

## RESEARCH/INVESTIGACIÓN

### DEFENSA EN CHILE CM-334 INOCULADO CON *PHYTOPHTHORA CAPSICI* E INFECTADO POR *NACOBBUS ABERRANS*

Ernesto Fernández-Herrera<sup>1</sup>, Reyna Isabel Rojas-Martínez<sup>1</sup>, Lorenzo Guevara-Olvera<sup>2</sup>, María Esther Rivas-Dávila<sup>3</sup>, Ernestina Valadez-Moctezuma<sup>4</sup> y Emma Zavaleta-Mejía<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5, Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, C. P. 56230; <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Celaya, C. P. 38010, Gto., México; <sup>3</sup>Bidasem, Productora y Comercializadora de Semillas, S.A. de C. V. Carr. Celaya-Salamanca Km 2, interior 2, Celaya Gto. C. P. 38040; <sup>4</sup>Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carr. México-Texcoco, Chapingo, Edo. de México, C. P. 56230; \*Autor para correspondencia: zavaleta@colpos.mx

#### ABSTRACT

Fernández-Herrera, E., R.I. Rojas-Martínez, L. Guevara-Olvera, M. E. Rivas-Dávila, E. Valadez-Moctezuma, y E. Zavaleta-Mejía. 2012. Defense in chili cm-334 inoculated with *Phytophthora capsici* and infected by *Nacobbus aberrans*. Nematropica 42:96-107.

The transcript accumulation of the genes *POX* (peroxidase), *GLU* ( $\beta$ -1,3-glucanase), *PR-1* (pathogenesis-related protein 1) and *EAS* (5-*epi*-aristolochene synthase, involved in capsidiol biosynthesis), the activity of peroxidase and glucanase, and the content of capsidiol in roots of chili (*Capsicum annuum*) CM-334 inoculated with *Nacobbus aberrans* (*Na*), *Phytophthora capsici* (*Pc*) and both pathogens were determined. Plants of CM-334 were inoculated with 2,000 J<sub>2</sub> of *N. aberrans* and/or 300, 000 zoospores of *P. capsici*. At 6, 12, 24 and 48 h after of inoculation (hai) with the oomycete the expression of the mentioned genes was analyzed by real time PCR, and the activity of  $\beta$ -1,3-glucanase and peroxidase and the content of capsidiol were determined. In chili CM-334 inoculated only with *Pc* the *EAS* transcripts showed the maximum expression (23.4 times) at 6 hai, whereas in the interaction *Na-Pc*, there was a significant reduction (6.9 times) of *EAS* transcripts at this time. CM-334 plants inoculated with *N. aberrans* showed low levels of *EAS* and PRs genes, which contrasted significantly with gene transcript accumulation in the interaction CM-334-*P. capsici*. The transcripts of PRs were detected from 6 hai, and increased gradually until 48 hai. The activity of  $\beta$ -1,3-glucanase and peroxidase in CM-334 inoculated only with *N. aberrans* was low with respect to those inoculated with *P. capsici* or both pathogens, where the activity was significantly greater ( $P \leq 0.05$ ) at 12, 24 and 48 hai. In roots of CM-334 plants inoculated only with nematode the content of capsidiol was reduced by 31.6, 54.4, 57.2 and 66.6% with respect to the inoculated only with *P. capsici*; however in the roots where *P. capsici* was present (treatments *Pc* and *Na-Pc*), significant ( $P \leq 0.05$ ) greater levels were registered.

**Key words:** *Capsicum annuum*, capsidiol, chili wilt, false root-knot nematode, gene expression, pathogenesis-related proteins.

#### RESUMEN

Fernández-Herrera, E., R.I. Rojas-Martínez, L. Guevara-Olvera, M. E. Rivas-Dávila, E. Valadez-Moctezuma, y E. Zavaleta-Mejía. 2012. Defensa En Chile Cm-334 Inoculado Con *Phytophthora capsici* E Infectado Por *Nacobbus aberrans*. Nematropica 42:96-107.

En el presente estudio se determinó la acumulación de transcritos de los genes *POX* (peroxidasa), *GLU* ( $\beta$ -1,3-glucanasa), *PR-1* (proteína 1 relacionada con patogénesis) y *EAS* (5-*epi*-aristolocheno sintasa, involucrado en la biosíntesis de capsidiol), la actividad de peroxidasas y glucanasas, y el contenido de capsidiol en raíces de chile (*Capsicum annuum*) CM-334 inoculadas con *Nacobbus aberrans* (*Na*), *Phytophthora capsici* (*Pc*) y ambos patógenos. Cada planta de CM-334 se inoculó con 2000 J<sub>2</sub> de *N. aberrans* y/o 300, 000 zoosporas de *P. capsici*. A las 6, 12, 24 y 48 h posteriores a la inoculación (hpi) con el oomiceto se analizó por PCR en tiempo real la expresión de los genes mencionados, y se determinó la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa y peroxidasa y el contenido del capsidiol. En chile CM-334 inoculado sólo con *Pc* los transcritos de *EAS* mostraron la máxima expresión (23.4 veces) a las 6 hpi, mientras que en la interacción *Na-Pc* para este mismo tiempo, se registró una reducción significativa (6.9 veces) de los transcritos del gen. En plantas CM-334 inoculadas con *N. aberrans* hubo niveles bajos de *EAS* y de los genes PRs, lo cual contrastó significativamente con la acumulación en la interacción CM-334-*P. capsici*. Los transcritos de PRs se detectaron desde las 6 hpi, incrementándose gradualmente hasta las 48 hpi. La actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas y peroxidasas en plantas CM-334 inoculadas sólo con *N. aberrans* fue baja con respecto a las inoculadas con *P. capsici* o ambos patógenos, donde la actividad fue significativamente

mayor ( $P \leq 0.05$ ) a las 12, 24 y 48 hpi. En las raíces de plantas CM-334 inoculadas sólo con el nematodo se encontraron reducciones en el contenido de capsidiol de 31.6, 54.4, 57.2 y 66.6% con respecto a las inoculadas sólo con *P. capsici*; en cambio en las raíces en donde estuvo presente el oomiceto (tratamientos *Pc* y *Na-Pc*), se encontraron niveles significativamente ( $P \leq 0.05$ ) más altos.

*Palabras-clave:* *Capsicum annuum*, capsidiol, marchitez del chile, nematodo falso agallador, expresión génica, proteínas relacionadas con patogénesis.

## INTRODUCCIÓN

La marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) ocasionada por el oomiceto *Phytophthora capsici* es una de las enfermedades más devastadoras para este cultivo (González-Pérez *et al.*, 2004), y se considera que la mejor estrategia para el manejo de la enfermedad es la resistencia genética. El genotipo de chile tipo serrano Criollo de Morelos 334 (CM-334) es altamente resistente a *P. capsici* y su resistencia se ha mantenido aún cuando se inocula con las cepas más virulentas (Kim y Kim, 2009); actualmente se le considera como el resistente universal a *P. capsici* (Oelke *et al.*, 2003; Glosier *et al.*, 2008). Sy y colaboradores (2005) han sugerido que en CM-334 existen tres genes de resistencia a *P. capsici* que de manera independiente confieren la resistencia en la raíz, el tallo y el follaje. El chile CM-334 también es altamente resistente a potyvirus y a las tres principales especies de nematodos agalladores: *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, y *M. javanica* (Pegard *et al.*, 2005), sin embargo, CM-334 es susceptible al nematodo *Nacobbus aberrans* (Vargas-Escobedo *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). En estudios previos, nuestro grupo de trabajo encontró que el genotipo CM-334 se comporta como susceptible al oomiceto cuando se infecta previamente con el nematodo *N. aberrans* (Hernández-Anguiano *et al.*, 1992; Vargas-Escobedo *et al.*, 1996). En condiciones de cámara de crecimiento, el máximo grado de rompimiento de resistencia ocurrió cuando se inocularon 2000 juveniles del segundo estadio (J2) de *N. aberrans* en las plantas de CM-334 y 21 días después 300,000 zoosporas de *P. capsici* (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). El nematodo fitoparásito *N. aberrans* causa importantes pérdidas en cultivos como papa (*Solanum tuberosum* L.), chile (*Capsicum annuum* L.), tomate (*Solanum lycopersicon* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en América Latina, incluyendo a México (Manzanilla-López *et al.*, 2002). *N. aberrans*, al igual que otros nematodos endoparásitos sedentarios debe inducir en las células hospedantes profundos cambios estructurales, bioquímicos y fisiológicos que dan como

resultado la formación del sincitio, que constituye el sitio especializado de alimentación para el nematodo. A pesar de la gran importancia económica de este nematodo fitoparásito, poco se ha investigado acerca de los cambios bioquímicos y de expresión génica que induce en sus hospedantes.

La resistencia a *P. capsici* en cultivares de chile se asocia con incrementos en la actividad de las enzimas  $\beta$ -1,3-glucanasas (Egea *et al.*, 1999), peroxidasas (Fernández-Pavía, 1997) y proteínas PR-1. Las  $\beta$ -1,3-glucanasas, peroxidasas y proteínas PR-1 son proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) que se inducen como respuesta al ataque por patógenos (Vidhyasekaran, 2008). La función de las  $\beta$ -1,3-glucanasas durante la interacción planta-patógeno es hidrolizar la  $\beta$ , 1-3 glucano que es el mayor componente de la pared celular de los oomicetos (Selitrennikoff, 2001). En interacciones incompatibles chile-*P. capsici*, se ha observado una mayor actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas, relacionada con una mayor y más prolongada expresión del gen que la codifica, comparadas con lo que sucede en las interacciones compatibles (Egea *et al.*, 1999). Por otro lado, las peroxidasas participan en el reforzamiento de la pared celular por la deposición de los polímeros lignina y suberina, que constituyen una barrera física al avance del patógeno (Passardi *et al.*, 2005). Silvar *et al.* (2008) reportaron que la expresión del gen *CAPO1*, que codifica para la síntesis de una peroxidasa, fue tres veces mayor en la interacción incompatible chile-*P. capsici* en comparación con la interacción compatible. El incremento en la actividad de peroxidasas en chile CM-334 ha sido asociado con la resistencia a *P. capsici* (Fernández-Pavía, 1997). Por otra parte, las proteínas PR-1 también se asocian con la resistencia a *P. capsici* en chile, y algunos autores como Benhamou *et al.* (1991) sugieren que estas proteínas están involucradas en el engrosamiento de la pared celular y, por tanto, pueden ofrecer resistencia a la diseminación de patógenos, por su parte Niderman *et al.* (1995) sugieren que las PR-1 pueden tener un efecto tóxico directo en contra de los patógenos. Lee *et al.* (2000) reportaron una abundante y rápida acumulación

de transcritos del gen *CABPRI*, que codifica para una proteína PR-1, en interacciones incompatibles chile-*P. capsici*. Además, la sobre-expresión del gen PR-1 en plantas transgénicas de tomate (*Solanum lycopersicon* cv. House Momotaro) se asoció con un aumento en resistencia al oomiceto *P. capsici*, en contraste, las plantas testigo no transformadas mostraron síntomas severos de la enfermedad (Sarowar *et al.*, 2006). En general, las PRs se consideran como uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas (Van Loon *et al.*, 2006).

El capsidiol es la principal fitoalexina sesquiterpénica en Chile y su acumulación en las zonas de infección inhibe o restringe el crecimiento de *P. capsici* durante la interacción incompatible *P. capsici*-chile (Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000). La enzima clave en la biosíntesis de la fitoalexina es la 5-*epi*-aristolóqueno sintasa, codificada por el gen *EAS* (Bohlmann *et al.*, 2002). En plantas de Chile se ha reportado la expresión del gen *EAS* como consecuencia de la inoculación con *P. capsici* o del tratamiento con elicitores como celulosa o Pep-13 (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008; Zavala-Páramo *et al.*, 2000). Por ejemplo, Zavala-Páramo y colaboradores (2000) mencionan que la inoculación de *P. capsici* en plantas de Chile de la var. Sonora Anaheim, indujo una expresión fuerte del gen *EAS* (*PEAS*) a las 24 h después de haber sido inoculadas con el oomiceto, mientras que en las plantas no inoculadas no se detectó la expresión del gen. Además de los mecanismos de defensas citados anteriormente, la resistencia a *P. capsici* también se asocia con incrementos en la actividad de la fenilalanina amonioliasa (PAL) y compuestos fenólicos con propiedades tóxicas (Candela *et al.*, 1995; Fernández-Pavía, 1997).

Recientemente nuestro grupo reportó que en plantas de Chile CM-344 infectadas por *N. aberrans* se redujo la actividad de las enzimas fenilalanina amonioliasa (PAL) y peroxidasas, así como la concentración de fenoles solubles totales y ácido clorogénico, en comparación con aquellas plantas inoculadas sólo con *P. capsici*, esto sugiere que la pérdida de resistencia podría asociarse con la reducción de la actividad enzimática y el contenido de éstos compuestos (Godínez-Vidal *et al.*, 2008; López-Martínez, 2011). En este sentido, Zavaleta-Mejía *et al.* (2009) indican que el fenómeno de rompimiento de resistencia a *P. capsici* inducido por *N. aberrans* podría también asociarse con cambios en la expresión de genes de defensa que codifican para peroxidasas, enzimas de la ruta de fenilpropanoides (PAL, C4H, 4CL, CCR) e isoprenoides [hmg (3-hidroxi-3-metilglutaril CoA-reductasa), *EAS* (5-*epi*-aristolóqueno sintasa) y SS (escualeno sintasa)], cuya expresión o represión podría favorecer la acumulación de metabolitos que favorecen o inhiben la infección por *P. capsici*.

Con base en estos antecedentes y con la idea de aportar información que ayude a entender los cambios inducidos por *N. aberrans* en la expresión de genes de defensa en Chile CM-334, el objetivo de la presente investigación fue comparar por PCR en tiempo real

la acumulación de transcritos de los genes *POX*, *GLU*, *PR-1* y *EAS*, y determinar la actividad enzimática de peroxidasas y glucanasas, y el contenido de capsidiol en raíces de plantas de CM-334 inoculadas con *P. capsici*, *N. aberrans* y la combinación de ambos patógenos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Establecimiento de los experimentos.* Plántulas de Chile CM-334, una por maceta, se crecieron en arena esterilizada y se mantuvieron en cámara de crecimiento a  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 14 h luz y 10 h oscuridad. Cada experimento constó de cuatro tratamientos: 1) plantas de CM-334 no inoculadas (Testigo), 2) plantas de CM-334 inoculadas con *P. capsici* (*Pc*), 3) plantas de CM-334 inoculadas con *N. aberrans* (*Na*) y 4) plantas de CM-334 inoculadas con *N. aberrans* y *P. capsici* (*Na-Pc*), cada tratamiento constó de 60 plantas. Las plantas de Chile con cuatro a cinco hojas verdaderas se inocularon con 2000 J<sub>2</sub> del nematodo y 21 días después con 300,000 zoosporas del oomiceto. Para corroborar, tanto la patogenicidad del aislamiento como la eficacia de la inoculación, se inocularon 10 plantas de Chile del cv J. E. Parker susceptible a *P. capsici*. Se tuvieron también plantas adicionales de CM-334 para corroborar la infección por el nematodo. El inóculo de *N. aberrans* se obtuvo de raíces agalladas de plantas de tomate y el aislamiento 6143 de *P. capsici* usado en este trabajo fue proporcionado por la Dra. Sylvia Patricia Fernández-Pavía (Profesora de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). El cultivo del oomiceto, la inducción de la esporulación y la cuantificación de zoosporas, así como, la obtención e inoculación de *N. aberrans* se realizó de acuerdo con lo reportado por Villar-Luna y colaboradores (2009). El experimento completo se repitió una vez, bajo las mismas condiciones.

A las 6, 12, 24 y 48 horas posteriores a la inoculación (hpi) con el oomiceto, se tomaron 15 plantas de cada tratamiento para cada tiempo, se cortaron las raíces, se lavaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

*Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR en tiempo real.* El RNA total de raíces de Chile se extrajo a partir de 0.5 g de tejido congelado usando el Kit RNeasy® (QIAGEN) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El RNA se almacenó a  $-80^\circ\text{C}$ . La calidad e integridad del RNA se verificó en gel de agarosa desnaturizante al 1.2%.

La síntesis de cDNA se realizó en dos pasos: 1) la primera mezcla de reacción estuvo constituida por 2 µg de RNA total, 0.4 µL de oligo dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen®), y se aforó a un volumen de 12 µL con agua libre de RNAsas y DNAsas para incubarse a  $70^\circ\text{C}$  por 10 min, al terminar se colocó la mezcla en hielo; 2) a la mezcla de reacción anterior se le adicionaron 8 µL de una segunda mezcla, que consistió de 4 µL de amortiguador 5x para retrotranscripción, 2 µL de ditiotreitól (0.1 M),

1  $\mu\text{L}$  dNTP mix (10 mM) y 1  $\mu\text{L}$  de la retrotranscriptasa (M-MLV Reverse transcriptase -Promega®). La mezcla se colocó en un termociclador (BIO-RAD®) durante 60 min a 37°C y 10 min a 70°C.

Los pares de oligonucleótidos utilizados en el estudio se muestran en el Cuadro 1; con excepción de los oligos para el gen *PR-1*, los demás se diseñaron usando el programa DNASTAR® a partir de las secuencias de genes disponibles en el GenBank del NCBI. La mezcla de reacción de PCR en tiempo real consistió de 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer 10X para PCR, 1.25  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (30 mM), 1  $\mu\text{L}$  de cada primer (10 pM), 1  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (10 mM), 1:150,000 SYBR® Green (Molecular Probe, Eugene, OR), 0.25  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (1  $\mu\text{M}$ ), 1.5  $\mu\text{L}$  de cDNA, 0.125  $\mu\text{L}$  de Amplicasa (Biogenica®), y se aforó a un volumen de 25  $\mu\text{L}$  con agua libre de RNAsas y DNAsas, en un sistema estándar de PCR en tiempo real ABI7500 (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 94°C/4 min, seguido de 30 ciclos a 94°C/30 s, 60°C/35 s y 72°C/35 s, y un paso final de extensión a 72°C/4 min. Los productos de PCR se purificaron con el Kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) y se secuenciaron para corroborar su identidad. El gen de gliceraldehído 3-P deshidrogenasa (GAPDH) se usó como gen de expresión constitutiva para normalizar la expresión y 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  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

*Extracción de proteína y actividad enzimática de peroxidadas.* Se maceraron 0.25 g de tejido en un mortero que contenía buffer frío de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. El extracto se centrifugó a 12,000 g a 4°C por 5 min y el sobrenadante recuperado se almacenó a -20°C. La concentración de proteínas se determinó con el Kit Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para lo cual se utilizó albúmina sérico-bovina, fracción V (Sigma), como estándar. La actividad de peroxidadas se determinó con el incremento de absorbancia a 470 nm debido a la formación de tetraguaiacol (Hammerschmidt *et al.*, 1982). La mezcla de reacción consistió de 220  $\mu\text{L}$  de amortiguador de Tris-HCl (50 mM, pH 7.5), 15  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno a 0.25%, 25  $\mu\text{L}$  de guaiacol 0.1 M y 5  $\mu\text{g}$  de proteína total. La actividad enzimática se reportó como  $\mu\text{M}$  de tetraguaiacol  $\mu\text{g}^{-1}$  de proteína  $\text{min}^{-1}$ . Para cada experimento de cada tratamiento y para cada tiempo se realizaron dos extracciones y cada extracción se cuantificó por triplicado.

*Extracción de proteína y actividad enzimática de  $\beta$ -1,3-glucanasa.* Se maceraron 0.25 g de tejido de raíces usando como buffer acetato de sodio 0.05 M, pH 5.2. El extracto se centrifugó a 15,000 g a 4°C por 10 min y el sobrenadante recuperado se almacenó a -20°C. La actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas se determinó usando el ensayo de laminarina-ácido dinitrosalicílico de Abeles y Forrence (1970) con algunas modificaciones. A 25  $\mu\text{L}$  de extracto crudo de la enzima se le adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de laminarina al 1% y se incubó a 40°C durante

10 min. La reacción se detuvo adicionando 375  $\mu\text{L}$  de ácido dinitrosalicílico y calentando por 5 min en agua hirviendo (100°C). Se enfrió la solución, se agitó en vortex y se leyó la absorbancia a 500 nm. El blanco consistió del extracto de la enzima y laminarina con cero tiempo de incubación. La reducción de azúcar se calculó usando una curva estándar de glucosa. Una unidad de actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por 10 min, bajo las condiciones arriba citadas (Pan *et al.*, 1991). Para cada experimento se realizaron dos extracciones por cada tiempo de cada tratamiento, y cada extracción se cuantificó por triplicado.

*Extracción y cuantificación de capsidiol.* El capsidiol se extrajo de acuerdo con la metodología descrita por Egea *et al.* (1996b), con algunas modificaciones. De cada tratamiento y tiempo se tomó una muestra de 0.5 g de tejido radical, se maceró por 30 s en N líquido y posteriormente por 1 min en una mezcla de cloroformo y metanol (2:1). Cada extracto se filtró y evaporó a sequedad a temperatura ambiente y se redisolvió en cloroformo para su análisis por cromatografía en capa fina, la cual se desarrolló con una mezcla de hexano:acetato de etilo (1:6) utilizando placas cromatográficas de sílica gel 60  $F_{254}$  (Merck®). Las muestras se procesaron por cromatografía en banda y se eluyeron conjuntamente con una muestra de capsidiol puro. Se cortó la porción correspondiente al estándar, la cual se reveló con una solución de sulfato cérico amoniacal 2N en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y se confrontó físicamente con la porción eluida y no revelada de cada tratamiento, las regiones correspondientes al  $R_f = 0.28$  característico del capsidiol se rasparon, se lavaron con cloroformo, se filtraron y evaporaron a sequedad.

La estimación del contenido de capsidiol se realizó siguiendo la metodología descrita por Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria (1996), con algunas modificaciones. Las muestras se re-disolvieron en 250  $\mu\text{L}$  de metanol y para la cuantificación se preparó una mezcla de reacción de extracto y vainillina 2% en ácido sulfúrico en relación 1:1, la cual se incubó a temperatura ambiente durante 40 min y se leyó a una longitud de onda de 640 nm en un Nanodrop®. Para la cuantificación de la fitoalexina se utilizó una curva estándar previamente preparada con concentraciones conocidas de capsidiol puro, aislado e identificado por nuestro grupo de investigación (Villar-Luna *et al.*, 2009).

*Análisis estadístico.* Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza para un modelo completamente al azar usando el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1999) y para la comparación de medias de tratamientos se aplicó la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS

*Niveles relativos de genes relacionados con la defensa.* En comparación con las raíces de las plantas

testigo, en las de chile CM-334 tratadas con *P. capsici* (*Pc*) o con la interacción de *N. aberrans* y *P. capsici* (*Na-Pc*), se registró una acumulación mayor ( $P \leq 0.05$ ) de los transcritos de los genes evaluados (*EAS*, 5-epi-aristoloqueno sintasa; *POX*, peroxidasa; *GLU*,  $\beta$ -1,3-glucanasa; y proteína *PR-1*) después de la inoculación con el oomiceto. De todos ellos, *EAS* fue el que presentó el mayor incremento, hasta 23.4 veces a las 6 hpi y después declinó drásticamente a 9.7, 8.8 y 4.2 veces a las 12, 24 y 48 hpi, respectivamente (Fig. 1).

En raíces inoculadas sólo con *Pc*, los transcritos del gen *EAS*, responsable de codificar para la enzima 5-epi-aristoloqueno sintasa clave en la síntesis de capsidiol, mostraron la máxima acumulación (23.4 veces) a las 6 hpi, mientras que en el tratamiento de la interacción *Na-Pc* para este mismo tiempo, se registró una reducción significativa (6.9 veces) de los transcritos del gen en comparación con las plantas testigo. En el tratamiento de *Na-Pc* la máxima acumulación del gen *EAS* fue de 12 veces y se detectó a las 12 hpi, después declinó a 7.3 y 6.5 veces a las 24 y 48 hpi, respectivamente.

La acumulación de transcritos del gen *EAS* fue baja en la interacción compatible de chile-*Na*, al igual que la de los genes que codifican para las proteínas relacionadas con patogénesis (*POX*, *GLU* y *PR-1*), lo que contrastó significativamente con la acumulación de transcritos observada en la interacción incompatible chile-*P. capsici*, en la que los transcritos de los genes *POX*, *GLU* y *PR-1* se detectaron desde las 6 hpi, incrementándose gradualmente hasta las 48 hpi, tiempo en el que se registró el máximo valor. La expresión de los genes *POX*, *GLU* y *PR-1* en las plantas inoculadas sólo con el nematodo fue ligeramente mayor a la observada en las plantas testigo.

**Actividad enzimática.** La actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas y peroxidases tanto en las raíces de las plantas testigo como en las inoculadas sólo con nematodo fueron bajas a lo largo de los cuatro tiempos evaluados (Fig. 2A y 2B); en contraste, la actividad fue significativamente mayor ( $P \leq 0.05$ ) en las raíces de plantas de chile CM-334 inoculadas con el oomiceto o con ambos patógenos desde las 12, 24 y 48 h posteriores a la inoculación con *P. capsici*. La inoculación de CM-334 sólo con *P. capsici* mostró incrementos en la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas de 38.5, 77.5 y 87.1%, y en la interacción *Na-Pc* de 51.1, 71.5 y 96.9% a las 12, 24 y 48 hpi, con respecto a las plantas testigo. En plantas inoculadas sólo con *Pc* la actividad de peroxidases en CM-334 mostró incrementos de 41.2, 48.2 y 48.4%, mientras que en las inoculadas con ambos patógenos (*Na-Pc*) los incrementos fueron de 38.1, 52.7 y 56.3% a las 12, 24 y 48 hpi, respectivamente, en comparación con las plantas testigo.

**Contenido de capsidiol.** En las raíces de las plantas testigo y en las inoculadas con nematodo se detectaron contenidos bajos de la fitoalexina a lo largo de los cuatro tiempos evaluados, sin diferencias significativas entre ambos (Fig. 2C). En comparación con las inoculadas sólo con *P. capsici* en aquellas

inoculadas únicamente con el nematodo y en las testigo el contenido de capsidiol se redujo en 31.6, 54.4, 57.2 y 66.6%, y en 41, 62.3, 74 y 74.5% a las 6, 12, 24 y 48 hpi, respectivamente. En cambio en las raíces en donde estuvo presente el oomiceto sólo o en combinación con el nematodo, tratamientos *Pc* y *Na-Pc*, se encontraron niveles significativamente ( $P \leq 0.05$ ) más altos. Entre estos dos tratamientos no hubo diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) en el contenido de capsidiol a las 6 y 12 hpi; sin embargo, a las 24 y 48 hpi, en las plantas inoculadas solamente con el oomiceto hubo un incremento significativo de 28.2 y 33.3%, respectivamente.

## DISCUSIÓN

La expresión diferencial de genes de defensa y la acumulación de los metabolitos para los cuales codifican dichos genes se ha observado en varias interacciones planta-patógeno. En nuestro estudio la mayor expresión de los genes *GLU*, *POX*, *PR-1* y *EAS* se observó durante la interacción incompatible CM-334-*P. capsici* mientras que en la compatible CM-334-*N. aberrans* la acumulación de transcritos fue menor. Al respecto, Silvar *et al.* (2008) mencionan que la compatibilidad e incompatibilidad hospedante-patógeno está determinada por el grado de coordinación entre las diferentes estrategias de defensa, la rapidez y la magnitud con la que ocurre la expresión de genes que codifican para la síntesis de metabolitos que inhiben el crecimiento del patógeno, siendo tales cambios más rápidos y de mayor magnitud en las interacciones incompatibles.

La sobre-expresión de los transcritos de los genes *POX* en la interacción de CM-334 con el oomiceto o la combinación de ambos patógenos (*Pc* y *Na-Pc*) se asoció con incrementos en la actividad de la enzima respectiva, en contraste en la interacción compatible CM-334-*N. aberrans* tanto la acumulación de transcritos del gen, como la actividad de peroxidases fue baja. Se sabe que la expresión de *POX* y la actividad de peroxidases se incrementan en las plantas como resultado del ataque por patógenos (Chittoor *et al.*, 1999; Van Loon *et al.*, 2006). Las peroxidases contribuyen a la resistencia de las plantas al crear un ambiente tóxico por la acumulación de especies reactivas de oxígeno y al participar en el reforzamiento de la pared celular por la deposición de los polímeros lignina y suberina, que constituyen una barrera física al avance del patógeno (Passardi *et al.*, 2005). Do *et al.* (2003) reportaron que en plantas de chile del cv Hanbyul inoculadas con los aislamientos de *P. capsici* S197 (compatible) y CBS178.26 (incompatible), la expresión del gen *CAPOI* que codifica para una peroxidasa, fue más rápida y abundante en la interacción incompatible en comparación con la compatible. La mayor expresión del gen *POX* y la mayor actividad de las peroxidases en las plantas inoculadas con *P. capsici* podrían estar implicadas en el reforzamiento de la pared celular de las raíces de CM-334; en cambio, la baja expresión y

Cuadro 1. Oligonucleótidos usados para analizar la acumulación de algunos genes relacionados con la defensa en plantas de CM-334 inoculadas con *N. aberrans*, *P. capsici* o ambos patógenos.

Gen	Acceso	Referencia	Nombre	Primer		Amplicón
				Secuencia primer (5' - 3')		
Gliceraldehído 3-P deshidrogenasa ( <i>GAPDH</i> )	AJ246011	DPE	GLIFW	GGCCTTATGACTACAGTTCACCTCC		217 pb
PR-1 ( <i>CABPRI</i> )	AF053343	Gayoso <i>et al.</i> 2007	GLIRV	GATCAACCACAGAGACATCCACAG		
Peroxidasa ( <i>CAPOI</i> )	AF442386	DPE	PR1FW	GTTGTGCTAGGGTTCGGTGT		301 pb
$\beta$ -1,3-glucanasa ( <i>CABGLU</i> )	AF227953	DPE	PR1RV	CAAGCAATTATTAAACGATCCA		
5-epi-aristolóqueno sintasa ( <i>PEAS</i> )	AJ005588	DPE	POXFW	CCAGTACGTGCCCAAGAGCTG		560 pb
			POXRV	GGATGCGTCGATTGAAGGGTC		
			GLUFW	GAGGCTCCAACATTGAAGTTATG		480 pb
			GLURV	CATCTTGTACCACCAATTAGGTGC		
			EASFW	GCTCAAGAAATTGAACCCGCGAAG		200 pb
			EASRV	TCTTCATTATAGACATCGCCCTCG		

DPE: diseñados en el presente estudio. *CABPRI*=*PR-1*; *CAPOI*=*POX*; *CABGLU*=*GLU*; *PEAS*=*EAS*.

menor actividad de la enzima en las plantas inoculadas con *N. aberrans* podría favorecer el establecimiento del nematodo, facilitando su avance en el tejido radical al no ocurrir el reforzamiento de la pared celular. También Zacheo *et al.* (1993) observaron que hubo un ligero incremento en la actividad de peroxidadas en líneas de tomate susceptibles a *M. incognita*, mientras que, en la interacción incompatible la actividad enzimática se incrementó en un 100% en comparación con la interacción compatible. Según Zinov'eva *et al.* (2004), en las interacciones planta-nematodo se ha observado que la actividad de ciertas isoformas de peroxidadas son capaces de suprimir enzimas hidrolíticas, mientras que otras pueden oxidar a las toxinas producidas por los nematodos convirtiéndolas en compuestos inocuos para la planta.

El hecho de que la acumulación de transcritos del gen *GLU* y la correspondiente actividad de la enzima  $\beta$ -1,3-glucanasa se hayan incrementado en las plantas inoculadas con el oomiceto, en presencia y ausencia del nematodo, sugiere que tales incrementos son inducidos por *P. capsici* y no por el nematodo. En presencia de *N. aberrans* (interacción compatible CM-334-*Na*) tanto los niveles de los transcritos del gen *GLU*, como de la actividad de la enzima correspondiente, fueron similares a los observados en las plantas testigo. Las  $\beta$ -1,3-glucanasas se han asociado con la defensa de las plantas a hongos y oomicetos (Egea *et al.*, 1999; Hong y Hwang 2005; Jung *et al.*, 2005; Saikia *et al.*, 2005) y muy probablemente carezcan de importancia como mecanismo de defensa contra nematodos, en virtud de que las  $\beta$ -1,3-glucanasas degradan polímeros de la pared celular de los oomicetos mediante la hidrolización de su principal componente la  $\beta$ , 1-3 glucano (Selitrennikoff, 2001). La mayor expresión del gen que codifica para  $\beta$ -1,3-glucanasa, así como la mayor actividad de dicha enzima en las interacciones chile-*P. capsici* han sido previamente reportadas (Egea *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2005). El nivel de expresión de *GLU* y la actividad de la enzima fueron similares en plantas inoculadas sólo con *P. capsici* o con ambos patógenos, sugiriendo que el nematodo fue incapaz de contrarrestar el fuerte efecto elicitor del oomiceto.

La información acerca de la inducción de  $\beta$ -1,3-glucanasas en las interacciones planta-nematodo, es escasa y contradictoria, y parece depender de la especie de nematodo con el que se establece la interacción; así por ejemplo, en la interacción *Globodera pallida*-papa, tanto compatible como incompatible, se incrementó el contenido de  $\beta$ -1,3-glucanasas (Rahimi *et al.*, 1996); en contraste Oka *et al.* (1997) reportan que en la interacción compatible tomate-*M. javanica* no hubo incremento en la acumulación de estas enzimas, de manera similar como ocurrió en la presente investigación en la interacción compatible CM-334-*N. aberrans*.

La acumulación de transcritos del gen PR-1 se incrementó significativamente siempre que las plantas se inocularon con *P. capsici*, independientemente de que estuviera o no presente el nematodo; tal resultado

sugiere que para este gen el nematodo no ejerce ninguna represión en presencia del oomiceto. Kim y Hwang (2000) observaron que en la interacción incompatible chile cv. Hanbyul-*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (aislamiento Bv5-4a) la acumulación de los RNAm del gen *CABPR-1*, que codifica para una proteína PR-1, fue más rápida, más prolongada y de mayor magnitud que aquella de la interacción compatible chile cv. Hanbyul-*X. campestris* pv. *vesicatoria* (aislamiento Ds1). Aún cuando la función y el mecanismo de acción de las proteínas PR-1 son todavía desconocidos, se ha propuesto que estas proteínas podrían participar en la defensa contra el oomiceto al ejercer un efecto tóxico directo que retrasa el desarrollo de éste, toda vez que dichas proteínas se acumulan en los espacios intercelulares y en la interfase entre el patógeno (*P. capsici*) y las células de la planta de chile cv. Hanbyul (Lee *et al.*, 2000).

La información sobre el efecto protector de las proteínas PRs en contra de los nematodos fitoparásitos también es escasa y en algunos casos contradictoria, pues parece depender del patosistema estudiado. Algunos autores reportan la ausencia de inducción de proteínas PRs en las interacciones compatibles planta-nematodo (Oka *et al.*, 1997), pero en la interacción compatible *Cucumis sativum*-*M. incognita* si se indujeron las  $\beta$ , 1-3 glucanasas (Zinov'eva *et al.*, 2001). En general, se considera que la producción de proteínas PRs es un mecanismo importante de defensa y se les relaciona con la resistencia a fitopatógenos (Linthorst, 1991; Van Loon, 1999). En las interacciones planta-nematodo en algunos casos se ha observado una correlación directa entre la acumulación de PRs y el grado de resistencia (Rahimi *et al.*, 1993; Rahimi *et al.*, 1996), mientras que en otros no se ha evidenciado tal relación (Qiu *et al.*, 1997).

En el presente estudio se observó la expresión constitutiva de todos los genes que codifican para las proteínas PRs ( $\beta$ -1,3-glucanasa, peroxidasa y PR-1) y la actividad enzimática de  $\beta$ -1,3-glucanasas y peroxidadas. Al respecto, Van Loon (1999) indica que las proteínas PRs pueden ser detectadas en tejido no infectado, sugiriendo que pueden estar presentes en tejido sano en cantidades pequeñas. La presencia de  $\beta$ -1,3-glucanasas y peroxidadas en raíces de chile CM-334 de las plantas testigo no inoculadas tiene sentido si consideramos que estas enzimas, además de funcionar en defensa, también intervienen en diversos procesos fisiológicos y del desarrollo de las plantas como: maduración y desarrollo de frutos (Gaspar *et al.*, 1982), división celular (Fulcher *et al.*, 1976), embriogénesis (Dong y Dunstan, 1997), germinación de semillas (Leubner-Metzger y Meins, 1999), rompimiento de dormancia (Krabel *et al.*, 1993), respuestas a bajas temperaturas y ozono (Gaspar *et al.*, 1982; Schraudner *et al.*, 1992), daño mecánico y luz UV (Ishige *et al.*, 1993; El Ghaouth *et al.*, 2003), entre otros.

La expresión de *EAS* en raíces de chile CM-334 inoculadas con ambos patógenos (CM-334-*Na-Pc*)

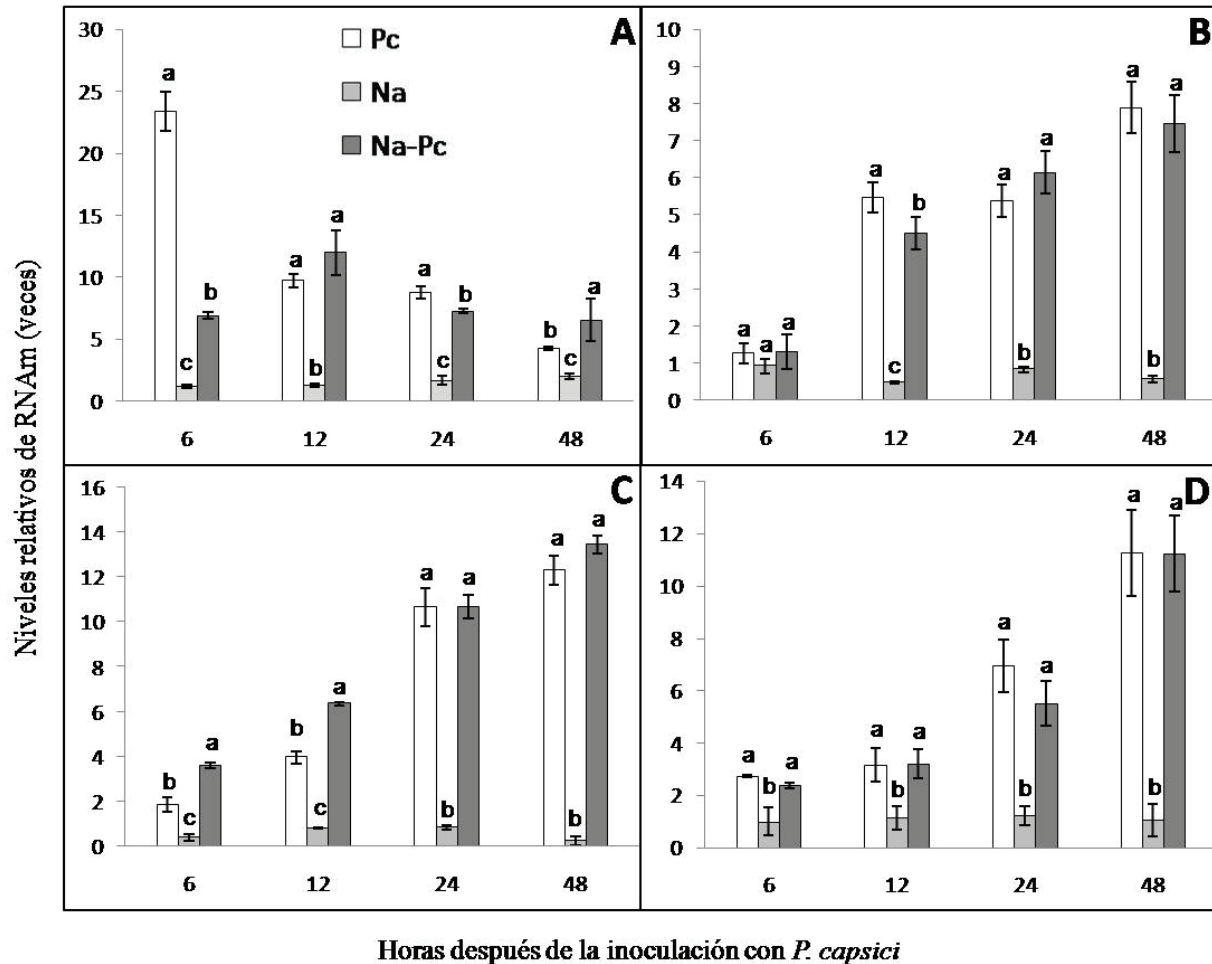


Fig. 1. Niveles relativos de expresión de genes relacionados con la defensa en raíces de plantas de chile CM-334 inoculadas con *P. capsici* y *N. aberrans*, respecto a las plantas no inoculadas. A) *EAS* = 5-*epi*-aristoloxeno sintasa, B) *PR-1*, C) *POX* = peroxidasa, y D) *GLU* =  $\beta$ -1,3-glucanasa. Cada barra representa el promedio de dos experimentos independientes con tres determinaciones cada uno; la línea de cada barra representa la desviación estándar. Para cada tiempo, las barras con diferente letra fueron significativamente diferente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

fue tardía en comparación con las plantas inoculadas sólo con el oomiceto. El retraso en la acumulación de los transcritos de *EAS* durante la interacción CM-334-*Na-Pc* por un lado, y la mayor acumulación de *EAS* en la interacción CM-334-*Pc* por el otro, sugiere que *N. aberrans* modificó el patrón de expresión de este gen en las raíces de las plantas de chile. El incremento en la expresión *EAS* como resultado de la inoculación con *P. capsici* ha sido reportada previamente (Zavala-Páramo *et al.*, 2000). *EAS* codifica para la 5-*epi*-aristoloxeno sintasa (*EAS*), que es la enzima clave en la biosíntesis del capsidiol, la principal fitoalexina sintetizada en Chile. Los resultados obtenidos indicaron una estrecha relación entre la expresión de *EAS* y la acumulación de capsidiol en las raíces de Chile, así en las plantas infectadas con *Pc* hubo una mayor acumulación de

capsidiol, en comparación con aquellas inoculadas con ambos patógenos y con las inoculadas sólo con el nematodo. La magnitud en la acumulación del capsidiol se ha asociado con el grado de resistencia a *P. capsici* en diversos genotipos de Chile (Egea *et al.*, 1996a; Candela *et al.*, 2000). Además, varios investigadores han demostrado *in vitro* los efectos deletéreos del capsidiol sobre *P. capsici* (Ward *et al.*, 1974; Molot *et al.*, 1980) y en el nematodo *N. aberrans* (Godínez-Vidal *et al.*, 2010).

El hecho de que en plantas inoculadas sólo con el nematodo y con ambos patógenos (*Na-Pc*) haya habido tanto una menor expresión de *EAS* como un menor contenido de capsidiol, en comparación con aquellas inoculadas solamente con el oomiceto, permite especular que *N. aberrans* abate éste y otros



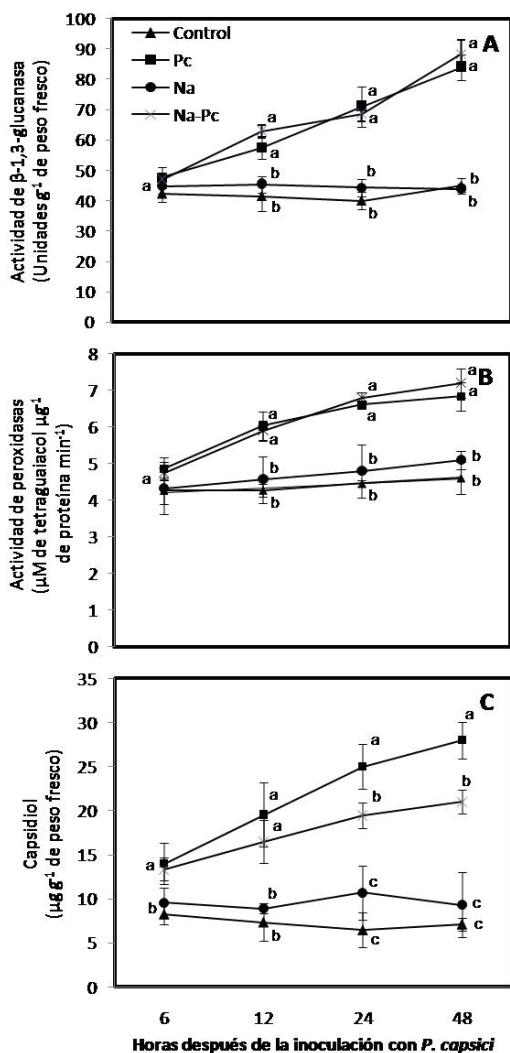


Fig. 2. Actividad enzimática total de β-1,3-glucanasas (A) y peroxidasas (B), y contenido de la fitoalexina capsidiol (C) en raíces de chile CM-334 no inoculadas (Testigo) e inoculadas con *P. capsici* (Pc), *N. aberrans* (Na) o ambos patógenos (Na-Pc). Cada punto representa el promedio de dos experimentos independientes, con dos extracciones y tres lecturas por extracción; la línea en cada punto representa la desviación estándar. Para cada tiempo, los puntos con diferente letra fueron significativamente diferentes (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). Para el tiempo de 6 h, puntos con una sola letra indica que no hubo diferencia significativa entre ellos (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

mecanismos de defensa en plantas de chile CM-334, lo que podría redundar en la creación de un ambiente favorable tanto para el establecimiento del nematodo como del oomiceto; con frecuencia se menciona que el grado de resistencia de los genotipos de chile está estrechamente relacionado con la rapidez y la magnitud con la que acumulan a la fitoalexina capsidiol (Candela *et al.*, 2000). Godínez-Vidal *et al.* (2010) mencionan que

en raíces de chile CM-334 infectadas con *N. aberrans* tuvieron un menor contenido capsidiol en comparación con las no inoculadas, y que la fitoalexina causó la inmovilización de los J<sub>2</sub> del nematodo en condiciones *in vitro*. Por otra parte, Villar-Luna *et al.* (2009) encontraron que en plantas de chile CM-334 infectadas con *N. aberrans* se redujo la acumulación de capsidiol en hojas infiltradas con *P. capsici* o *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis*, en comparación con las inoculadas solamente con el oomiceto o la bacteria. Se ha consignado que la inoculación con *N. aberrans* reduce otras respuestas de defensa en las plantas de CM-334; como son la menor expresión del gen *Hmg2* involucrado en la síntesis de capsidiol (Godínez-Vidal *et al.*, 2009), menor actividad de la enzima PAL (Godínez-Vidal *et al.*, 2008) y una acumulación menor de fenoles solubles totales en comparación con las plantas no inoculadas (López-Martínez *et al.*, 2011). Estos últimos autores también encontraron que en plantas de CM-334 la actividad de peroxidasas se redujo tanto en las plantas inoculadas sólo con *Na* como en aquellas inoculadas con los dos patógenos (*Na-Pc*). Estos resultados difieren de lo que se encontró en la presente investigación. Se ha sugerido que el abatimiento de estas respuestas de defensa podría explicar en parte el fenómeno de rompimiento de resistencia de las plantas de chile CM-334 a *P. capsici*, cuando son previamente infectadas por *N. aberrans*. La mayor y más rápida acumulación tanto de *EAS* como del capsidiol en raíces de CM-334 inoculadas sólo *P. capsici*, da sustento a la idea de que la fitoalexina es un mecanismo importante en la defensa de este genotipo al oomiceto. La tardía expresión tanto de *EAS* como del capsidiol en presencia de *N. aberrans*, sugieren que el nematodo altera el patrón de expresión de *EAS* y por tanto, la síntesis de la fitoalexina capsidiol, con el fin de evitar su efecto negativo.

La mayor acumulación de los transcritos de los genes *EAS*, de las PRs *GLU* y *POX* y los incrementos en la actividad de las enzimas correspondientes (β-1,3-glucanasas y peroxidasas), así como la mayor acumulación de los transcritos de PR-1 obtenida en la interacción CM-334-*Pc* indican que estos genes y enzimas están asociadas con la respuesta de defensa de CM-334 en contra de *P. capsici*. En comparación con las plantas inoculadas con *P. capsici*, en la interacción CM-334-*N. aberrans* se abatió la acumulación de los transcritos de las PRs y *EAS*, la actividad de las enzimas β-1,3-glucanasa y peroxidasa, y el contenido de capsidiol. Sin embargo, en las plantas inoculadas con ambos patógenos solamente se reprimió la expresión de *EAS* que se asoció con una reducción significativa en la acumulación de capsidiol.

Los resultados de la presente investigación son relevantes, en virtud de que a pesar de que existe relativamente abundante información acerca de los cambios metabólicos y de expresión génica inducidos por nematodos formadores de quistes y especies de *Meloidogyne*, para *N. aberrans* los únicos antecedentes al respecto son los que han sido generados recientemente

por nuestro grupo de trabajo.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos a la Dra. Diana Sanzón Gómez por su ayuda en el establecimiento de los ensayos y por el apoyo técnico en laboratorio. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada al primer autor para sus estudios de doctorado y por el apoyo brindado para la realización del proyecto de investigación 46331-Z.

#### LITERATURA CITADA

- Abeles, F. B., and L. E. Forrence. 1970. Temporal and hormonal control of  $\beta$ -1,3-glucanase in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology* 45:395-400.
- Benhamou, N., J. Grenier, and A. Asselin. 1991. Immunogold localization of pathogenesis-related protein P14 in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38:237-253.
- Bohlmann, J., E. J. Stauber, B. Krock, N. J. Oldham, J. Gershenzon, and I. T. Baldwin. 2002. Gene expression of 5-*epi*-aristolochene synthase and formation of capsidiol in roots of *Nicotiana attenuate* and *Nicotiana glauca*. *Phytochemistry* 60:109-116.
- Candela, M. E., C. Egea, M. D. García-Pérez, J. Costa, and M. Candela. 2000. Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Horticulturae* 522:79-86.
- Candela, M. E., M. D. Alcázar, A. Espín, C. Egea, and L. Almela. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44:116-123.
- Chávez-Moctezuma, M. P., and E. Lozoya-Gloria. 1996. Biosynthesis of the sesquiterpenic phytoalexin capsidiol in elicited root cultures of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Reports* 15:360-366.
- Chittoor J. M., J. E. Leach, and F. F. White. 1999. Induction of peroxidase during defense against pathogens. Pp. 171-187. *in*: Datta S.K. and S. Muthukrishnan (Eds.). *Pathogenesis-related proteins in plants*. Boca Raton, FL: CRC Press. USA.
- Do, H. M., J. K. Hong, H. W. Jung, S. H. Kim, J. H. Ham, and B. K. Hwang. 2003. Expression of peroxidase-like genes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:196-205.
- Dong, J. Z., and D. I. Dunstan. 1997. Endochitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta* 201:189-194.
- Egea, C., M. D. Alcázar, and M. E. Candela. 1996a. Capsidiol: Its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 98:737-742.
- Egea, C., M. J. Dickinson, M. Candela, and E. Candela. 1999.  $\beta$ -1,3-glucanase isoenzymes and genes in resistant and susceptible pepper (*Capsicum annuum*) cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Physiologia Plantarum* 107:312-318.
- Egea, C., M. D. García-Pérez, and M. E. Candela. 1996b. Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 149:762-764.
- El Ghaouth, A., C. L. Wilson, and A. M. Callahan. 2003. Induction of chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-treatment. *Phytopathology* 93:349-355.
- Fernandez-Pavia, S. 1997. Host-Pathogen interactions in the root rot *Phytophthora capsici*/*Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph.D. Dissertation. New México State University. 109 p.
- Fulcher, R. G., M.E. Mc Cully, G. Setterfield, and J. Sutherland. 1976.  $\beta$ , 1-3 glucans may be associated with cell plate formation during cytokinesis. *Canadian Journal of Botany* 54:459-542.
- Gaspar, T., C. Penel, and H. Greppin. 1982. Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. University of Geneva Press, Geneva. 324 p.
- Gayoso, C., O. Martínez de Ilarduya, R. Pomar, and F. Merino. 2007. Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different solanaceae cultivars. *European Journal of Plant Pathology* 118:199-209.
- Glosier, B. R., E. A. Ogundiwin, G. S. Sidhu, D. R. Sischo, and J. P. Prince. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum* L.) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *Euphytica* 162:23-30.
- Godínez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, E. B. Sepúlveda-García, J. Lara-Reyna, R. Rojas-Martínez, and E. Zavaleta-Mejía. 2008. Phenylalanine ammonia lyase activity in chili CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology* 120:299-303.
- Godínez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, P. León-Mejía, E. Lozoya-Gloria, and E. Zavaleta-Mejía. 2009. Changes in the mevalonate pathway in chili CM-334 infected by *Nacobbus aberrans*. XII National Congress of Biochemistry and Plant Molecular Biology & 6th Symposium México-USA. November 9-13. Guanajuato, México. P-91.
- Godínez-Vidal, D., M. Soto-Hernández, M. Rocha-Sosa, E. Lozoya-Gloria, R.I. Rojas-Martínez, y E. Zavaleta-Mejía. 2010. Contenido de capsidiol en raices de Chile CM-334 infectadas por *Nacobbus aberrans* y su efecto en juveniles del segundo estadio. *Nematropica* 40:227-237.
- 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.
- Hammerschmidt, R., E.M. Nuckles, and F. Ku. 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiology Plant Pathology* 20:73-82.
- Hernández-Anguiano, A. M., E. Zavaleta-Mejía, y G. Carrillo. 1992. Efecto de *Nacobbus aberrans* (Thorne y Allen, 1944) en la infección de *Phytophthora capsici* Leo, en Chile. *Revista Mexicana de Fitopatología* 10:166-174.
- Hong, J. K., and B. K. Hwang. 2005. Functional characterization of *PR-1* protein,  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase genes during defense response to biotic and abiotic stresses in *Capsicum annuum*. *The Plant Pathology Journal* 21:195-206.
- Ishige, F., H. Mori, K. Yamazaki, and H. Imaseki. 1993. Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. *Plant Physiology* 101:193-199.
- Jung, W. J., Y. L. Jin, K. Y. Kim, R. D. Park, and T. H. Kim. 2005. Changes in pathogenesis-related proteins in pepper plants with regard to biological control of phytophthora blight with *Paenibacillus illinoisensis*. *BioControl* 50:165-178.
- Kim, S. G., and Y. H. Kim. 2009. Histological and cytological changes associated with susceptible and resistant responses of chili pepper root and stem to *Phytophthora capsici* infection. *The Plant Pathology Journal* 25:113-120.
- Kim, Y. J., and B. K. Hwang. 2000. Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related I protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia plantarum* 108:51-60.
- Krabel, D., W. Eschrich, S. Wirth, and G. Wolf. 1993. Callase (1,3- $\beta$ -D-glucanase) activity during spring reactivation in deciduous trees. *Plant Science* 93:19-23.
- Lee, Y. K., S. Hippe-Sanwald, S. C. Lee, H. Hohenberg, and B. K. Hwang. 2000. In situ localization of *PR-1* mRNA and *PR-1* protein in compatible and incompatible interactions of pepper stems with *Phytophthora capsici*. *Protoplasma* 211:64-75.
- Leubner-Metzger G., and F. Meins. 1999. Functions and regulation of plant  $\beta$ -1,3 glucanases (PR-2). Pp. 49-66. *in*: Datta S.K. and Muthukrishnan S. (Eds.). *Pathogenesis-related proteins in plants*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Linthorst, H. J. M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10:123-150.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ Ct method. *Methods* 25:402-408.
- 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 Soil* 338:399-409.
- Maldonado-Bonilla, L. D., M. Betancourt-Jiménez, and E. Lozoya-Gloria. 2008. Local and systemic gene expression of sesquiterpene phytoalexin biosynthetic enzymes in plant leaves. *European Journal of Plant Pathology* 121:439-449.
- Molot, P. M., P. Mas, and A. L. Hilario. 1980. La résistance du piment (*Capsicum annuum*) à *Phytophthora capsici* Leon. VI. Pouvoir inhibiteur du capsidiol sur la croissance et l'activité pectinolytique d'isolats d'agressivité variable. *Annales de Phytopathologie* 12:1-9.
- 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* 32:209-232.
- Niderman, T., I. Genetet, T. Bruyère, R. Gees, A. Stintzi, M. Legrand, B. Frutig, and E. Mösinger. 1995. Pathogenesis-related *PR-1* proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic *PR-1* of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 108:17-27.
- Oelke, M. L., P. W. Bosland, and P. Steiner. 2003. Differentiation of races specific resistance to *Phytophthora* root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. *Journal American Society Horticultural Science* 128:213-218.
- Oka, Y., I. Chet, and Y. Spiegel. 1997. Are pathogenesis-related proteins induced by *Meloidogyne javanica* or *Heterodera avenae* invasion? *Journal of Nematology* 29:501-508.
- Pan, S. Q., S. X. Ye, and J. Kuc. 1991. Association of  $\beta$ -1,3-glucanase activity and isoform pattern with systemic resistance to blue mould in tobacco induced by stem injection with *Peronospora tabacina* or leaf inoculation with tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39:25-39.
- Passardi, F., C. Cosio, C. Penel, and C. Dunand. 2005. Peroxidases have more functions than army knife. *Plant Cell Reports* 24:255-265.
- Pegard, A., A. Brizzard, O. Fazari, P. Soucaze, 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.
- Qiu, J., J. Hallmann, N. Kokalis-Burelle, D. B. Weaver,

- R. Rodríguez-Kábana, and S. Tuzun. 1997. Activity and differential induction of chitinase isozymes in soybean cultivars resistant or susceptible to root-knot nematodes. *Journal of Nematology* 29:523-530.
- Rahimi, S., R. N. Perry, and D. J. Wright. 1993. Induction and detection of pathogenesis-related proteins in leaves and roots of potato plants infected with pathotypes of *Globodera pallida*. *Fundamental and Applied Nematology* 16:549-556.
- Rahimi, S., R. N. Perry, and D. J. Wright. 1996. Identification of pathogenesis-related proteins induced in leaves of potato plants infected with potato cyst nematodes, *Globodera* species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49:49-59.
- Saikia R., B. P. Singh, R. Kumar, and D. K. Arora. 2005. Detection of pathogenesis-related proteins-chitinase and  $\beta$ -1,3- glucanase in induced chickpea. *Current Science* 89:659-663.
- Sarowar, S., Y. J. Kim, E. N. Kim, K. D. Kim, J. Y. Choi, N. I. Hyung, and J. S. Shin. 2006. Constitutive expression of two pathogenesis-related genes in tomato plants enhanced resistance to oomycete pathogen *Phytophthora capsici*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86:7-14.
- SAS Institute. 1999. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA. 1028 p.
- Schraudner, M., D. Ernst, C. Langebartels, and H. Sandermann. 1992. Biochemical plant responses to ozone. *Plant Physiology* 99:1321-1328.
- Selitrechnikoff, P. C. 2001. Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2883-2894.
- Silvar, C., F. Merino, and J. Díaz. 2008. Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 165:1120-1124.
- 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 annuum* 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.
- Van Loon, L. C. 1999. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. Pp. 1-12. *in*: Pathogenesis-related proteins in plants. Datta S. K. and Muthukrishnan, S. (Eds.). CRC Press LLC. USA.
- Van Loon, L. C., M. Rep, and C. M. J. Pieterse. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44:135-162.
- Vargas-Escobedo, M. T., E. Zavaleta-Mejía, y A. M. Hernández-Anguiano. 1996. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* en Chile serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26:159-166.
- Vidhyasekaran, P. 2008. Induction and evasion of pathogenesis-related proteins. Pp: 345-409. *in*: Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms. Second Edition. CRC Press, USA. 509 p.
- Villar-Luna, E., B. Reyes-Trejo, R. I. Rojas-Martínez, O. Gómez-Rodríguez, A. M. Hernández-Anguiano, y E. Zavaleta-Mejía. 2009. Respuesta hipersensitiva en el follaje de Chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.
- Ward, E. W. B., Ch. Unwin, and A. Stoessl. 1974. Post infectious inhibitors from plants. III. Fungitoxicity of the phytoalexin capsidiol and related sesquiterpenes. *Canadian Journal of Botany* 52:2481-2488.
- Zacheo, G., C. Orlando, and T. Bleve-Zacheo. 1993. Characterization of anionic peroxidases in tomato isolines infected by *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology* 25:249-256.
- Zavala-Páramo, G., M. P. Chávez-Moctezuma, E. García-Pineda, S. Yin, J. Chappell, and E. Lozoya-Gloria. 2000. Isolation of an elicitor-stimulated 5-*epi*-aristolochene synthase gene (Gpeas1) from chilli pepper (*Capsicum annuum*). *Physiologia Plantarum* 110:410-418.
- Zavaleta-Mejía, E., D. Godínez-Vidal, N. López-Martínez, and E. Villar-Luna. 2009. Changes induced by *Nacobbus aberrans* which could be related to *Phytophthora capsici* breaking of resistance in chilli. II International Congress of Tropical Nematology/XV Annual Meeting Organization of Nematologists of Tropical America. October 4-8. Maceió Alagoas State, Brazil. Abstract S31-1.
- Zinov'eva, S. V., N. I. Vasyukova, and O. L. Ozeretskovskaya. 2004. Biochemical aspects of plants interactions with phytoparasitic nematode: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40:111-119.
- Zinov'eva, S. V., E. A. Perekhod, A. V. II'ina, Z. V. Udalova, N. G. Gerasimova, N. I. Vasyukova, O. L. Ozeretskovskaya, and M. D. Sonin. 2001. PR proteins in plants infested with the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) Chitwood 1949. *Doklady Biological Sciences* 379:393-395.

Received:

3/VII/2011

Accepted for publication:

13/I/2012

Recibido:

Aceptado para publicación: