenos (Chitwood y Lusby, 1991) ni por *P. capsici* (Moreau *et al.*, 1998), por consiguiente deben obtenerlos de las células hospedantes. Los esteroides actúan como reguladores de la fluidez de las membranas celulares y son también precursores de moléculas biológicamente activas como las hormonas (Chitwood, 1999, 1998). La resistencia de algunos cultivares a oomicetos (Vögeli y Chapell, 1988) o a nematodos fitopatógenos (Zinov'eva *et al.*, 2004) se ha asociado con cambios cuantitativos y/o cualitativos en los esteroides del cultivar. Se ha propuesto que estos materiales resistentes son capaces de desviar la síntesis de esteroides esenciales para el patógeno, a la producción de isoprenoides sesquiterpénicos tóxicos para el mismo (Zinov'eva *et al.*, 2004; Vögeli y Chapell, 1988). Así Zinov'eva *et al.* (2004) reportan que en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) resistentes a *M. incognita* hubo una disminución en el contenido total de esteroides, en particular estigmaesterol, mientras que en plantas susceptibles hubo un incremento.

Se ha considerado que la resistencia a *P. capsici* en plantas de Chile CM-334, pudiera deberse en parte a un contenido inadecuado de esteroides en sus tejidos y que cuando *N. aberrans* infecta las plantas podría estimular la síntesis y acumulación de esteroides en las raíces, lo que crearía condiciones favorables para el establecimiento del oomiceto (Zavaleta-Mejía, 2002).

De acuerdo con estudios realizados en animales (Guan *et al.*, 1998), levaduras (Kennedy, 1999) y plantas (Chappell *et al.*, 1989), se ha establecido que la enzima escualeno sintasa (SS) es clave en la regulación de la biosíntesis de

esteroles en la ruta de los isoprenoides. SS cataliza la condensación de dos moléculas de farnesil difosfato (FPP) para formar compuestos de 30 carbonos y su actividad se ha localizado en el retículo endoplásmico liso (Devarenne *et al.*, 2002). El gen SS es el responsable de codificar para la escualeno sintasa, en Chile; su ADNc comprende 1,674 pb y contiene un marco de lectura de 411 amino ácidos (Jung-Hoon *et al.*, 2002). Más abajo en la ruta de los isoprenoides se encuentra la enzima cicloartenol sintasa, que convierte el oxidoescualeno en cicloartenol, el primer carbocíclico intermediario en la ruta de producción de esteroides en plantas (Franca *et al.*, 2001; Corey *et al.*, 1993). Con base en lo anterior y con la idea de contribuir en la comprensión del fenómeno de rompimiento de resistencia en CM-334, el objetivo del presente trabajo fue determinar si existen diferencias en la expresión de los genes SS y CAS entre las plantas de Chile CM-334 inoculadas con *N. aberrans* (interacción compatible) y las inoculadas con *M. incognita* (interacción incompatible).

REVISIÓN DE LITERATURA

Marchitez del chile

La enfermedad conocida como “Marchitez del chile” es inducida por el oomiceto *P. capsici*. Esta enfermedad es una de las principales limitantes para la producción del cultivo del chile (*C. annuum*) en todo el mundo (González-Pérez *et al.*, 2004; Pernezny *et al.*, 2003). En México se estiman reducciones en rendimiento de hasta un 40% en la producción (Pozo, 1983).

P. capsici fue descrito por primera vez en Nuevo México por Leon H. Leonian como una nueva especie de *Phytophthora* que causaba daños importantes a plantas de chile (Leonian, 1922). *P. capsici* afecta a un amplio rango de hospedantes en todo el mundo, principalmente cucurbitáceas, solanáceas y algunas leguminosas (Hausbeck y Lamour, 2004).

En general, *P. capsici* es capaz de infectar cualquier parte de la planta de chile e inducir distintos síndromes tales como “damping off”, pudriciones radicales, pudrición de la corona, pudrición del fruto y tizones foliares (Ogundiwin *et al.*, 2005; Ristaino y Johnston, 1999). *P. capsici* es un oomiceto heterotrófico que tiene dos tipos compatibles, A1 y A2, requeridos para la reproducción sexual. La estructura sexual es la oospora (espora de pared gruesa), la cual se considera como el principal propágulo de sobrevivencia y fuente primaria de inóculo en el campo. Su reproducción asexual se lleva a cabo mediante la formación de esporangios, que germinan indirectamente para liberar las zoosporas. Estos propágulos son considerados las principales unidades de infección del patógeno (Ristaino y Johnston, 1999; Kellam y Zentmyer, 1986; Papavizas *et al.*, 1981).

Se han empleado distintos métodos de manejo para esta enfermedad, incluidas prácticas culturales y productos químicos; sin embargo, éstos son sólo parcialmente efectivos (Parra y Ristaino, 2001). El uso de cultivares genéticamente resistentes promete ser el método más eficaz y amigable para el manejo de *P. capsici*. El disponer de variedades resistentes de Chile no sólo aumentarían la producción de Chile, sino que también se reduciría el uso de fungicidas que son potencialmente perjudiciales para el medio ambiente (Ogundiwin *et al.*, 2005).

Criollo de Morelos 334

El desarrollo de cultivares que posean resistencia genética durable y estable, parecen ser la mejor opción para el manejo de *P. capsici*. Sin embargo, la resistencia natural al oomiceto se ha encontrado solo en algunos materiales. Uno de estos materiales resistentes es la línea conocida como Criollo de Morelos 334 (CM-334), que ha mostrado resistencia a todas las razas del *P. capsici* y a las cepas más virulentas del patógeno con las que se ha inoculado. Se considera que la elevada resistencia mostrada por CM-334 es de tipo poligénica (Bonnet *et al.*, 2007; Sy *et al.*, 2005). Este material se ha utilizado como fuente principal de resistencia en los programas de mejoramiento de Chile (Glosier *et al.*, 2008; Bonnet *et al.*, 2007). Sin embargo, la falta de conocimiento sobre los mecanismos de resistencia de CM-334 ha ocasionado que no se haya podido introducir la resistencia de este material a cultivares comerciales de Chile (Glosier *et al.*, 2008; Oelke *et al.*, 2003). CM-334 es también resistente a los virus Y de la papa (PVY patotipo 1-2) característica conferida por el gen *Ry1-2* (Boiteux *et al.*, 1996), al virus moteado del Chile (PeMV) (Janzac *et al.*, 2009) y a tres de los más importantes nematodos agalladores: *Meloidogyne*

incognita, *M. arenaria* y *M. javanica* (Pegard *et al.*, 2005; Djian-Caporalino *et al.*, 1999). La resistencia de CM-334 a estos nematodos, se asocia con respuestas bioquímicas postpenetración, incluyendo respuesta hipersensitiva y presencia de compuestos fenólicos, específicamente ácido clorogénico, que limitan su crecimiento y desarrollo (Pegard *et al.*, 2005).

Rompimiento de resistencia de CM-334 a *P. capsici* inducido por

Nacobbus aberrans

El rompimiento de resistencia por nematodos fitopatógenos es un fenómeno que refleja la capacidad de alteración metabólica y fisiológica, que ocasionan estos patógenos en sus hospedantes (Back *et al.*, 2002). La explicación inicial del fenómeno se basó en que el nematodo al ocasionar heridas facilita la entrada del otro patógeno; sin embargo esta idea resulta insuficiente para explicarlo, pues se ha demostrado que al causar lesiones artificiales en las raíces no se induce rompimiento de resistencia, además de que en plantas con doble sistema de raíz en los que existe una separación física entre ambos patógenos se presenta pérdida de resistencia (Vargas-Escobedo *et al.*, 1996). Se ha observado que el material CM-334 pierde su resistencia a *P. capsici*, cuando es previamente inoculado con *N. aberrans* (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Vargas-Escobedo *et al.*, 1996). Este fenómeno se ha explicado argumentando que el nematodo ocasiona alteraciones metabólicas en la ruta de los isoprenoides y fenilpropanoides; dichas alteraciones favorecerían el establecimiento y reproducción no sólo de *N. aberrans* si no también de *P. capsici* (Zavaleta-Mejía, 2009, 2002).

Al parecer, *N. aberrans* induce una represión en la expresión de los genes *POX* y *PAL*, asociada con la reducción en la actividad enzimática de las

correspondientes enzimas para las que codifican (peroxidasas y L-phenylalanine ammonia-lyase), además de la reducción en la cantidad de fenoles solubles, en especial ácido clorogénico; compuestos relacionados con defensa (López-Martínez *et al.*, 2011). Godínez-Vidal (2010) encontró que la presencia del nematodo modifica la expresión de algunos genes de la ruta mevalónica, que por un lado, le permitirían al nematodo abatir la acumulación de capsidiol (fitoalexina tóxica para el nematodo), y por otro obtener los esteroides esenciales para establecerse y desarrollarse.

Sitios especializados de alimentación y reprogramación génica del hospedante por los nematodos

El grupo de nematodos más importante económicamente son los endoparásitos sedentarios, éste incluye nematodos que se enquistan y nematodos agalladores. Ambos grupos establecen interacciones complejas con sus hospedantes (Williamson y Gleason, 2003). Los nematodos enquistadores penetran las raíces y se abren camino intracelularmente, una vez situados en el cilindro vascular, establecen su sitio especializado de alimentación. Este sitio se caracteriza por la ruptura de las paredes celulares entre el sitio inicial de alimentación y las células vecinas, lo que resulta en el desarrollo de un sincitio multinucleado (Baum *et al.*, 2007; Williamson y Gleason, 2003). Por su parte, los juveniles (J2) del género *Meloidogyne* se mueven intercelularmente después de la penetración de la raíz hasta la base del cilindro vascular. Dentro del cilindro vascular, los J2 inducen la rediferenciación de células de la raíz en células gigantes, que constituyen el sitio especializado de alimentación. La formación de estas células se considera producto de la inducción de división

nuclear sin citocinesis en células del hospedante (Abad *et al.*, 2009; Baum *et al.*, 2007).

El establecimiento exitoso y el mantenimiento de estos sitios especializados de alimentación son esenciales para cumplir con las exigencias nutrimentales del nematodo. Tanto los sincitios como las células gigantes contienen altos niveles de proteínas totales, aminoácidos, lípidos, ADN y azúcares, que los hacen un sustrato adecuado no sólo para los nematodos, sino también para otros patógenos. Estas alteraciones metabólicas y estructurales son el resultado de complejos cambios en la expresión génica en el hospedante (Abad *et al.*, 2009; Williamson y Gleason, 2003; Back *et al.*, 2002; Williamson y Hussey, 1996).

Las plantas atacadas por nematodos son capaces de reaccionar y activar respuestas de defensa. Durante una interacción incompatible estas respuestas se caracterizan por ser rápidas y de mayor intensidad, mientras que durante las interacciones compatibles son lentas y débiles. Muchos de los cambios en la expresión génica del hospedante inducidos por nematodos están relacionados con las respuestas de defensa de la planta, dichas modificaciones ocurren tanto en interacciones compatibles como incompatibles, aunque con diferencias en tiempo e intensidad (Gheysen y Fenoll, 2002). La modificación en la expresión de una gran cantidad de genes, probablemente contribuye en el establecimiento de la relación parasítica; por ejemplo, ocurren cambios en la arquitectura de la pared celular durante el desarrollo de células gigantes y sincitios. Se ha demostrado que infecciones por nematodos enquistadores y agalladores inducen una sobreexpresión de genes que codifican para enzimas que degradan paredes celulares (endoglucanasas y poligalacturonasas) del hospedante (Williamson y Gleason, 2003; Goellner *et al.*, 2001).

Meloidogyne incognita reprimió la expresión del 70% de genes relacionados con defensa en los sitios especializados de alimentación, durante una interacción compatible con *Arabidopsis thaliana* (Jammes *et al.*, 2005). Por otra parte, durante la interacción compatible *N. aberrans*-CM-334, ocurrió una represión en la expresión del gene *Hmg2* (asociado a la síntesis de fitoalexinas), así como una sobreexpresión de *Hmg1* (isoforma del gen implicado en la regulación de síntesis de esteroides) a los 21 días después de la inoculación. Estas modificaciones en la expresión, se asociaron con la detección de hembras inmaduras y por lo tanto, con la inducción de sitios especializados de alimentación (Godinez-Vidal, 2010; Godinez-Vidal *et al.*, 2008a, 2008b).

Esteroides y brasinoesteroides en plantas

Los esteroides son metabolitos primarios de naturaleza lipídica sintetizados por medio de la ruta de los isoprenoides, donde se producen también una gran diversidad de metabolitos secundarios. Se estima que los tejidos vegetales contienen una cantidad media de 1-3 mg de esteroides por gramo de peso seco (Schaller, 2004).

Los esteroides presentes en las células vegetales tienen dos particularidades interesantes en comparación con los de animales y hongos: la primera es que contienen varios productos finales, tales como campesterol, sitoesterol, estigmaesterol e isofucoesterol, en proporciones definidas genéticamente; en contraste con el perfil de esteroides en animales constituido únicamente por colesterol (Benveniste, 1986). La segunda diferencia consiste en las diferencias entre el sistema de biosíntesis que va desde el escualeno al colesterol y

ergosterol en animales y hongos, respectivamente, y a la síntesis de sitoesterol a partir de escualeno en plantas (Dufoure, 2008; Schaller, 2004)

Los esteroides tienen múltiples funciones, son constituyentes de la membrana celular donde su concentración es similar a la de los fosfolípidos, regulan la fluidez y permeabilidad de la membrana, participan en procesos biológicos como la transducciones de señales, diferenciación celular, reorganización del citoesqueleto y crecimiento asimétrico (Dufoure, 2008).

Los esteroides son también precursores de compuestos con una alta actividad fisiológica tales como los brasinoesteroides, una clase importante de hormonas involucradas en el desarrollo y crecimiento de plantas superiores (Schaller, 2004, 2003; Li *et al.*, 1996). Se ha demostrado que la estimulación fisiológica inducida por los brasinoesteroides, puede llegar a inducir un aumento en la resistencia de las plantas a una gran variedad de tipos de estrés, tanto bióticos (Khripach *et al.*, 2000) como abióticos (temperatura, sales y sequía) (Krishna, 2003). Por ejemplo, la aplicación de brasinoesteroides (brasinolido, 24-epibrasinolido, y 28-homo-brasinolido) en plantas de papa redujo el nivel de infección por *Phytophthora infestans* hasta en un 40%, y en algunos casos, el efecto de estos compuestos contra el oomiceto fue superior al obtenido con fungicidas convencionales (Khripach *et al.*, 1996). Las respuestas inducidas en papa por los brasinosteroides se asociaron con un aumento en los niveles de ácido abscísico (ABA), etileno y con la presencia de compuestos de defensa como fenoles y terpenoides; y en plantas de pepino el aumento en la resistencia a *P. infestans* se relacionó con un incremento en la actividad de peroxidasas y polifenoloxidasas (Khripach *et al.*, 2000). Krishna (2003), sugiere que los brasinoesteroides tienen uso potencial como fungicidas; sin embargo,

señala la necesidad de una mayor investigación que permita determinar las concentraciones adecuadas, así como definir los estados de desarrollo de la planta donde se puedan utilizar, pues un uso inadecuado tendría el efecto contrario al estimular el crecimiento del patógeno y por lo tanto el progreso de la enfermedad.

Escualeno sintasa (SS) y cicloartenol sintasa (CAS): enzimas clave en la síntesis de esteroides

Los esteroides son sintetizados mediante la vía de los isoprenoides; escualeno sintasa (SS) se considera la enzima clave en su regulación, pues dirige el flujo de carbonos hacia la biosíntesis de esteroides (Busquets *et al.* 2008). SS cataliza la condensación de dos moléculas de farnesil difosfato (FPP) en presencia de Mg^{+2} o Mn^{+2} como cofactor, proceso que deriva en la síntesis de escualeno (Jarsfter *et al.*, 2002), un compuesto de 30 carbonos. Su actividad se ha localizado en el retículo endoplásmico liso, donde se ancla la porción terminal carboxi de la proteína SS, mientras que la porción terminal amino que corresponde al sitio catalítico de la enzima se localiza en la cara citoplasmática del retículo endoplásmico (Busquets *et al.*, 2008; Devarenne *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 1993).

Al inocular células de tabaco con fragmentos de paredes celulares de *Phytophthora parasitica*, se indujo una represión en la síntesis de la enzima SS y una fuerte disminución de su actividad enzimática que se reflejó en una reducción en la acumulación de esteroides (Vögeli y Chappell, 1988). Este tipo de respuesta fisiológica se ha asociado con el incremento en la actividad de la sesquiterpeno ciclasa (SC), enzima que desvía la ruta hacia la biosíntesis de compuestos sesquiterpénicos, algunos de los cuales poseen propiedades

antimicrobianas (Devarenne *et al.*, 2002; Vögeli y Chappell, 1988). Resultados similares se encontraron al inocular papa con aislamientos no patogénicos de *P. infestans* o ácido araquidónico producidos por el mismo oomiceto (Zook y Kud, 1991). Estos resultados indican una respuesta coordinada entre SC y SS, que permite desviar la ruta de los isoprenoides, relacionada con la producción de esteroides a la de sesquiterpenos durante interacciones incompatibles.

Jung-Hoon *et al.* (2002), determinaron que el ADNc del gen SS en Chile, posee 1,674 pb con un marco de lectura de 411 aminoácidos y que al menos existen dos copias en el genoma de Chile. Además observaron que al estimular hojas de Chile con luz UV los niveles de transcripción y de actividad enzimática se redujeron ligeramente, mientras que la transcripción y la actividad enzimática de sesquiterpeno ciclasa se indujo rápidamente.

Más abajo en la ruta de los isoprenoides (Fig. 1) se encuentra la enzima cicloartenol sintasa (CAS), que convierte el oxidoescualeno en cicloartenol, el primer compuesto intermediario en la ruta de los esteroides en plantas (Franca *et al.*, 2001). Por lo tanto, el metabolismo del cicloartenol tiene como resultado la síntesis de esteroides vegetales, siendo los principales el sitoesterol y el estigmaesterol, que en conjunto constituyen a menudo más del 70 % de los esteroides totales (Arnqvist *et al.*, 2003).

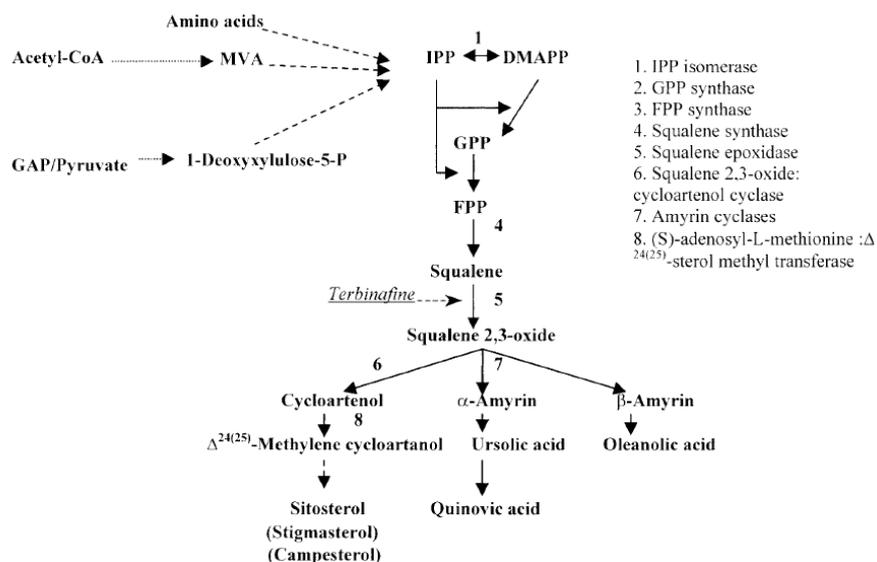


Fig. 1. Resumen de la ruta de los isoprenoides, dirigida hacia la producción de esteroides en plantas (Flores-Sánchez *et al.*, 2003)

Fitoesteroides: compuestos esenciales para los nematodos fitopatógenos

Los nematodos parásitos de plantas no sintetizan sus propios esteroides, por lo que, deben tomarlos de su hospedante, pues son incapaces de reproducirse sin estos compuestos (Chitwood, 1998; Chitwood y Lusby, 1991). Se considera que los esteroides que pueden satisfacer los requerimientos de los nematodos poseen un grupo hidroxilo en el carbono-3, un sistema de anillo *trans*-A/B, una cadena lateral no hidroxilada, y ausencia de grupos metilo en el carbono-4 (Chitwood *et al.*, 1987).

Los esteroides presentes en las plantas difieren de los de animales en que los primeros poseen metil, etil o sustitutos afines en la posición del carbono-24 de la cadena lateral del esteroide. La comparación en la composición de los esteroides de nematodos fitopatógenos y sus plantas hospedantes, indican que el nematodo induce dos principales transformaciones metabólicas de estos compuestos: la eliminación (desalquilación) de la cadena lateral del Carbono-24 y la saturación de dobles enlaces en el sistema de anillos para producir estanoles (Chitwood, 1999, 1998).

***Meloidogyne* spp.**

Meloidogyne (Göldi, 1892) es el género en el que se encuentra ubicado el grupo de nematodos fitopatógenos conocidos como agalladores o noduladores. Su elevada capacidad de adaptación le ha permitido parasitar a más de 2000 especies de plantas superiores alrededor del mundo. Este grupo de parásitos obligados es uno de los mayores obstáculos para la producción agrícola del mundo (Baicheva *et al.*, 2002; Sasser, 1980).

Estos parásitos poseen un ritmo acelerado de desarrollo, capacidad de reproducción partenogenética, que les permiten producir varias generaciones en una temporada agrícola, ocasionando graves daños al cultivo. Los síntomas inducidos por estos nematodos, incluyen un retraso del crecimiento, falta de vigor y marchitez por estrés hídrico (De Waele y Elsen, 2007).

Las especies de *Meloidogyne* establecen una interesante y muy compleja interacción con su hospedante. Por lo general, se alimentan de células vivas modificadas en raíces de las plantas, donde inducen la formación de agallas. Estas células transformadas son los denominados sitios permanentes de alimentación y se les conoce como células gigantes, las cuales son multinucleadas y contienen hasta 80 núcleos cada una, además cada núcleo es polinucleolado (con un aumento de hasta ocho veces el número de cromosomas). Estos y muchos otros cambios inducidos por la infección de *Meloidogyne* se atribuyen a los cambios en los niveles de expresión de genes, induciendo la sobre expresión de algunos y reprimiendo la expresión de otros (Moens *et al.*, 2009; Govere *et al.*, 2000).

Las hembras del género *Meloidogyne* ponen sus huevecillos en masas gelatinosas compuesta principalmente por una glicoproteína producida por las

glándulas rectales del nematodo. Esta masa gelatinosa protege a los huevecillos de ambientes inadecuados y de sus depredadores. El primer estadio juvenil (J1) se encuentra dentro del huevecillo, donde realiza su primera muda para convertirse en J2. El J2 emerge cuando se encuentra completamente desarrollado y existen las condiciones de temperatura, humedad y hospedante. Los J2 son atraídos hacia las raíces de sus hospedantes, y en general se considera que prefieren invadir la región anterior a la punta de la raíz. Los J2 se introducen en la raíz y se ubican en las células del protoxilema y protofloema (generalmente de 5 a 7 células) en donde inyectan proteínas secretadas por sus glándulas esofágicas, inician su alimentación e inducen su diferenciación para lograr establecer el sitio especializado de alimentación. El nematodo entonces se vuelve sedentario. Bajo condiciones óptimas la muda de J2 a J3 ocurre después de 14 días; al poco tiempo muda a J4, y finalmente llega a la etapa adulta. El tiempo transcurrido en estadios J3 y J4 es muy corto, y durante estos estadios el nematodo carece de un estilete funcional, por lo que, no se puede alimentar. Los machos, cuando están presentes, son vermiformes y no hay evidencia de que se alimenten; se pueden encontrar en especies partenogénéticas, cuando las condiciones no son favorables para el desarrollo de hembras (Moens *et al.*, 2009; Baicheva *et al.*, 2002; Hussey *et al.*, 1994).

Durante interacciones incompatibles planta-*Meloidogyne*, la resistencia del material se ha asociado con una explosión oxidativa, producida rápidamente una vez que el nematodo penetra. Esta respuesta es sumamente compleja y participan diferentes compuestos, como el ácido ascórbico; seguido de

respuesta hipersensitiva, así como, la presencia y acumulación de compuesto fenólicos (Hyo *et al.*, 2010; Melillo *et al.*, 2006; Pegard *et al.*, 2005).

Nacobbus aberrans

Los nematodos del género *Nacobbus* Thorne y Allen, 1944, son conocidos también como nematodos falsos agalladores. Son endoparásitos sedentarios y las hembras maduras inducen la formación de agallas en su hospedante. Se encuentran distribuidos principalmente en norte y sur América. Actualmente y desde 1970, se considera que el género contiene sólo dos especies válidas: *Nacobbus dorsalis* Thorne y Allen, 1944 y *N. aberrans* (Thorne, 1935), esta última especie se considera un parásito importante en cultivos como frijol, chile, papa, tomate y remolacha azucarera, en los que ocasiona importantes pérdidas económicas (Vovlas *et al.*, 2007; Manzanilla-López, 1997; Sher, 1970).

N. aberrans tiene una alta capacidad reproductiva y un amplio rango de hospedantes, debido a que es capaz de adaptarse a diversas condiciones climáticas; convirtiéndose en un parásito muy importante y difícil de controlar (Manzanilla-López, 1999).

El ciclo de vida de *N. aberrans* se inicia cuando la hembra secreta una matriz gelatinosa, en la que deposita sus huevecillos. La primera etapa juvenil (J1) se desarrolla dentro del huevo, donde realiza su primera muda. Después de eclosionar, el J2 penetra la raíz, donde puede permanecer o salir para volver a entrar en la misma (Manzanilla-López, 1999; Clark, 1967). El J2 puede mudar dentro de la raíz o en el suelo, mientras que el J3 es menos activo y tiende a permanecer en forma de "C" en la corteza de la raíz. La muda del cuarto estadio juvenil femenino o masculino (J4) puede ocurrir en la raíz o en el suelo, sin embargo, se asocia más al J4 masculino con la corteza de la raíz

(Manzanilla-López *et al.*, 2002). Al mudar el J4 femenino, emerge la hembra inmadura que migra a las células adyacentes al sistema vascular, donde establecen su sitio especializado de alimentación (sincitio) que posee forma de huso y está formado por una masa de células alteradas fuertemente en su organización celular (Clark, 1967). El sincitio puede llegar a medir de 2 a 8 mm (Finetti, 1990). Estos cambios estructurales producto de fuertes cambios metabólicos derivan finalmente en la formación de agallas radicales, lo que coincide con la aparición de la hembra adulta sedentaria (Manzanilla-López, 1997). Los machos adultos se encuentran en raíces o en el suelo y la fertilización ocurre generalmente después de que la hembra se logra establecer en la raíz (Manzanilla-López, 1997). La hembra sedentaria acumula lípidos y produce una matriz gelatinosa que atrae a los machos. Los machos se pueden encontrar en la masa de huevecillos o en la agalla cerca de la hembra y el número de huevecillos por saco varía de 37 a 833.

Durante sus distintos estadios juveniles, así como en su estado adulto, *N. aberrans* induce una serie de cambios estructurales, químicos y fisiológicos que tienen como resultado modificaciones celulares e histológicas en las raíces afectadas (Manzanilla-López *et al.*, 2002). El J2 invade la corteza radical intracelularmente, destruyendo hasta el 50 % del tejido. Los juveniles J3 y J4 por lo general se encuentran en el interior de los tejidos radicales (Manzanilla-López *et al.*, 1999). Las etapas juveniles de *N. aberrans* pueden llegar a inducir el deterioro y muerte de raíces pequeñas (Schuster, 1965). Las hembras inmaduras se asocian con daños en el sistema vascular, mediante la inducción de hipertrofia e hiperplasia (Castillo, 1984). El establecimiento permanente de

la hembra estimula mitosis en el periciclo y la formación de raíces laterales en áreas agalladas (Manzanilla-López *et al.*, 2002)

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento de los experimentos

Se realizaron tres experimentos y en cada uno de ellos se establecieron tres tratamientos con plántulas de chile CM-334: 1) Plantas inoculadas con 500 J2 de *M. incognita*, 2) Plantas inoculadas con 500 J2 de *N. aberrans*, y 3) Plantas no inoculadas. El inóculo de *N. aberrans* se obtuvo a partir de raíces de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) con niveles altos de agallamiento, producido en un suelo infestado naturalmente con el nematodo en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Edo. de México (Fig. 2). El inóculo de *M. incognita* para el primer y segundo experimentos, se obtuvo a partir de raíces agalladas de tomate y malezas colectadas en una plantación en Yurécuaro, Michoacán. Para el tercer experimento, el inóculo de *M. incognita* se obtuvo a partir de raíces de frijol cultivado en Los Mochis, Sinaloa (Fig. 3).

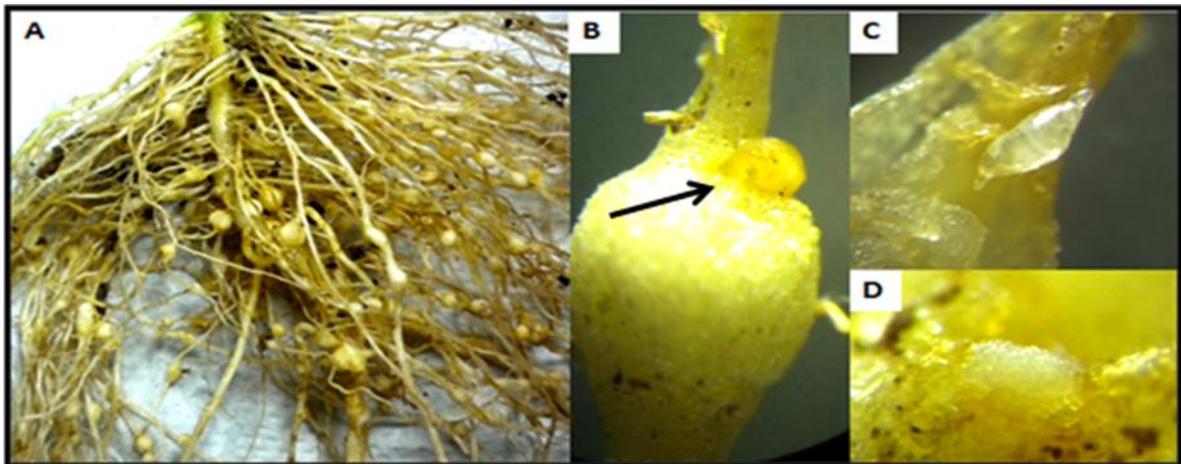


Fig. 2. Fuente de inóculo de *N. aberrans*. A) Raíces de tomate agalladas, B) masa de huevecillos, C) hembra madura dentro de agalla, y D) huevecillos.

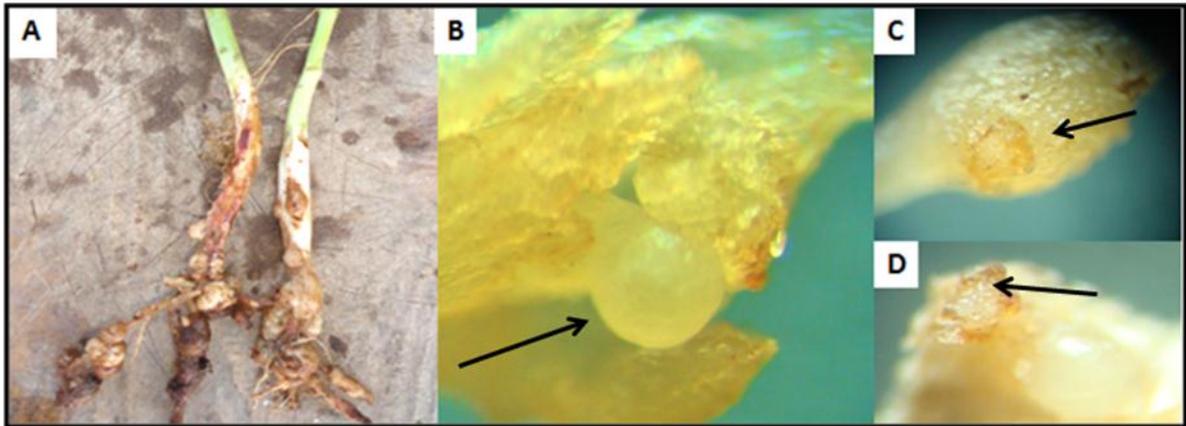


Fig. 3. Fuente de inóculo de *M. incognita*. A) Raíces de frijol agalladas, B) hembra madura, C) masa de huevecillos, y D) huevecillos.

Producción de plantas de chile CM-334

Semillas de chile CM-334 se desinfectaron con hipoclorito de sodio (1%) durante 3 min y se pasaron a agua destilada estéril. Se pusieron a germinar en cajas Petri estériles con papel absorbente esterilizado humedecido con agua destilada estéril y se incubaron a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Las semillas germinadas se transfirieron a macetas pequeñas de plástico con 25 cm^3 de arena fina estéril. Las plántulas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con un fotoperíodo de 14 h luz y 10 de oscuridad. El riego se realizó cada 24 h con agua estéril y se fertilizó una vez a la semana con Nitrofoska [(12-12-12-2; N-P-K-Mg): 620 g diluido en 20 L de agua, y éste diluido 10 veces en agua estéril]. Las plantas se utilizaron cuando tuvieron de 4-6 hojas verdaderas para establecer los experimentos.

Obtención del inóculo

El inóculo utilizado en los experimento consistió de juveniles de segundo estadio (J2) de cada uno de los nematodos (*M. incognita* y *N. aberrans*). Los huevecillos de los correspondientes nematodos se obtuvieron de las raíces agalladas mediante el método de extracción propuesto por Vrain (1977). Los

huevecillos obtenidos se incubaron a 28°C en cajas Petri con agua destilada estéril hasta su eclosión.

Evaluación de experimentos

En los experimentos 1 y 2 se evaluó la expresión génica de *SS* y *CAS*. De cada tratamiento se tomaron 20 plantas de chile CM-334 a los 2, 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación (ddi) se les cortaron las raíces, se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C. En los tres experimentos se cuantificó el número de nematodos dentro de cada raíz en cinco plantas de cada tratamiento y tiempo; se consideraron también los tiempos 35 y 42 ddi. Las raíces se tiñeron con fucsina ácida (Hussey, 1987) para su posterior cuantificación en microscopio compuesto (Fig. 4).

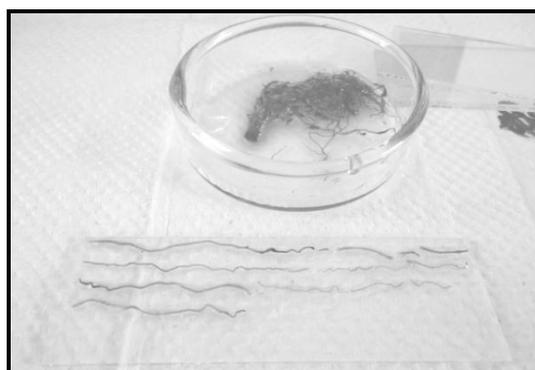


Fig. 4. Montaje de raíces teñidas con fucsina ácida.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se extrajo el ARN total a partir de 0.5 g de tejido congelado, utilizando el Kit RNeasy® (QIAGEN) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La integridad del ARN se verificó en gel de agarosa desnaturalizante al 1.2 % y la concentración obtenida se midió en un Nanodrop®.

La síntesis de ADNc se realizó en dos pasos: 1) Se preparó una mezcla de reacción conteniendo 2 µg de ARN total y 0.4 µL de oligo dT (Invitrogen®); la mezcla se aforó a un volumen de 12 µL con agua libre de ARNsas y ADNsas,

se incubó a 70°C por 10 min y se colocó en hielo; 2) a la mezcla de reacción se le adicionaron 8 µL de una solución con 4 µL de amortiguador 5x para retrotranscripción, 2 µL de ditiotretitol (0.1 M), 1 µL dNTP mix (10 mM) y 1 µL de retrotranscriptasa (M-MLV Reverse transcriptase-Promega®). La mezcla se colocó en un termociclador (BIO-RAD®) durante 60 min a 37°C y posteriormente a 70°C durante 10 min.

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para el gen *SS* se diseñaron a partir de la secuencia de ADNc del mismo gen en Chile (GenBank de NCBI: AF124842.1). Los iniciadores para el gen *CAS*, se diseñaron a partir del ADNc del mismo gen pero en tomate (GenBank de NCBI: EU449280.1). Los diseños se realizaron utilizando los programas Oligo Analyzer 3.1, Primer3 (versión 0.4.0.) y la opción Primer Select del programa DNASTAR® (Cuadro 1). El gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) se usó como gen de expresión constitutiva para normalizar la expresión (Fernández-Herrera, 2011).

PCR en tiempo real

Se realizó PCR en tiempo real en un sistema estándar de PCR en tiempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) a partir de la siguiente mezcla de reacción: 2.5 µL de buffer 10 X para PCR, 1.5 mM de MgCl₂, 10 pm de cada iniciador, 2 mM de dNTP mix, 1 µL de una dilución 1:6,000 de SYBR® Green (Molecular Probe, Eugene, OR), 10 nM de fluoresceína, 1 µL de ADNc (300 ng), 0.125 µL de Amplificasa (Biogenica®) y se aforó a un volumen de 25 µL con agua libre de ARNsas y ADNsas. Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 4 min, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 20 s, 60° 20 s y una fase de extensión a 72° durante 35 s. Las plantas

no inoculadas representaron la expresión 1x del gen de interés. El cálculo de la expresión relativa de cada gen se realizó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Para cada tratamiento se realizaron seis repeticiones por tiempo evaluado con muestras de ADNc independiente.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica de los genes SS y CAS.

Gen	Nombre	Secuencia del iniciador (5´- 3´)	Amplicon
Escualeno sintasa (SS)	SSFW SSRV	GAGGTGGAAACAACCGATGA CTGGACTGTAAGTAGGCTCGCTCT	697 pb
Cicloartenol sintasa (CAS)	CASFW CASRV	TATTGAGAGCCACAGCACCA GGAGTGATAGGACCAACAAAGC	336 pb
Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GAPDH)	GLIFW* GLIRV*	GGCCTTATGACTACAGTTCACTCC GATCAACCACAGAGACATCCACAG	217 pb

* Oligos diseñados por Fernández-Herrera (2011).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de expresión génica y de los conteos de nematodos se sometieron a análisis de varianza en un modelo completamente al azar (SAS ®) y cuando éste detectó diferencias significativas, la comparación de medias de tratamientos se realizó con prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Infección de chile CM-334 por *N. aberrans* y *M. incognita*

El comportamiento de *N. aberrans* mostró la misma tendencia en los tres experimentos realizados (Fig. 5). Desde los 2 dpi se observó la penetración del nematodo a las raíces de CM-334; sin embargo, la mayor cantidad de nematodos se observó a los 7 y 14 ddi con valores de 79 y 48 individuos por raíz, respectivamente (Fig. 5). Se apreciaron J2 con hábitos gregarios y en la región de elongación de las raíces (Fig. 6). En los tiempos posteriores (21, 28, 35 y 42 ddi) se detectó una disminución considerable en la cantidad de nematodos (Fig. 5), los cuales se encontraron generalmente de forma individual y a lo largo de la raíz, ya no sólo en la región de elongación.

A los 21 y 28 ddi, fueron evidentes los cambios morfológicos del nematodo con la típica postura en forma de "C", ubicándose preferentemente cerca de la corteza radical, lo cual es característico del J3 (Fig. 6).

A los 35 ddi, se apreciaron nematodos con características muy similares a las descritas anteriormente, pero ubicados muy cerca de los haces vasculares y probablemente correspondan a los J4 y/o hembras inmaduras. En estas regiones se apreciaron ensanchamientos en la raíz (Fig. 6).

En el último muestreo, realizado a los 42 ddi, se detectaron agallas desarrolladas, hembras maduras y la producción de masas de huevecillos (Fig. 6).

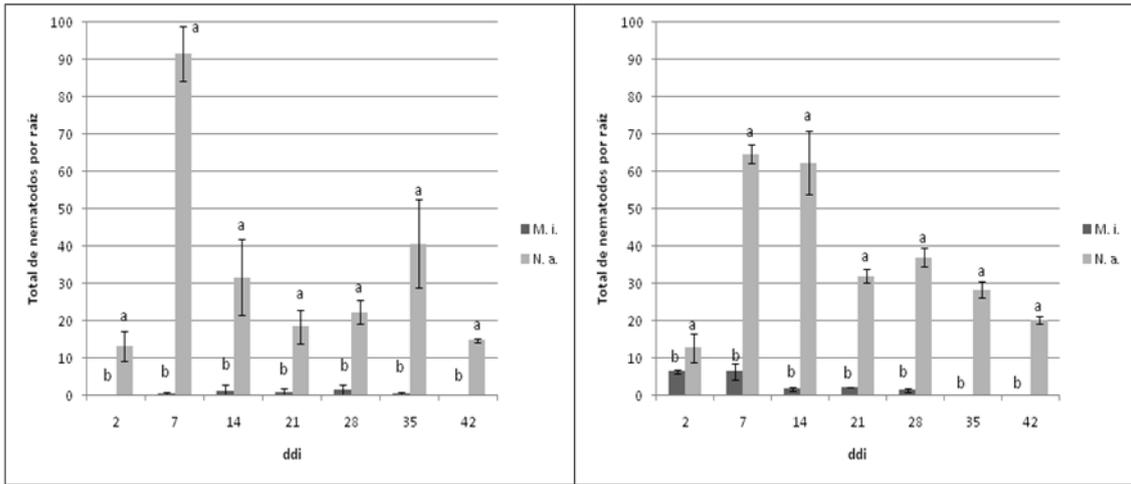


Fig. 5. Número de individuos de *N. aberrans* y *M. incognita* dentro de raíces de chile CM-334. A) Experimentos 1 y 2. B) Experimento 3. Cada barra representa el promedio de cinco raíces analizadas y la línea en cada barra representa la desviación estándar. Para cada tiempo, barras con letra diferente son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

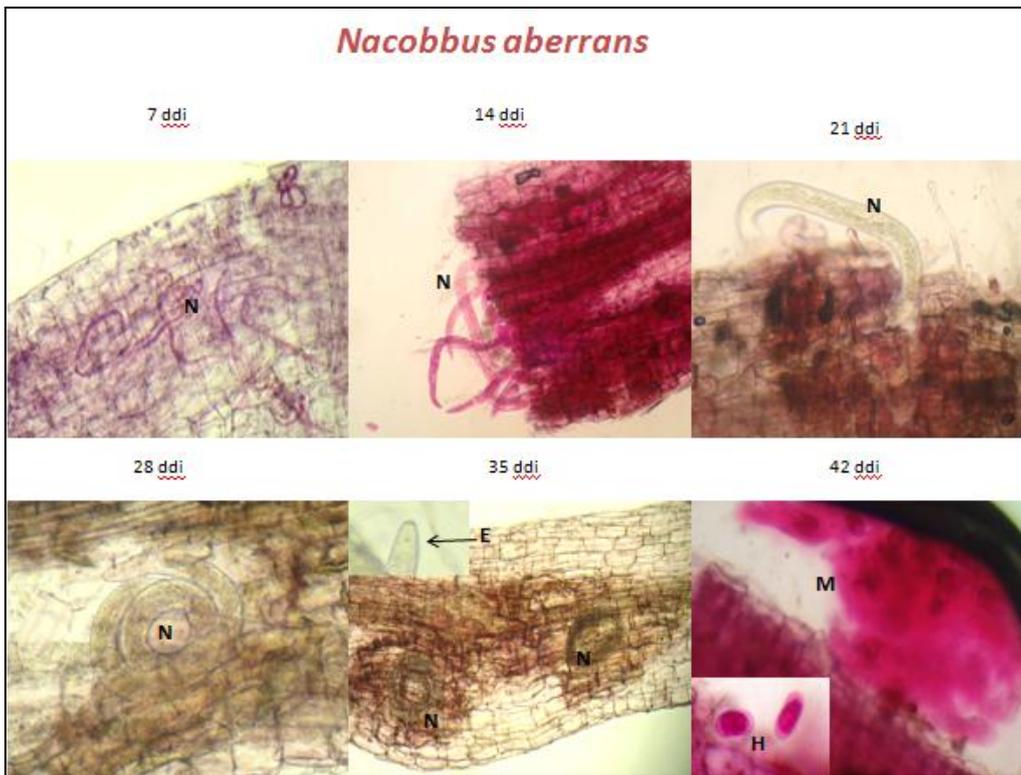


Fig. 6. Desarrollo de *N. aberrans* a través del tiempo en raíces de chile CM-334. N= nematodo, M= masa de huevecillo, H= huevecillos, E= estilete.

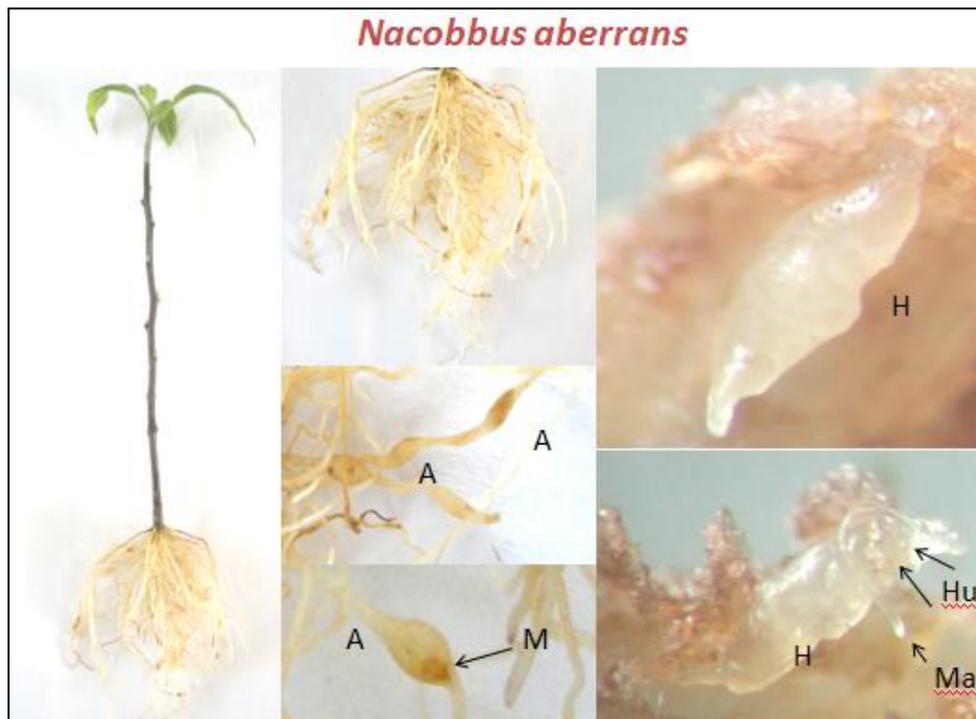


Fig. 7. Plantas de CM-334 60 ddi con *N. aberrans*, del tercer experimento. A= agalla, M= masa de huevecillos, H= hembra adulta, Hu= huevecillos, Ma= macho vermiforme.

En contraste con lo observado para *N. aberrans*, la penetración de raíces en chile CM-334 por *M. incognita* fue muy baja, solamente penetró el 2% de los nematodos inoculados. La mayoría de estos nematodos presentaron características correspondientes al estado J2. Durante los distintos muestreos y en los tres experimentos realizados, no se observaron hembras adultas ni huevecillos de *M. incognita* en raíces de CM-334. En las raíces infectadas por este nematodo se observaron de manera consistente áreas necróticas muy cercanas a los nematodos y en los sitios de penetración (Fig. 8).

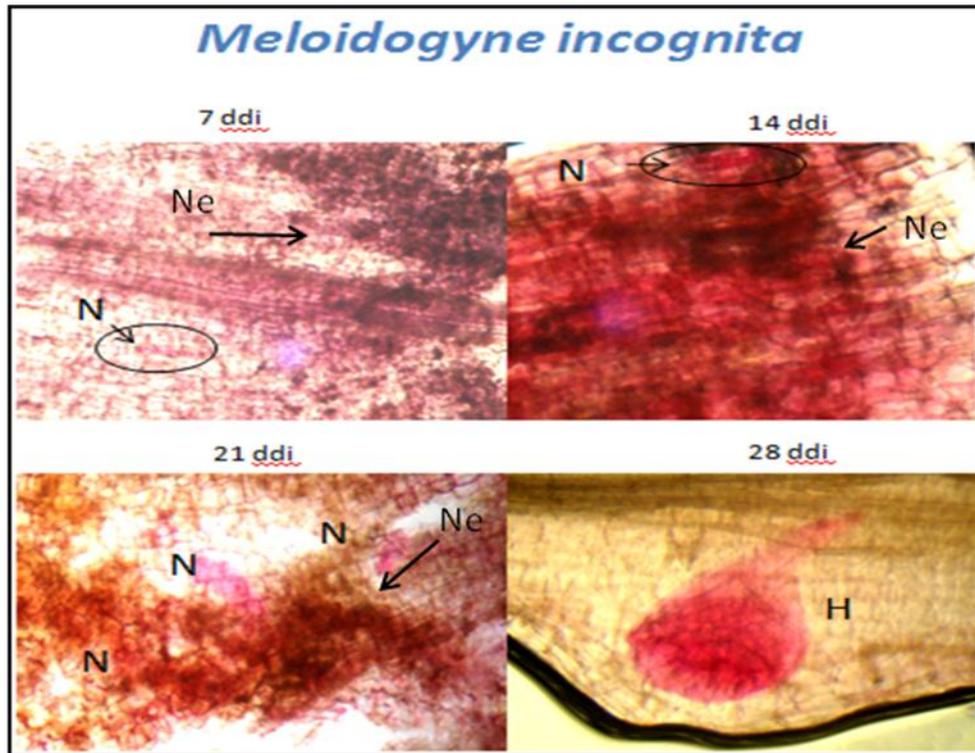


Fig. 8. Regiones necróticas en raíces de CM-334 asociadas con *M. incognita* a distintos tiempos. N= nematodo, H= hembra inmadura, Ne= necrosis.

Expresión relativa de los genes SS y CAS

La acumulación relativa de transcritos del gen SS en las raíces de plantas inoculadas con alguno de los dos nematodos fue significativamente mayor en comparación con la del testigo sin inocular (Fig. 9). La mayor acumulación de transcritos de SS se detectó a los 7 ddi y la menor a los 2 ddi (Fig. 9). Aunque la presencia de ambos nematodos se asoció con un incremento en la expresión, entre ellos se detectaron diferencias marcadas en los niveles de expresión relativa de SS; así durante todos los tiempos de muestreo en plantas inoculadas con *N. aberrans* hubo mayor expresión, en comparación con las inoculadas con *M. incognita*.

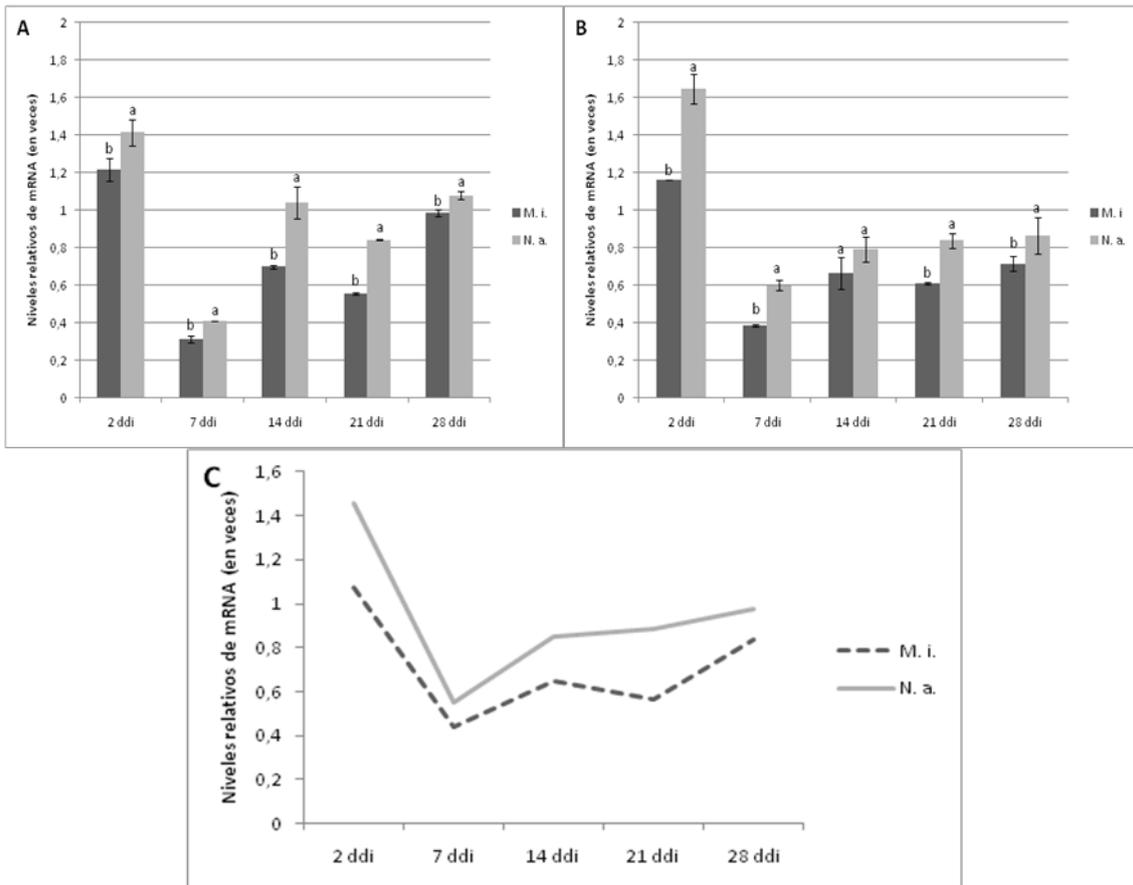


Fig. 9. Niveles relativos de expresión del gen SS en raíces durante la interacción compatible Chile CM-334-*N. aberrans* y la incompatible Chile CM-334-*M. incognita*, en veces con respecto al testigo sin inocular. Cada barra representa el promedio de seis repeticiones y la línea en cada barra representa la desviación estándar. Para cada tiempo, barras con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). C) Tendencias de expresión en ambos experimentos, cada punto representa el promedio de 12 repeticiones.

De manera similar a lo observado para el gen SS, en ambas interacciones planta-nematodo se detectó un aumento en la acumulación de transcritos de CAS con respecto al testigo sin inocular (Fig. 10). En todos los tiempos evaluados, con excepción del muestro realizado a los 14 ddi, las plantas inoculadas con *M. incognita* mostraron un incremento mayor en la expresión relativa de CAS en comparación con las inoculadas con *N. aberrans*. A los 14 ddi la mayor expresión relativa de CAS se registró en raíces infectadas con *N. aberrans*. Los niveles relativos de expresión más elevados (dos veces con respecto al testigo) se detectaron a los 2 y 28 ddi en el tratamiento inoculado con *M. incognita* (Fig. 10).

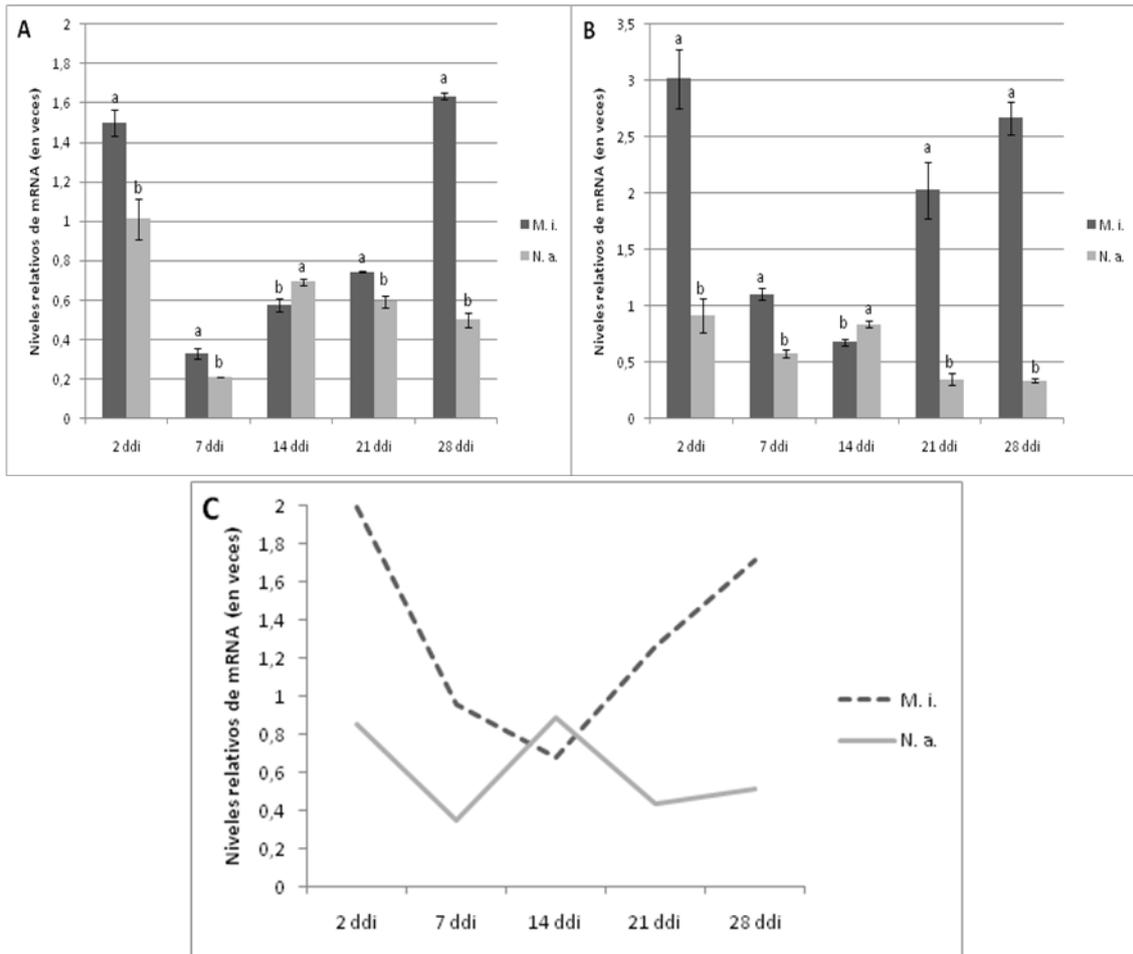


Fig. 10. Niveles relativos de expresión del gen CAS, en raíces de chile CM-334 durante la interacción compatible chile CM-334-*N. aberrans* y la incompatible chile CM-334-*M. incognita*, en veces con respecto al testigo sin inocular. Cada barra representa el promedio de seis repeticiones y la línea en cada barra representa la desviación estándar. Para cada tiempo, barras con diferente letra son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). C) Tendencias de expresión en ambos experimentos, cada punto representa el promedio de 12 repeticiones.

Discusión

En el presente trabajo se le dio seguimiento al desarrollo de *N. aberrans* y *M. incognita* en su interacción compatible (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 1996) e incompatible con el material de Chile CM-334 (Pegard *et al.*, 2005), respectivamente. La capacidad infectiva de *N. aberrans* se evidenció por los porcentajes de penetración a los 7 y 14 ddi (15.8 y 9.6%, respectivamente), valores relativamente similares (12.65 y 13.65%) a los reportados con anterioridad por Godínez-Vidal (2010). En general el comportamiento y desarrollo observado coincide con el descrito por Manzanilla-López *et al.* (2002) en la interacción tomate-*N. aberrans*. En contraste, durante la interacción incompatible CM-334-*M. incognita* sólo el 2% de los juveniles inoculados penetraron las raíces; valor similar al consignado por Pegard *et al.* (2005) durante la misma interacción.

Los juveniles de *M. incognita* que lograron penetrar la raíz de CM-334 no pasaron al siguiente estadio de desarrollo. En relación con las regiones necróticas localizadas alrededor de los J2 de *M. incognita*, Pegard *et al.* (2005) sugieren que dicha respuesta es una reacción de defensa muy agresiva por parte de CM-334, que podría contribuir a generar un ambiente inadecuado para el nematodo. En contraste, en las plantas de CM-334 inoculadas con *N. aberrans*, no se observó la presencia de regiones necróticas.

La resistencia de CM-334 a *Meloidogyne* spp., se explicó por la presencia de barreras físicas en la raíz que dificultaron la penetración de los J2 (Moon *et al.*, 2010; Pegard *et al.*, 2005) y cuando los nematodos lograron penetrar su migración, desarrollo y reproducción fueron bloqueados por respuestas bioquímicas asociadas con la reacción de hipersensibilidad, destacando la

acumulación de compuestos fenólicos (Moon *et al.*, 2010; Pegard *et al.*, 2005). Resultados similares se encontraron durante la interacción del material UFV 408-28 de *Coffea arabica* y *M. incognita*, en donde las células radicales alrededor de los nematodos que lograron penetrar respondieron de forma hipersensitiva, se detectó la acumulación de compuestos fenólicos y las células mostraron un aspecto necrótico (Albuquerque *et al.*, 2010).

En interacciones de tipo compatible, *N. aberrans*, al igual que otros nematodos endoparásitos sedentarios, induce en su hospedante modificaciones metabólicas que generen un ambiente favorable para su desarrollo (Godínez-Vidal, 2010; Zavaleta-Mejía, 2009, 2002). Estas modificaciones, son el resultado de su capacidad para reprogramar genéticamente las células hospedantes, e inducir la formación de un sitio especializado de alimentación (Back *et al.*, 2002).

En la presente investigación se encontró una sobreexpresión de los genes *SS* y *CAS* en raíces infectadas por *N. aberrans*, tales genes codifican para enzimas clave en la ruta de biosíntesis de esteroides (Flores-Sánchez *et al.*, 2003), compuestos que son esenciales para el desarrollo y reproducción de nematodos fitoparásitos. Zinov'eva *et al.* (2004), determinaron que durante la interacción compatible *M. incognita-Solanum lycopersicum* L., hubo un incremento en el contenido total de esteroides, particularmente estigmasterol, compuesto esencial para el desarrollo de hembras y huevecillos. El hecho que *N. aberrans* se pueda establecer en plantas de chile CM-334, completar su desarrollo y producir huevecillos, podría estar relacionado con la presencia de cantidades adecuadas del tipo de esteroides requeridos por el patógeno. La sobreexpresión de los genes *SS* y *CAS* inducida por *N. aberrans*, podría ser

parte de las modificaciones a nivel de expresión génica que induce el nematodo, para proveerse de un ambiente adecuado que le permita desarrollarse y reproducirse. A su vez, las modificaciones inducidas por el nematodo podrían favorecer el establecimiento de *P. capsici*, ya que el oomiceto también es incapaz de producir sus propios esteroides (Moreau *et al.*, 1998). Así, la sobreexpresión de *SS* y *CAS*, inducida por *N. aberrans*, pudiera estar contribuyendo al fenómeno de rompimiento de resistencia a *P. capsici* en CM-334.

Cabe señalar que durante la interacción incompatible CM-334-*M. incognita*, también se detectó una sobreexpresión de los genes *SS* y *CAS* con respecto al testigo sin inocular; sin embargo, la penetración de juveniles en las raíces fue muy baja, su desarrollo fue limitado y la reproducción del nematodo fue nula. Es posible que durante esta interacción la sobreexpresión de dichos genes se haya canalizado hacia la síntesis de esteroides involucrados en la defensa, pues Sabater-Jara *et al.* (2010), sugieren que la acumulación de sitoesterol y campesterol están involucradas en respuestas de defensa en chile (*C. annuum* L.). Tanto la síntesis de sitoesterol, campesterol, y estigmaesterol, son regulados en primera instancia por la enzima escualeno sintasa (gen *SS*) y posteriormente por la cicloartenol sintasa (gen *CAS*) (Suzuki y Muranaka, 2007). La sobreexpresión de *SS* y *CAS* que se detectó en CM-334 durante la interacción incompatible, pudo haber dado lugar a la síntesis de los esteroides sitoesterol y campesterol, contribuyendo así a generar un ambiente inadecuado para el desarrollo de *M. incognita*. Por lo anterior, es de fundamental importancia llevar a cabo la determinación cualitativa y cuantitativa de los esteroides que se sintetizan en ambas interacciones.

Godinez-Vidal (2010), propuso la existencia de al menos dos isoformas del gen SS en el ADN de CM-334. La presencia de isoformas de este gen, permite especular que dependiendo del tipo de interacción, se estaría expresando una u otra isoforma del gen, que a su vez determinaría el tipo de compuesto que finalmente se sintetice. La canalización metabólica es el proceso que permite dirigir los intermediarios necesarios para la síntesis de un producto final específico, dependiendo de la isoforma del gen que se exprese (Winkel, 2004). Para el gen CAS no se han reportado isoformas en Chile (*C. annuum* L.).

Los resultados obtenidos indican que *N. aberrans* indujo una mayor sobreexpresión de SS en comparación con *M. incognita*, y una sobreexpresión de CAS, aunque en menor proporción que *M. incognita*. El aumento en la acumulación de transcritos de SS y CAS durante la interacción compatible CM-334-*N. aberrans* podría relacionarse con la síntesis de esteroides esenciales para el nematodo. Mientras, que la sobreexpresión detectada durante la interacción incompatible CM-334-*M. incognita* podría estar asociada con la síntesis de compuestos que generen un ambiente inadecuado para el establecimiento y desarrollo de *M. incognita*.

LITERATURA CITADA

- Abad, P., P. Castagnone-Sereno, M. Rosso, J. A. Engler, and B. Favery. 2009. Invasion, Feeding and Development. Pp. 163-181. In: Root-Knot Nematodes. R. N. Perry, M. Moens, y J. L. Starr, eds. CABI Publishing. UK.
- Albuquerque, E. V. S., R. M. D. G. Carneiro, P. M. Costa, A. C. M. M. Gomes, M. Santos, and M. F. Grossi-de-Sa. 2010. Resistance to *Meloidogyne incognita* expresses a hypersensitive-like response in *Coffea arabica*. European Journal of Plant Pathology 127:365-373.
- Andrés-Ares, J. L., A. Rivera-Martínez, and J. Fernández-Paz. 2005. Resistance of pepper germplasm to *Phytophthora capsici* isolates collected in northwest Spain. Spanish Journal of Agricultural Research 3:429-436.
- Arnqvist, L., P. C. Dutta, L. Jonsson, and F. Sitbon. 2003. Reduction of cholesterol and glycoalkaloid levels in transgenic potato plants by overexpression of a type 1 sterol methyltransferase cDNA. Plant Physiology 131:1792-1799.
- ASERCA. 1998. El chile verde y su trascendencia cultural. Claridades agropecuarias 56, 3-40.
- Back, M. A., P. P. J. Haydock, and P. Jenkinson. 2002. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. Plant Pathology 51: 683-697.
- Baicheva, O., D. Salkova, and G. Palazova. 2002. Root-knot nematodes (*Meloidogyne*, Goeldi, 1887) – species composition, pathogenicity, some problems for investigation. Experimental Pathology and Parasitology 5:21-24.
- Baum, T. J., R. S. Hussey, and E. L. Davis. 2007. Root-Knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism. Genetic Engineering 28:17-43.
- Benveniste, P. 1986. Sterol metabolism. Annual Review of Plant Physiology 37:275-307.
- Boiteux, L. S., F. P. Cupertino, C. Silva, A. N. Dusi, D. C. Monte-Neshich, R. A. Van der Vlugt, and M. E. Fonseca. 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.
- Bonnet, J., S. Danan, C. Boudet, L. Barchi, A. Sage-Palloix, B. Caromel, A. Palloix, and V. Lefebvre. 2007. Are the polygenic architectures of resistance to

- Phytophthora capsici* and *P. parasitica* independent in pepper?. Theoretical and Applied Genetics 115:253-264.
- Bowman, P., and J. R. Bloom. 1966. Breaking the resistance of tomato varieties to *Fusarium* wilt by *Meloidogyne incognita*. Phytopathology 56: 871.
- Busquets, A., V. Keim, M. Closa, A. Del-Arco, A. Boronat, M. Arró, and A. Ferrer. 2008. *Arabidopsis thaliana* contains a single gene encoding squalene synthase. Plant Molecular Biology 67:25-36.
- Castillo, P.G., y N. Marbán-Méndoza. 1984. Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen 1944 en raíces de *Capsicum annuum* y *C. baccatum*. Agrociencia 56:85-93.
- Chappell, J., C. Vonlanken, U. Vogeli, and P. Bhatt. 1989. Sterol and sesquiterpenoid biosynthesis during a growth-cycle of tobacco cell suspension cultures. Plant Cell Reports 8:48–52.
- Chitwood, D. J. 1998. Biosynthesis. In: The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes. Pp. 303-329. R. N. Perry, y D. J. Wright, eds. CAB INTERNATIONAL. USA.
- Chitwood, D. J. 1999. Biochemistry and function of nematode steroids. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 34:273-384.
- Chitwood, D. J., M. A. McClure, M. F. Feldlaufer, W. R. Lusby, and J. E. Oliver. 1987. Sterol composition and ecdysteroid content of eggs of the root-knot Nematodes *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. Journal of Nematology 19:352-360.
- Chitwood, D. J., and W. R. Lusby. 1991. Metabolism of plant sterols by nematodes. Lipids 26: 619-627.
- Clark, S. A. 1967. The development and life history of the false root-knot nematode, *Nacobbus serendipiticus*. Nematologica 13:91-101.
- Corey, E. J., P. T. Matsuda, and B. Bartel. 1993. Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90:11628-11632.
- De Waele, D., and A. Elsen. 2007. Challenges in tropical nematology. Annual Review of Phytopathology 45:457-485.

- Devarenne, T. P., A. Ghosh, and J. Chappell. 2002. Regulation of squalene synthase, a key enzyme of sterol biosynthesis, in tobacco. *Plant Physiology* 129:1095-1106.
- Djian-Caporalino, C., L. Pijarowski, A. Januel, V. Lefebvre, A. Daubèze, A. Palloix, A. Dalmasso, and P. Abad. 1999. Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heat-stable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 99:496-506.
- Dufoure, E. J. 2008. Sterols and membrane dynamics. *Journal of Chemical Biology* 1:63-77.
- Echer, M. M., and C. P. Costa. 2002. Reaction of sweet pepper to the Potato Virus Y (PVY^m). *Scientia Agricola* 59:309-314.
- Edwards, P. E., and J. Ericsson. 1999. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annual Review of Biochemistry* 68:157-185.
- Fernández-Herrera, E. 2011. Genes de defensa, actividad enzimática y contenido de capsidiol en chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* e infectado por *Nacobbus aberrans*. Tesis de Doctorado en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, México. 84 pp.
- Fernández-Pavia, S., and C. Liddell. 1997. Resistance of *Capsicum annuum* CM-334 to *Phytophthora* root rot and phenol biosynthesis. *Phytopathology* 87:529.
- Finetti, S. M. 1990. Histopathological changes induced by *Nacobbus aberrans* in resistant and susceptible potato roots. *Revue de Nematologie* 13:155-160.
- Flores-Sánchez, I. J., J. Ortega-López, M. C. Montes-Horcasitas, and A. C. Ramos-Valdivia. 2003. Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Plant and Cell Physiology* 43:1502-1509.
- Franca, S. C., P. G. Roberto, M. A. Marins, R. D. Puga, A. Rodríguez, and J. O. Pereira. 2001. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. *Genetics and Molecular Biology*. 24:243-250.
- Gheysen, G. and C. Fenoll. 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology* 40:191-219.
- Glosier, B. R., E. A. Ogundiwin, G. S. Sidhu, D. R. Sicho, and J. P. Prince. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Physiologica races of P. capsici in pepper*. *Euphytica* 162:23-30.

- Godínez-Vidal, D. 2010. Cambios en la ruta mevalónica como respuesta a la infección por *Nacobbus aberrans* en chile CM-334. Tesis de Doctorado en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, México. 89 pp.
- Godínez-Vidal, D., E. Zavaleta-Mejía, M. Rocha-Sosa, P. León-Mejía, R. I. Rojas-Martínez, and L. Guevara-Olvera. 2008b. Expression of *Hmg* genes in chilli CM-334 infected by *Nacobbus aberrans* and its relationship with the breakdown of resistance to *Phytophthora capsici*. In: Memorias del X Congreso Internacional/XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Julio 20-24. Monterrey, Nuevo León, México. Resumen C-95.
- Godínez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, E. B. Sepúlveda-García, J. Lara-Reyna, R. Rojas-Martínez, and E. Zavaleta-Mejía. 2008a. Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology* 120:299-303.
- Goellner, M., X. Wang, and E. L. Davis. 2001. Endo- β -1,4-glucanase expression en compatible plant-nematode interactions. *Plant Cell* 13:2241-2255.
- González-Pérez, E., M. Yáñez-Morales, V. Santiago-Santiago, y A. Montero-Pineda. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. *Agrociencia* 38: 653-661.
- Goverse, A., J. A. Engler, J. Verhees, S. V. der-Krol, J. Helder, and G. Gheysen. 2000. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. *Plant Molecular Biology* 43:747-761.
- Guan, G. M., P. H. Dai, and I. Shechter. 1998. Differential transcriptional regulation of the human squalene synthase gene by sterol regulatory element-binding proteins (SREBP) 1a and 2 and involvement of 5' DNA sequence elements in the regulation. *Journal of Biological Chemistry* 273:12526–12535.
- Hausbeck, M. K., and K. H. Lamour. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. *Plant Disease* 88:1292-1303.
- Hussey, R. S., E. L. Davis, and C. Ray. 1994. *Meloidogyne* stilet secretions. Pp. 233-249. In: *Advances in molecular plant nematology*. F. Lamberti, C. De Giorgi, y D. M. Bird, eds. Plenus Press. New York, USA.

- Hussey, S. R. 1987. Tinción de nematodos en tejidos vegetales. Pp. 231-234. In: Fitonematología. Manual de laboratorio. B. M. Zuckerman, W. F. Main y M. B. Harrison, eds. CATIE. Costa Rica.
- Hyo, S. M., K. Zakaulah, G. K. Sang, S. Seon-Hye, and H. K. Young. 2010. Biological and structural mechanisms of disease development and resistance in chili pepper infected with the root-knot nematode. *Plant Pathology Journal* 26:149-153.
- Jammes, F., P. Lecomte, J. de Almeida-Engler, F. Bitton, M. L. Martin-Magniette, J. P. Renou, P. Abad, and B. Favery. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 44:447-458.
- Janzac, B., M. F. Fabre, A. Polloix, and B. Moury. 2009. Phenotype and spectrum of action of the *Pvr4* resistance in pepper against potyviruses, and selection for virulent variants. *Plant Pathology* 58:443-449.
- Jarsfter, M. B., D. L. Zhang, and C. D. Poulter. 2002. Recombinant squalene synthase. Synthesis of non-head-to-tail isoprenoids in the absence of NADPH. *Journal of the American Chemical Society* 124:8834-8845.
- Jung-Hoon, L., Y. Yong-Hwi, K. Hak-Yoon, S. Dong-Hyun, K. Dal-Ung, L. In-Jung, and K. Kil-Ung. 2002. Cloning and expression of squalene synthase cDNA from hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Molecules and Cells* 13:436-443.
- Kellam, M. K., and G. A. Zentmyer. 1986. Comparisons of single-oospore isolates of *Phytophthora* species from naturally infected cocoa pods in Brazil. *Mycologia* 78:351-358.
- Kennedy, M. A., R. Barbuch, and M. Bard. 1999. Transcriptional regulation of the squalene synthase gene (*erg9*) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1445:110-122
- Khripach, V. A., L. V. Voronina, and N. N. Malevannaya. 1996. A preparation for decreasing of heavy metals absorption by agricultural plants. *Pathology RU* 2:119-285.
- Khripach, V., V. Zhabinskii, and A. De-Groot. 2000. Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI Century. *Annals of Botany* 86:441-447.
- Krishna, P. 2003. Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal Plant Growth Regulation* 22:289-297.

- Leonian, L. H. 1922. Stem and fruit blight of peppers caused by *Phytophthora capsici* sp. Nov. *Phytopathology* 12:401-408.
- Li, J., P. Nagpal, V. Vitart, T. C. McMorris, and J. Chory. 1996. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272:398-401.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gen expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25:402-408.
- López-Martínez, N. 2007. Actividad enzimática y fenoles solubles en chile (*Capsicum annuum* L.) "CM-334" durante la pérdida de resistencia a *Phytophthora capsici* inducida por *Nacobbus aberrans*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, México. 68 p.
- López-Martínez, N., M.T. Colinas-León, C.B. Peña-Valdivia, Y. Salinas-Moreno, P. Fuentes-Montiel, M. Biesaga and E. Zavaleta-Mejía. 2011. Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant and Soil* 338:399-409.
- Manzanilla-López, R. H., M. A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R. N. Inserra, P. S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R. M. Souza, and K. Evans. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne y Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149-227
- Manzanilla-López, R. H., S. Harding, and K. Evans. 1997. Morphometric study on twelve populations of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944 (Nematoda:Pratilenchidae) from México and South America. *Nematology* 1:477-498.
- 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.
- Melillo, M. T., P. Leonetti, M. Bongiovanni, P. Castagnone-Sereno, and T. Blevè-Zacheo. 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. *New Phytologist* 170:501-512.
- Moens, M., R. N. Perry, and J. L. Starr. 2009. *Meloidogyne* Species a diverse group of novel and important plant parasites. Pp. 1-17. In: Root-knot nematodes. R. N. Perry, M. Moens, y J. L. Starr, eds. CABI Publishing. UK.

- Moon, H. S., Z. Khan, S. G. Kim, S. Son, and Y. H. Kim. 2010. Biological and structural mechanisms of disease development and resistance in chili pepper infected with the root-knot nematode. *Plant Pathology Journal* 26:149-153.
- Moreau, R. A., D. H. Young, P. O. Danis, M. J. Powell, C. J. Quinn, K. Beshah, R. A. Slawecki, and R. L. Dilliplane. 1998. Identification of ceramide-phosphorylethanolamine in oomycete plant pathogens: *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, and *Phytophthora capsici*. *Lipids* 33:307-317.
- Oelke, L. M., P. W. Bosland, and R. Steiner. 2003. Differentiation of race specific resistance to phytophthora root and foliar blight in *Capsicum annuum*. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 128:213-218.
- Ogundiwin, E. A., T. F. Berke, M. Massoudi, L. L. Black, G. Huestis, D. Choi, S. Lee, and J. P. Prince. 2005. Construction of intraspecific linkage maps and identification of resistance QTLs for *Phytophthora capsici* root-rot and foliar blight disease of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Genome* 48:698-711.
- Papavizas, G. C., J. H. Bowers, and S. A. Johnston. 1981. Selective isolation of *Phytophthora capsici* from soils. *Phytopathology* 62:20-26.
- Parra, G., and J. B. Ristaino. 2001. Resistance to mefenoxam and metalaxyl among field isolates of *Phytophthora capsici* causing Phytophthora blight of bell pepper. *Plant Disease* 85:1069-1075.
- Pegard, A., G. Brizzard, A. Fazari, O. Soucaze, P. Abad, and C. Djian-Caporalino. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95:158-165.
- Pernezny, K., P. D. Roberts, J. F. Murphy, and N. P. Goldberg. 2003. Compendium of pepper diseases. The American Phytopathological Society. USA. 63 p.
- Pozo, C. 1983. Logros de la Investigación Agrícola en el Cultivo del Chile. SARH-INIA. México pp. 5-18.
- Ristaino, J. B., and S. B. Johnston. 1999. Ecologically based approaches to management of Phytophthora blight on bell pepper. *Plant Disease* 83:1080-1089.
- Robinson, R. W., Y. H. Tsay, B. K. Kienzle, C. A. Smithmonroy, and R. W. Bishop. 1993. Conservation between human and fungal squalene synthetases: similarities in structure, function, and regulation. *Molecular and Cellular Biology* 13:2706-2717.

- Sabater-Jara, A. B., L. Almagro, S. Belchí-Navarro, M. A. Ferrer, A. R. Barceló, and M. A. Pedreño. 2010. Induction of sesquiterpenes, phytoesterols and extracellular pathogenesis-related proteins in elicited cell cultures of *Capsicum annuum*. *Journal of Plant Physiology* 167:1273-1281.
- Sasser, J. N. 1980. Root-knot nematodes: a global menace to crop production. *Plant Disease* 64:36-41.
- Schaller, H. 2003. The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research* 42:163-175.
- Schaller, H. 2004. New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:465-476.
- Schuster, M. L., R. Sandstedt, and L. W. Estes. 1965. Host-parasite relations of *Nacobbus batatiformis* and the sugar beet and other hosts. *Journal of the American Society of Sugar Beet Technology* 6:523-537.
- Sher, S. A. 1970. Revision of the genus *Nacobbus* Thorne and Allen 1944 (Nematoda: Tylenchoidea). *Journal of Nematology* 2:228-235.
- SIAP, 2008. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 13 Enero del 2010. <http://www.siap.gob.mx/>
- Suzuki, M., and T. Maranaka. 2007. Molecular genetics of plant sterol backbone synthesis. *Lipids* 42:47-54.
- Sy, O., P. W. Bosland, and R. Steiner. 2005. Inheritance of *Phytophthora* stem blight resistance as compared to *Phytophthora* root rot and *Phytophthora* foliar blight resistance in *Capsicum annum* L. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 130:75-78.
- Trujillo-Viramontes, F., E. Zavaleta-Mejía, R. I. Rojas-Martínez, y J. Lara. 2005. Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici*, inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile (*Capsicum annuum*). *Nematropica* 35:37-44.
- Vargas-Escobedo, M. T., E. Zavaleta-Mejía, y A. M. Hernández-Anguiano. 1996. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en Chile serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26:159-166.
- Vögeli, U., and J. Chappell. 1988. Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiology* 88:1291-1296.

- Vovlas, N., A. I. Nico, F. De Luca, C. De Giorgi, and P. Castillo. 2007. Diagnosis and molecular variability of an argentinean population of *Nacobbus aberrans* with some observations on histopathology in tomato. *Journal of Nematology* 39:17-26.
- Vrain, T. C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. *Journal of Nematology* 9:249-251.
- Williamson, V. M., and C. A. Gleason. 2003. Plant-nematodes interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6:327-333.
- Williamson, V. M., and R. Hussey. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell* 8:1735-1745.
- Winkel, B. 2004. Metabolic channeling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 55:85-107.
- Zavaleta-Mejía, E. 2002. Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparasitos, una hipótesis. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 118-122.
- Zavaleta-Mejía, E. 2009. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* por *Nacobbus aberrans*. In: *Memorias del XI Congreso Internacional / XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C.* Julio 19-23. Acapulco, Guerrero, México. Resumen S-8.
- Zinov'eva, S. V., N. I. Vasyukova, and O. L. Ozeretskovskaya. 2004. Biochemical aspects of plant interactions with phytoparasitic nematodes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40:111-119.
- Zook, M. N., and J. A. Kud. 1991. Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthetase activity in elicitor-treated or fungalinfected. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:377-390.