

RESEARCH/INVESTIGACIÓN

RESPUESTA DE LA LÍNEA 35-3 DE CHILE TIPO HUACLE (*CAPSICUM ANNUUM*) A DOS POBLACIONES DE *NACOBBUS ABERRANS*

Edgar A. Chavarro-Carrero¹, Guadalupe Valdovinos-Ponce^{1*}, Olga Gómez-Rodríguez¹, Cristian Nava-Díaz¹, Víctor H. Aguilar-Rincón², y Ernestina Valadez-Moctezuma³

¹Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230; ²Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad- Genética. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Carretera México- Texcoco km 36.5, Montecillo, Estado de México, C.P. 56230; ³Laboratorio de Biología Molecular. Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo km 38.5 Carretera México- Texcoco, Chapingo, Estado de México, C.P. 56230. *Autor para correspondencia: gvapon@colpos.mx.

ABSTRACT

E. A. Chavarro-Carrero, G. Valdovinos-Ponce, O. Gómez-Rodríguez, C. Nava-Díaz, V. H. Aguilar-Rincón, and E. Valadez-Moctezuma. 2017. Response of the Huacle chili pepper line 35-3 (*Capsicum annuum*) to two populations of *Nacobbus aberrans*. *Nematopica* 47:74-85.

Nacobbus aberrans is one of the ten most important plant-pathogenic nematodes with economic impact worldwide. Nematicide application is the principal management option to manage this pathogen. However, the reliance on nematicides has hampered other management practices and increased production costs and risks of environmental contamination; therefore, research characterization and validation of plant materials that are toxic to this nematode constitute a line of research aimed to contribute to the establishment of a viable management strategy. The main objectives of this research were to characterize the response of the Huacle chili pepper line 35-3 (H35-3) to two populations of *N. aberrans* (T85 or CM), and to determine level of resistance to this nematode. H35-3, Criollo de Morelos 334 (CM334), and California Wonder (CW) seedlings were transplanted into plastic bags with soil previously infested with 2,000 second-stage juveniles of *N. aberrans*. Nematodes established themselves in roots, but their development and reproduction were significantly affected by the host genotype (LSD $p = <0.0001$). Gall percentage and number of egg masses were significantly lower in H35-3 than in CW. Furthermore, the higher number of eggs of T85 and CM resulted in reproduction indices of 8.8 and 9.2, respectively, ranking this cultivar as resistant to these populations. Yield was significantly reduced in H35-3, CM334, and CW when they were challenged with the nematode; however, the overall yield response was lower in H35-3. These results allow us to consider H35-3 as a potential resistance source into a breeding program for genetic improvement.

Key words: false root-knot nematode, genetic improvement, plant nematode resistance, Solanaceae, tolerance.

RESUMEN

E. A. Chavarro-Carrero, G. Valdovinos-Ponce, O. Gómez-Rodríguez, C. Nava-Díaz, V. H. Aguilar-Rincón, y E. Valadez-Moctezuma. 2017. Respuesta de la línea 35-3 de chile tipo huacle (*Capsicum annuum*) a dos poblaciones de *Nacobbus aberrans*. *Nematopica* 47:74-85.

A nivel mundial, *Nacobbus aberrans* se encuentra dentro de las 10 especies de nematodos fitopatógenos de mayor importancia e impacto económico. La aplicación de nematicidas es la principal opción para su control; sin embargo, esta medida no ha sido eficiente, ha incrementado los costos de producción y el riesgo de contaminación ambiental, por lo que la búsqueda y caracterización de materiales resistentes o tolerantes a este nematodo constituyen una línea de investigación para contribuir en el establecimiento de medidas de manejo y control. Los objetivos de esta investigación fueron caracterizar la respuesta de la línea 35-3 de chile tipo huacle (H35-3) a dos poblaciones de *N. aberrans* (T85 o CM) y determinar su nivel de resistencia contra este nematodo. Plantas de las líneas H35-3, Criollo de Morelos 334 (CM334), y California Wonder (CW) se trasplantaron a sustrato previamente infestado con juveniles del segundo estadio (J2) de las poblaciones T85 o CM de *N. aberrans*. Los nematodos de las dos poblaciones penetraron y se establecieron en la raíces de todas las plantas, pero su desarrollo y reproducción se afectaron significativamente en función del genotipo del hospedante (DMS $p = <0.0001$). El porcentaje de agallamiento y el número de masas de huevos fueron significativamente

menores en la línea H35-3. Además, el bajo número de huevos producidos por T85 y CM dio lugar a índices de reproducción de 8.8 y 9.2, respectivamente, ubicándola como muy resistente a estas poblaciones. En los tres materiales de chile evaluados, el rendimiento se redujo significativamente cuando las plantas se infectaron con T85 o CM; sin embargo, la pérdida total fue menor en H35-3. Estos resultados nos permiten considerar a H35-3 como un material con potencial para su posible incorporación a un programa de mejoramiento genético.

Palabras clave: mejoramiento genético, nematodo falso agallador, resistencia a fitonematodos, Solanaceae, tolerancia.

INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annum* L.) es uno de los cultivos agrícolas de mayor importancia mundial, incluyendo México. De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2015), en el 2014 el chile verde ocupó en México una superficie de 148,968.51 ha, de la cual se derivó una producción de 2732,635.07 T con una derrama económica de 17,896 millones de pesos mexicanos.

Dos de los problemas fitosanitarios que se presentan en esta hortaliza son los causados por *Meloidogyne* spp. y *Nacobbus aberrans*, considerados dentro de las 10 especies de fitonematodos de mayor importancia e impacto económico en la producción de cultivos (Jones *et al.*, 2013). Debido a su amplia gama de hospedantes, pérdidas potenciales en la producción y a su “etapa parasítica dormante”, *N. aberrans* está registrado como plaga A1 por la EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), además es una especie regulada y cuarentenaria (Eves-van den Akker *et al.*, 2014). El síntoma característico que induce este patógeno es el agallamiento de las raíces debido a la ocurrencia de procesos de hipertrofia e hiperplasia asociados con la formación de sitios de alimentación (sincitios). Como consecuencia, se ocasiona la desorganización estructural (Castillo y Marbán, 1984) y fisiológica del sistema vascular (Davis *et al.*, 2000), de tal manera que se reduce la producción del cultivo.

El control de este patógeno se basa principalmente en el uso de productos químicos nematicidas, los cuales impactan negativamente al ambiente (Zavaleta, 2011), por lo que la búsqueda y caracterización de materiales resistentes o tolerantes son una opción importante en el control de este patógeno. Brunner de Magar (1967), evaluó 90 variantes de chile para encontrar fuentes de resistencia que pudieran utilizarse como progenitores de variedades resistentes a *N. aberrans*. De las 90 variantes, la variedad Peruana Amarillo Tacna (3-5-805) (*C. pendulum*) fue altamente resistente al no presentar agallamiento, y las variedades 3-79-1 *C. pendulum* SA 335 y 3-79-2 *C. pendulum* SA354 fueron resistentes al presentar agallas pequeñas y

escasas. De los 87 materiales restantes, 82 fueron altamente susceptibles.

Durante los años 2013-2014 Gómez-Rodríguez y colaboradores evaluaron la respuesta de seis líneas de chile tipo huacle (33-1, 33-3, 34-2, 34-3, 35-3, 35-5) infectadas artificialmente con una población de *N. aberrans* recolectada en los campos experimentales del Colegio de Postgraduados, en el Campus Montecillo. De acuerdo con sus resultados, las líneas 35-3 y 35-5 fueron resistentes no solo a este nematodo, sino también a *Meloidogyne incognita* y a al menos seis de 10 aislamientos de *Phytophthora capsici*. La línea 35-3 mostró un nivel de resistencia alta y moderada a *M. incognita* y *N. aberrans*, respectivamente. Dicha resistencia se determinó en función del número de agallas, número de huevos e índice de reproducción, pero no se consideraron alteraciones en variables de tipo agronómico (datos no publicados). Tampoco se determinó la viabilidad de las nuevas poblaciones originadas a partir del inóculo inicial.

El nivel de resistencia o susceptibilidad a un patógeno, y el nivel de agresividad del patógeno están en función de diferentes factores, entre ellos sus características genéticas y las condiciones ambientales que se presentan durante la interacción. De esta manera, la caracterización de plantas potencialmente resistentes a un patógeno debe evaluarse en condiciones óptimas no solo para el desarrollo de la planta y del patógeno, sino también para el desarrollo de la interacción misma (patosistema). En este contexto, las plantas que muestren resistencia o tolerancia a uno o más patógenos podrían incorporarse a programas de mejoramiento genético y liberarse posteriormente para formar parte de las estrategias de manejo y control de patógenos, lo que ayudaría a reducir los costos de producción y los riesgos de contaminación ambiental. Además, se reduciría la posibilidad de que estos productos generen resistencia en los patógenos y/o afecten negativamente las poblaciones de organismos benéficos.

Con base en estos antecedentes, los objetivos de la presente investigación fueron caracterizar la respuesta de la línea 35-3 de chile tipo huacle a dos

poblaciones de *N. aberrans* (T85 y CM), determinar su nivel de resistencia, y describir las alteraciones histológicas que inducen en las raíces de la línea 35-3 de chile tipo huacle (H35-3), Criollo de Morelos 334 (CM334), y California Wonder (CW).

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización de la respuesta de H35-3, CM334 y CW a la infección por las poblaciones de Nacobbus aberrans T85 o CM

Material vegetal: Semillas de la línea 35-3 de chile tipo huacle (H35-3) (resistencia moderada), Criollo de Morelos 334 (CM334) (susceptible) y California Wonder (CW) (altamente susceptible), se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0.5% y se enjuagaron con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas se colocaron sobre toallas de papel estéril humedecidas con agua destilada en recipientes de plástico oscuro y se incubaron a 27°C. Dos semanas después de la germinación, las plántulas se trasplantaron a charolas de unicel con una mezcla estéril de Peat-Moss y agrolita en proporción 1:1 y se mantuvieron en condiciones de invernadero a 25°C y 65% de HR.

Preparación de inóculo e inoculación

Como inóculo se utilizaron juveniles del segundo estadio (J2) de las poblaciones de *N. aberrans* T85 y CM. La población T85 se obtuvo de una población que se recolectó en el municipio de Tanhuato en el estado de Michoacán (Cabrera *et al.*, 2014) y la población CM se recolectó en los terrenos experimentales del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Las masas de huevos de cada población se extrajeron independientemente según la metodología de Vrain (1977). Los huevos se recolectaron en el tamiz de 500 mallas y se incubaron a 28°C en cajas Petri con agua destilada durante 10 días. Durante este tiempo se recuperaron los juveniles que eclosionaron diariamente y se mantuvieron a 4°C. El inóculo se ajustó a 2000 juveniles. La inoculación se hizo de manera independiente en plántulas de H35-3, CM334, y CW que habían desarrollado dos a tres pares de hojas (siete semanas de edad). El inóculo se aplicó directamente al sustrato con una jeringa hipodérmica y se regó para mantener la humedad. Treinta días después de la inoculación (ddi), las plántulas se trasplantaron a bolsas negras de plástico de 15 L con una mezcla de Peat Moss y agrolita estéril en relación 1:1, se mantuvieron en condiciones de invernadero (25°C y 65% de HR) durante dos meses con riego diario y se fertilizaron semanalmente con Ultrasol 18-18-18 Mg + M.E.[®] a una dosis de 1 g L⁻¹.

Diseño experimental

El ensayo se realizó una vez en un arreglo factorial en bloques completos al azar. Para cada variedad se establecieron tres tratamientos con 10 repeticiones cada uno. El tratamiento 1 consistió de plántulas inoculadas con la población T85; el tratamiento 2 de plántulas inoculadas con la población CM; y el tratamiento 3 de plántulas no inoculadas (control). La unidad experimental fue una planta.

Variables evaluadas y análisis estadístico

Se evaluaron periodo de incubación, índice de agallamiento, porcentaje de agallamiento, índice de masas de huevos, número de huevos e índice de reproducción. También se midió la altura de planta, peso seco aéreo (follaje y tallos), peso seco de raíz, número de frutos y rendimiento.

Para determinar el índice de agallamiento y el índice de masas de huevos, se contaron las agallas y las masas de huevos en la raíz de cada una de las plantas inoculadas. Las raíces se sumergieron en una solución de Floxina B (0.15 g L⁻¹ de agua) durante 20 min para que las masas de huevos se tiñeran de rojo y se facilitara el conteo. Los índices de agallamiento y de masas de huevos se determinaron con base en la escala de Taylor y Sasser (1978) (Cuadro 1). El índice de agallamiento se transformó a porcentaje de agallamiento (PA) con la fórmula de Townsed y Heuberger (1943), en donde n es el número de raíces evaluadas en cada categoría, V el valor numérico de cada categoría y N el número total de raíces evaluadas.

Para determinar el número de huevos, se hizo la extracción según Vrain (1977) y se contaron los

Cuadro 1. Escala para determinar los índices de agallamiento y masas de huevos (Taylor y Sasser, 1978).

Escala	Número de agallas o masas de huevos
0	Plantas sin agallas o sin masas de huevos
1	Plantas con 1 o 2 agallas o masas de huevos
2	Plantas con 3 a 10 agallas o masas de huevos
3	Plantas con 11 a 30 agallas o masas de huevos
4	Plantas con 31 a 100 agallas o masas de huevos
5	Plantas con más de 100 agallas o masas de huevos

Cuadro 2. Escala para determinar el nivel de resistencia (Taylor, 1971).

Índice de reproducción ^z	Respuesta
> 50	Susceptible
25 - 50	Poco resistente
10 - 25	Moderadamente resistente
1 - 10	Muy resistente
< 1	Altamente resistente
0	Inmune

^zExpresado en porcentaje (%).

huevos. Los resultados se expresaron en número de huevos por gramo de raíz (número de huevos/gr raíz). El índice de reproducción se determinó como el porcentaje de huevos en CM334 o H35-3 con respecto al número de huevos que se formaron en el material altamente susceptible CW (Taylor, 1971). La resistencia o susceptibilidad de las plantas de CM334 y H35-3 infectadas con T85 o CM se determinó con base en la escala de Taylor (1971) (Cuadro 2).

Una vez que las plantas iniciaron la etapa de producción, los frutos se cosecharon y pesaron diariamente durante un mes. Con los datos acumulados se calculó el rendimiento por hectárea. Los resultados se registraron en toneladas por hectárea (T ha⁻¹).

Los datos obtenidos de cada variable se sometieron a análisis de varianza y a la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) ($p = 0.05$) con el paquete estadístico SAS (2002).

Viabilidad de la primera generación de las poblaciones T85 y CM en plantas de jitomate

Para determinar la viabilidad de las generaciones de T85 y CM, el sustrato de cada uno de los tratamientos que se establecieron para caracterizar la respuesta de la línea H35-3 se colocó en bolsas negras de plástico de 15 L de capacidad. Posteriormente, se trasplantó una plántula de jitomate var. Rio Grande, de cuatro a seis 6 semanas de edad, en cada bolsa. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero, se regaron diariamente y se fertilizaron cada semana con Ultrasol 18-18-18 Mg + M.E.[®] (1 g L⁻¹). A los 60 días después del trasplante, se evaluaron el índice de agallamiento, porcentaje de agallamiento, índice de masas de huevos y número de huevos. Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y prueba de DMS ($p = 0.05$) con

el paquete estadístico SAS (2002).

Análisis histológico de las raíces de CW, CM334 y H35-3 infectadas con T85 o CM

Las semillas de cada uno de los materiales de chile, previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 0.5%, se colocaron para germinar en recipientes de plástico oscuro a 27°C. Dos semanas después, las plántulas se trasplantaron a vasos de plástico de 30 mL de capacidad con una mezcla estéril de Peat-Moss y agrolita (1:1) y se colocaron en una cámara de crecimiento controlado a 27°C y 12 horas luz. Cuando las plántulas desarrollaron de dos a tres pares de hojas (siete semanas de edad), se inoculó una suspensión de 2000 J2 de la población T85 o CM directamente al sustrato. Las plántulas se mantuvieron en cámara de crecimiento controlado con riego diario y bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad. El ensayo se hizo una vez en un arreglo completamente al azar. Para cada variedad de chile se establecieron los tratamientos descritos en el diseño experimental. Cada tratamiento constó de tres repeticiones con una planta como unidad experimental.

Para describir las alteraciones histológicas, se tomaron muestras de raíz a las 2, 7, 14, y 20 ddi. Los tiempos de muestreo se hicieron considerando que *N. aberrans* se establece en el sistema radical de CM334 a los 21 ddi (Godínez-Vidal *et al.*, 2013). Las raíces se lavaron con agua corriente para eliminar el sustrato y de la mitad de la raíz de todas las plantas se tomaron fragmentos de 1 a 3 cm de longitud y se fijaron al menos 24 h en una mezcla de formaldehído, ácido acético glacial, etanol al 96% y agua (10:50:5:35). Posteriormente, las raíces se lavaron con agua corriente durante 20 min y se deshidrataron gradualmente en etanol durante 3 hr (30, 50, 70, 85, 96, y 100%). Las muestras se colocaron en xilol puro por 3 h y se incluyeron en Paraplast regular (SIGMA[®]) en un horno para secado (RiosSA-EC[®]) a 55-60°C durante 48 h (López *et al.*, 2005). Las muestras se cortaron en plano transversal a 10 µm de grosor con microtomo rotatorio marca Leica RM2125.

Las secciones obtenidas se tiñeron con safranina-verde rápido (López *et al.*, 2005) y se observaron en un microscopio óptico marca Velab VE-B6. El registro fotográfico de las imágenes se hizo en un microscopio compuesto Rossbach MG-11T con cámara digital Canon EOS 50D. Se observaron 80 secciones histológicas obtenidas de las raíces de cada una de las repeticiones por tratamiento y por tiempo de muestreo (2, 7, 14, y 20 ddi), analizándose un total de 8640 secciones.

Cuadro 3. Periodo de incubación (PI), índice de agallamiento (IA), porcentaje de agallamiento (PA), índice de masas de huevos (IMH), número de huevos por gramo de raíz (NH) e índice de reproducción (IR) en plantas de California Wonder (CW), Criollo de Morelos CM334 (CM334), y Huacle 35-3 (H35-3) inoculadas con dos poblaciones de *Nacobbus aberrans* (T85 o CM).

Tratamiento	Chile																	
	CW							CM334							H-35-3			
	PI	IA	PA ^z	IMH	NH ^z	IR ^y	PI	IA	PA ^z	IMH	NH ^z	IR ^y	PI	IA	PA ^z	IMH	NH ^z	IR ^y
T85	38	4	74 b	4	668 a	100	42	3	52 c	4	163 b	24.4	42	2	28 d	3	59 c	8.8
CM	32	4	86 a	4	717 a	100	39	3	58 c	4	180 b	25.0	39	2	34 d	3	67 c	9.2
Control	0	0	0 e	0	0 d	0	0	0	0 e	0	0 d	0.0	0	0	0 e	0	0 d	0.0

^zPorcentaje de huevos de *N. aberrans* en CM334 o H35-3 con respecto al número de huevos que se formaron en el material altamente susceptible CW (Taylor, 1971).

^yPara las variables PA y NH, los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente diferentes (DMS $p = <0.0001$).

Cuadro 4. Efecto de dos poblaciones de *Nacobbus aberrans* (CM o T85) sobre la altura de planta (AP) (cm), peso seco aéreo (PSA) (g), peso seco de raíz (PSR) (g) y rendimiento (R) (T ha⁻¹) en los chiles California Wonder (CW), Criollo de Morelos CM334 (CM334), y Huacle 35-3 (H35-3).

Tratamiento	Chile																								
	CW							CM334							H-35-3										
	AP ^y	PSA ^z	PSR ^z	R ^z	AP ^y	PSA ^z	PSR ^z	R ^z	AP ^y	PSA ^z	PSR ^z	R ^z	AP ^y	PSA ^z	PSR ^z	R ^z									
T85	79.4 bc	29.4 f	15.5 c	45.1 b	78.8 b	46.6 b	20.0 b	22.2 e	69.4 de	38.1 cde	16.5 c	33.1 cd	63.9 f	26.0 f	14.5 c	40.4 b	72.7 cd	43.1 bc	19.9 b	20.1 e	65.2 ef	35.1 e	16.2 c	29.7 d	
Control	98.5 a	41.0 cd	19.7 b	66.6 a	96.6 a	58.2 a	24.6 a	38.6 bc	72.0 cd	38.0 de	17.4 bc	40.1 b													

^yCada columna representa el promedio de la variable evaluada en 10 plantas.

^zPara todos los chiles, los valores seguidos de letras diferente son estadísticamente diferentes (DMS $p = <0.0001$).

RESULTADOS

Caracterización de la respuesta de H35-3, CM334 y CW a la infección por las poblaciones de Nacobbus aberrans T85 o CM

El tiempo de aparición de las agallas después de la inoculación (periodo de incubación) fue más corto en el chile CW, independientemente de la población del nematodo inoculado (Cuadro 3). En los chiles CM334 y H35-3, el periodo de incubación fue de 39 ddi cuando las plantas se infectaron con la población CM y de 42 ddi cuando se inocularon con T85 (Cuadro 3).

El índice de agallamiento inducido por T85 o CM en las raíces de CW, CM334 y H35-3 fue de 4, 3, y 2, respectivamente (Cuadro 3); en consecuencia, el porcentaje de agallamiento fue estadísticamente menor en H35-3, principalmente cuando las plantas se infectaron con la población T85 ($p = <0.0001$) (Cuadro 3).

Las poblaciones del nematodo T85 o CM ocasionaron un índice de masas de huevos de 4 en los chiles CW y CM334, y de 3 en la línea H35-3 (Cuadro 3); y el menor número de huevos se presentó en las raíces de H35-3 ($p = <0.0001$) (Cuadro 3). En la línea CM334, las poblaciones de *N. aberrans* T85 o CM se reprodujeron la cuarta parte de lo que lo hicieron en la variedad CW, mientras que en H35-3 se reprodujeron menos del 10% (Cuadro 3). Con base en el índice de reproducción y en la escala de Taylor (1971), el chile CM334 fue moderadamente resistente a la población T85 y poco resistente a la población CM, mientras que la línea H35-3 fue muy resistente a las dos poblaciones de *N. aberrans*.

Los chiles CW y CM334 sin inocular presentaron una altura de planta mayor (superior a los 90 cm) que la línea H35-3. Sin embargo, esta variable se redujo significativamente ($p = <0.0001$) cuando

las plantas se inocularon con la población CM (Cuadro 4). La pérdida en peso seco aéreo y peso seco de raíz en las plantas de CW y CM334 fue igual independientemente de que se hayan inoculado con T85 o CM. En las raíces de H35-3 estas variables se mantuvieron sin variación en plantas inoculadas y sin inocular ($p = <0.0001$) (Cuadro 4).

En promedio, el número de frutos producidos en las plantas sin inocular fue mayor en CM334 (31 frutos) y menor en CW (11 frutos). Las plantas de H35-3 produjeron 25 frutos. En el chile CW, el rendimiento se redujo menos del 50% cuando las plantas se inocularon con CM (32.28%) o T85 (39.3%) (Cuadro 4). En CM334, el rendimiento fue similar en las plantas inoculadas, pero disminuyó prácticamente a la mitad (45.15%) con respecto al rendimiento de las plantas sin inocular ($p = <0.0001$) (Cuadro 4). La línea H35-3 inoculada con CM presentó una pérdida de poco más del 25% en el rendimiento ($p = <0.0001$) (Cuadro 4).

Viabilidad de la primera generación de las poblaciones T85 y CM en plantas de jitomate

Los ensayos sobre la viabilidad de las nuevas generaciones de los nematodos que se desarrollaron en las raíces de chile, indicaron que el índice de agallamiento en las raíces de jitomate fue más alto en las plantas que crecieron en el sustrato en donde se cultivó CW infectado con la población T85 o CM (Cuadro 5). Esta misma variable en las plantas que crecieron en el sustrato en donde se cultivaron los chiles CM334 o H35-3 infectados con la población T85 o CM fue de 2 y 1, respectivamente (Cuadro 5).

El porcentaje de agallamiento en las raíces de jitomate crecido en los sustratos en donde se cultivaron CW, CM334 o H35-3, infectadas con T85, fue del 62, 40, y 22% respectivamente; mientras que las plantas que crecieron en el sustrato en donde se

Cuadro 5. Índice de agallamiento (IA), porcentaje de agallamiento (PA), índice de masas de huevos (IMH) y número de huevos por gramo de raíz (NH) en plantas de jitomate (variedad Río Grande) cultivadas en sustratos en donde previamente se desarrollaron plantas de California Wonder (CW), Criollo de Morelos CM334 (CM334), y Huacle 35-3 (H35-3) inoculadas con las poblaciones de *Nacobbus aberrans* T85 o CM.

Sustrato	Chile											
	CW				CM334				H-35-3			
	IA	PA ^z	IMH	NH ^z	IA	PA ^z	IMH	NH ^z	IA	PA ^z	IMH	NH ^z
T85	3	62 a	3	757 a	2	40 b	2	139 c	2	22 c	1	72 e
CM	2	42 b	2	564 b	1	20 cd	1	102 d	1	14 d	1	69 e
Control	0	0 e	0	0 f	0	0 e	0	0 f	0	0 e	0	0 f

^zPara las variables PA y NH, los valores seguidos de letras diferentes son estadísticamente diferentes (DMS $p = <0.0001$).

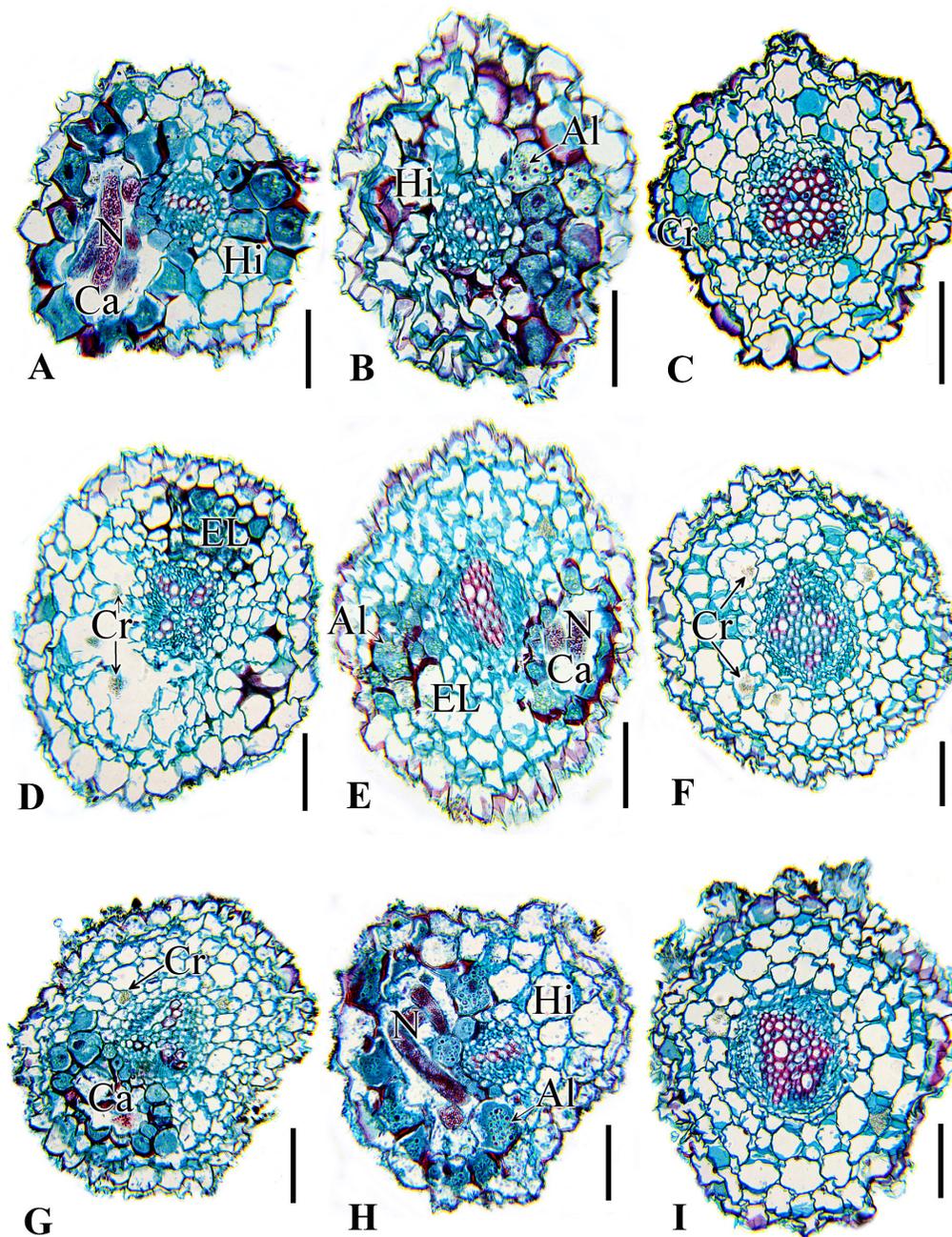


Figura 1. Cortes transversales de raíces de California Wonder (A, B, y C), Criollo de Morelos 334 (D, E, y F), y Huacle 35-3 (G, H, e I) a los 14 días después de haberse infectado artificialmente con *Nacobbus aberrans* población T85 (A, D, y G) o con la población CM (B, E, y H). Los paneles C, F e I corresponden a secciones de raíces de plantas de California Wonder, Criollo de Morelos 334 y Huacle 35-3 no inoculadas, respectivamente. En los paneles C, F, e I se observa la estructura monarca, tetrarca y monarca de las raíces de CW, CM34, y H35-3, respectivamente. En todas las interacciones, las células del parénquima cortical se hipertrofiaron, y hubo engrosamiento y lignificación de la pared celular. Las células también presentaron almidón y sustancias ergásticas cristalinas. Los juveniles y adultos inmaduros de *N. aberrans* formaron cavidades en la corteza durante su etapa migratoria. En las cavidades se observaron signos del nematodo. Al= almidón, Ca= cavidad, Cr= cristales, EL= engrosamiento y lignificación de paredes celulares, Hi= hipertrofia, N= nematodo. Escala: 100 μ m.

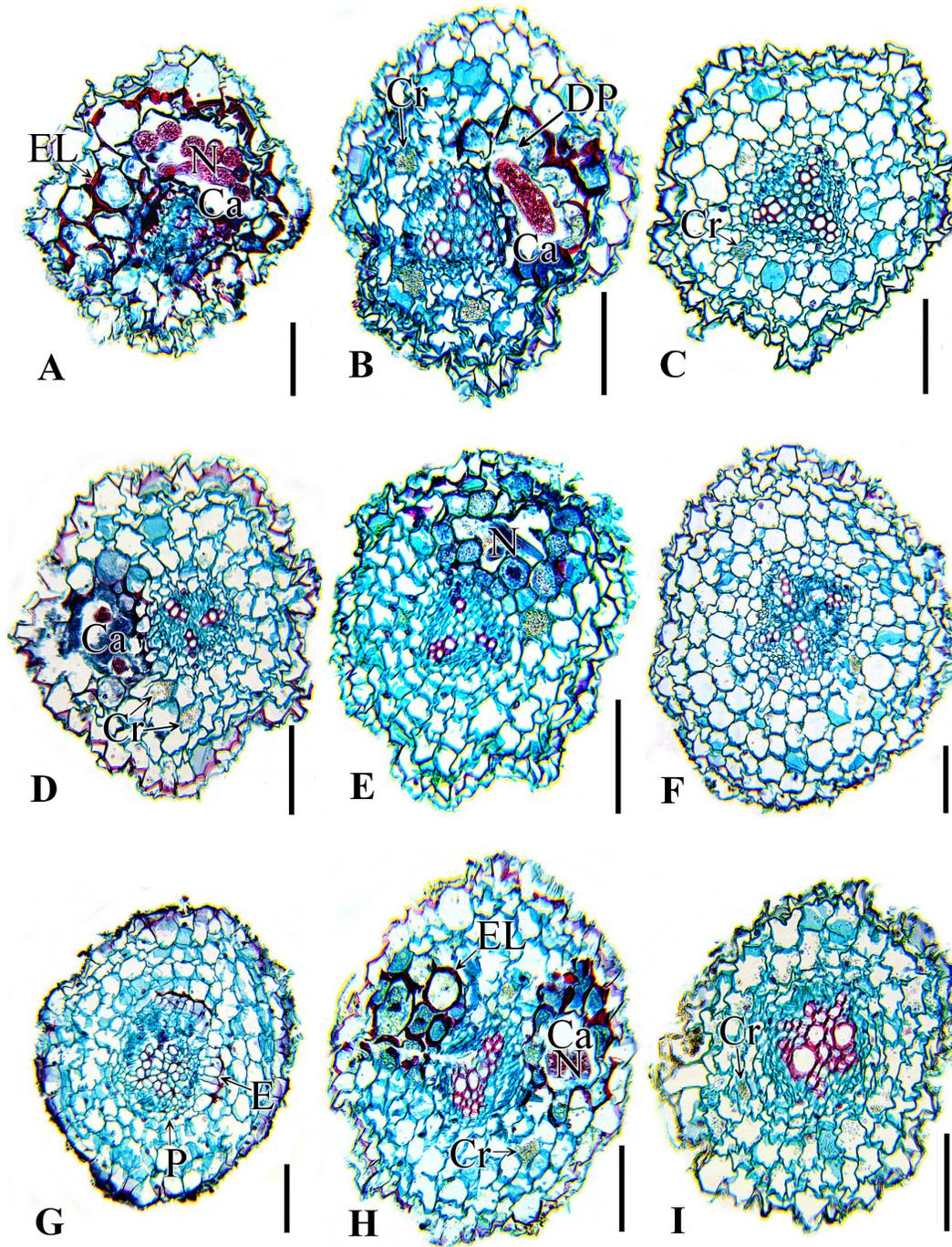


Figura 2. Cortes transversales de raíces de California Wonder (A, B, y C), Criollo de Morelos 334 (D, E, y F) y Huacle 35-3 (G, H, e I) a los 20 días después de haberse infectado artificialmente con *Nacobbus aberrans* población T85 (A, D, y G) o con la población CM (B, E, y H). Los paneles C, F, e I corresponden a secciones de raíces de plantas no inoculadas de California Wonder (triarca), Criollo de Morelos 334 (tetarca), y Huacle 35-3 (monarca), respectivamente. Las paredes celulares del parénquima cortical presentaron degradación parcial, principalmente en aquellas que rodean las cavidades que forma el nematodo. Los cristales en las células de la corteza fueron más evidentes en las raíces infectadas. Las células de parénquima de la endodermis y del periciclo mostraron hipertrofia e hiperplasia. Ca= cavidad, Cr= cristales, DP= degradación de paredes celulares, E= endodermis, EL= engrosamiento y lignificación de paredes celulares, N= nematodo, P= periciclo. Escala: 100 μ m.

desarrollaron los chiles infectados con la población CM, mostraron un porcentaje de agallamiento del 42, 20, y 14%, respectivamente (Cuadro 5). En ninguna de las raíces de las plantas de jitomate que crecieron en el sustrato en donde se desarrollaron los chiles sin inocular (control) hubo formación de agallas (Cuadro 5).

El mayor índice de masas de huevos se presentó en las plantas de jitomate que crecieron en el sustrato en donde se desarrolló CW infectado con T85 o CM (Cuadro 5), mientras que en las plantas que crecieron en el sustrato en donde se cultivó el chile H35-3 esta variable fue de 1 independientemente del nematodo presente en el sustrato (Cuadro 5). El mayor número de huevos producidos por las poblaciones del nematodo se observó en las plantas de jitomate que crecieron en el sustrato en donde se desarrolló el chile CW ($p = <0.0001$). El número de huevos fue significativamente menor en las plantas de jitomate crecidas en el sustrato en donde se cultivó el chile H35-3, ($p = <0.0001$) (Cuadro 5) y no hubo diferencias estadísticas cuando el sustrato estuvo infestado con la población T85 o CM (Cuadro 5).

Análisis histológico

Las raíces de las plantas que no se inocularon mostraron la estructura típica de una raíz primaria. Las células del parénquima de la corteza fueron grandes, de pared delgada y forma irregular; algunas presentaron sustancias ergásticas de apariencia cristalina, principalmente en las raíces de los chiles CW y H35-3 (Fig. 1 y 2 C, F, e I). Debido a que las secciones histológicas se hicieron en diferentes niveles, se observó que las raíces de CW son monarcas y triarcas, CM334 presentó raíces tetrarcas y H35-3 monarcas (Fig. 1 y 2 C, F, e I).

No se observaron alteraciones histológicas en el tejido radical de las plantas que se evaluaron a los 2 y 7 ddi. A los 14 y 20 ddi, las principales alteraciones se asociaron con el tamaño, volumen (hipertrofia) y división celular (hiperplasia). Las células de la endodermis y periciclo se hipertrofiaron (Fig. 1 A, D, H, y Fig. 2 G); y en el parénquima cortical se presentaron cavidades rodeadas por células hipertrofiadas con paredes generalmente lignificadas (Fig. 1 A, E, y G). Las células hipertrofiadas presentaron citoplasma denso, gránulos de almidón que se identificaron por su birrefringencia y cruz de malta, y sustancias ergásticas de apariencia cristalina (Fig. 1 B, D, y H); las paredes celulares se engrosaron ligeramente y lignificaron, lo que se evidenció por su color rojo intenso al teñirse con Safranina. En algunas regiones del parénquima hipertrofiado hubo degradación parcial de las paredes celulares (Fig. 1 A, E, H, y Fig. 2 A y H), y en el

parénquima de la corteza se presentaron cavidades con signos del patógeno (Fig. 1 A, E, H, y Fig. 2 B y E). No se detectaron diferencias en las alteraciones estructurales que se presentaron en las raíces de los chiles (CW, CM334, y H35-3) infectados con T85 o CM; sin embargo, dichas alteraciones fueron menos frecuentes en la línea H35-3.

DISCUSIÓN

En la presente investigación se caracterizó y comparó la respuesta de los chiles H35-3, CM334 y CW después de haberse inoculado con las poblaciones de *N. aberrans* T85 o CM. En las condiciones evaluadas, se observó que las dos poblaciones del nematodo fueron capaces de penetrar y establecerse en la raíces de todas las plantas, pero su desarrollo y reproducción se afectaron significativamente ($p = <0.0001$) en función del genotipo del hospedante.

En general, el porcentaje de agallamiento, el número de masas de huevos y el número de huevos fueron significativamente menores en la línea H35-3 y mayores en el chile CW. Estos parámetros son relevantes en la caracterización de materiales como fuentes potenciales de resistencia, ya que son indicadores de la reproducción del nematodo. En este contexto, los resultados de esta investigación sugieren que en la línea H35-3 se están expresando mecanismos de defensa bioquímica y/o estructural que se manifiestan de manera más rápida y en mayor magnitud que las respuestas que se presentan en CM334 y CW (Benhamou, 1996; Villar-Luna *et al.*, 2015). Dichas respuestas dan lugar a un ambiente desfavorable que inhibe o limita el ingreso, movimiento, alimentación y/o reproducción de *N. aberrans*. En los materiales susceptibles también podrían estar actuando efectores (proteínas) que suprimen el “sistema inmune” y la señalización de los mecanismos de defensa de la planta durante el estado sedentario biotrófico del nematodo (Hewezi y Baum, 2013; Hewezi, 2015).

El chile CM334 es altamente resistente a *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica* (Pegard *et al.*, 2005). Recientemente, Villar-Luna *et al.* (2015), reportaron que los genes que codifican para la síntesis de capsidiol (5-epi-aristolóqueno sintasa e Hidroximetilglutaril-CoA reductasa 2), para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR-1 y POX) y para un factor de transcripción (WRKY-a) se sobre-expresaron en plantas de chile CM334 inoculadas con *M. incognita* (interacción incompatible) o *N. aberrans* (interacción compatible). Es posible que todos o alguno de estos mecanismos se hayan presentado en las raíces de H35-3, en donde T85 o CM fueron capaces de reproducirse, aunque el número de huevos fue solo

el 9% del número de huevos que se formaron en las raíces del chile susceptible CW. El bajo número de huevos en H35-3 podría explicarse también por la manifestación de una reacción de hipersensibilidad o por la presencia de ácido clorogénico, respuestas que se presentaron en la interacción de CM334 con *M. arenaria*, *M. javanica*, o *M. incognita* (Pegard *et al.*, 2005), y en plantas de café (*Coffea canephora*) inoculadas con *M. incognita* raza 3 o *M. paranaensis*; en donde se sugiere que hay una respuesta “similar” a una reacción de hipersensibilidad que ocurre tardíamente y que está involucrada con la inhibición y degradación de las células gigantes inducidas por el nematodo (Lima *et al.*, 2015).

El índice de reproducción de T85 y CM en la línea H35-3 fue de 8.8 y 9.2, respectivamente; lo que nos permitió clasificarla como muy resistente a estas poblaciones. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con lo señalado por Gómez-Rodríguez y colaboradores (datos no publicados), quienes la catalogan como moderadamente resistente a la población CM. Además, el chile CM334 se reporta como susceptible a *N. aberrans* (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005; Gómez Rodríguez y colaboradores, datos no publicados); no obstante, en las condiciones en que se llevaron a cabo los ensayos, CM334 resultó ser moderadamente resistente a la población T85 y poco resistente a CM. Estas respuestas diferenciales podrían atribuirse a la diversidad genotípica de los chiles y de las poblaciones de *N. aberrans* que se evaluaron (Pegard *et al.*, 2005). Se conoce que algunas poblaciones de este patógeno establecen interacciones compatibles (enfermedad) con los cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris*) Canario y Negro Querétaro. Sin embargo, también hay algunas otras poblaciones del nematodo que no lo hacen y en donde *N. aberrans*, a pesar de haber penetrado las raíces, no es capaz de inducir agallamiento ni de reproducirse (Martínez-Fuentes *et al.*, 2009), dando lugar a una interacción incompatible (resistencia no hospedante) (Heath, 2000). También deben considerarse las condiciones ambientales en las que se llevaron a cabo los ensayos, principalmente la temperatura, ya que esta variable afecta el ciclo de vida de *N. aberrans* (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

La primera generación de las poblaciones de *N. aberrans* que se originaron en las raíces de H35-3, CM334 y CW infectaron las raíces de todas las plantas de jitomate. En las plantas que crecieron en el sustrato en donde se desarrolló el chile CW infectado con las poblaciones T85 y CM se presentó la mayor cantidad de huevos; mientras que en las plantas que se desarrollaron en el sustrato en donde creció CM334 o H35-3, el número de huevos fue significativamente menor. Dicha respuesta no implica que el jitomate haya incrementado su habilidad para

limitar la infección por el nematodo, sino que existe la posibilidad de que algunos mecanismos químicos de defensa en las plantas de chile no solo hayan afectado la reproducción del nematodo, sino también la viabilidad de los huevos que se quedaron en el sustrato y que fueron la fuente de inóculo para las plantas de jitomate.

Las alteraciones histológicas en las raíces de los chiles evaluados concuerdan con algunas de las modificaciones que se presentaron en el tejido radical de plantas de *C. annuum* y *C. baccatum* infectadas con *N. aberrans* (Castillo y Marbán, 1984), y en raíces de remolacha (*Beta vulgaris*) inoculadas con una población del nematodo recolectada en Nebraska (Inserra *et al.*, 1983). En la presente investigación, en las raíces de CW, CM334 y H35-3 se observaron cavidades en la corteza, las cuales presentaron signos del patógeno. Estas cavidades las forman los juveniles y adultos inmaduros de *N. aberrans* durante la etapa migratoria en la que van alimentándose de las células parenquimatosas de la corteza (Jones *et al.*, 2013) en raíces de chile (Castillo y Marbán, 1984), remolacha (Inserra *et al.*, 1893), y frijol cvs Canario y Negro Querétaro (Martínez-Fuentes *et al.*, 2009).

Las raíces de los materiales evaluados también presentaron hiperplasia e hipertrofia de las células parenquimatosas de la corteza y del tejido vascular. Se observaron núcleos de mayor volumen que en aquellos de las raíces no inoculadas; y engrosamiento, lignificación y degradación parcial de las paredes celulares del parénquima. La acumulación de almidón y la presencia de cristales se corroboró con lo reportado previamente por Castillo y Marbán (1984) en raíces de *C. annuum* y *C. baccatum*.

En la presente investigación no se observaron el origen ni el establecimiento de los sitios de alimentación (sincitios), a diferencia de lo reportado por Catillo y Marbán (1984). Esta discrepancia podría explicarse porque las condiciones ambientales en las que se realizaron los ensayos, principalmente de temperatura, no fueron las mismas, lo que implica un retraso en el ciclo de vida del nematodo y por tanto un retraso en la formación de los sincitios. Es posible también que no se hayan observado los sitios de alimentación porque las raíces de CW, CM334, y H35-3 solo se cortaron transversalmente. Castillo y Marbán (1984), detectaron los sitios de alimentación a los 30 días después de la penetración de *N. aberrans*, y los asociaron con hembras jóvenes localizadas en el cilindro central. Cincuenta días más tarde (60 días después de la penetración), el sincitio estaba completamente formado y asociado con hembras adultas. En las raíces de remolacha, Inserra *et al.* (1983), detectó los sitios de alimentación hasta los 25 ddi. Los sincitios fueron pequeños y

multinucleados, y se asociaron con la deformación de la raíz y con la proliferación anormal de raíces secundarias.

Todas las alteraciones en las características agronómicas que se evaluaron pueden explicarse por los cambios estructurales que ocurren en el sistema radical de las plantas de Chile; dichos cambios se asocian con los hábitos parasíticos que presenta *N. aberrans*, ya que es el único fitonematodo que es capaz de salir y reingresar al hospedante, presentar una etapa migratoria endoparasítica y una etapa sedentaria biotrófica (Eves van den Akker *et al.*, 2014), lo que implica fuertes modificaciones en la estructura de células y tejidos, actividad diferencial de genes asociados con el metabolismo, y respuestas al estrés (Kyndt *et al.*, 2013). En CW y CM334, hubo poco desarrollo de raíz, lo que explica la reducción en el peso seco de este órgano en comparación con las plantas sin inocular. Las alteraciones morfológicas y estructurales en el sistema radical se asocian con la reducción en la altura de planta y peso aéreo de estos materiales, ya que se limita o bloquea el movimiento de agua, minerales y nutrientes necesarios para el desarrollo. En todos los materiales evaluados, el rendimiento se redujo significativamente cuando las plantas se confrontaron con el nematodo. Sin embargo, la pérdida global fue menor en las plantas de H35-3 y mayor en CM334.

No hubo diferencias estructurales entre las raíces de H35-3, CM334, y CW infectadas con T85 o CM, lo cual coincide con lo reportado en *C. annuum* y *C. baccatum*, especies infectadas con *N. aberrans* (Castillo y Marbán, 1984). Sin embargo, el porcentaje de agallamiento, el número de masas de huevos y el número de huevos que se formaron en el sistema radical de la línea H35-3 fueron significativamente menores que en las raíces de los chiles CM334 y CW. Estos parámetros ubican a H35-3 como muy resistente a las dos poblaciones de *N. aberrans*. Dichas respuestas, así como las asociadas con las variables agronómicas que se midieron, nos permite considerar a H35-3 como un material con potencial para su posible incorporación a un programa de mejoramiento genético. De no poder utilizarse como fuente de resistencia, H35-3 podría considerarse como portainjerto de materiales cultivados susceptibles a *N. aberrans*, pero con características fenotípicas favorables para su comercialización.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, y al Colegio de Postgraduados por el financiamiento otorgado al primer autor para realizar sus estudios de Maestría en Ciencias; al M.C. Jorge

Valdez Carrasco por su asesoramiento en la toma de fotografías; y a los investigadores Dra. Rosa H. Manzanilla López y Dr. Alejandro Tovar Soto por la revisión del manuscrito.

LITERATURA CITADA

- Benhamou, N. 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 1:233-240.
- Brunner de Magar, P. 1967. Jicamilla del Chile causada por un nuevo nematodo y obtención de fuentes de resistencia. *Agrociencia* 1:76-91.
- Cabrera, H. A. J., G. Valdovinos P., G. Mora A., A. Rebollar A., y N. Marbán M. 2014. Ocurrencia de *Nacobbus aberrans* en cultivos hortícolas del noroeste de Michoacán, México. *Nematropica* 44:107-117.
- Castillo, P. G., y N. Marbán-Medoza M. 1984. Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen 1944 en raíces de *Capsicum annuum* y *C. baccatum*. *Agrociencia* 56:85-93.
- Davis, E. L., R. S. Hussey, T. J. Baum, J. Bakker, A. Schots, M. N. Rosso, and P. Abad. 2000. Nematode parasitism genes. *Annual Review of Phytopathology* 38:365-396.
- Eves-van den Akker, S., C. J. Lilley, E. G. J. Danchin, C. Rancurel, P. J. A. Cock, P. E. Urwin and J. T. Jones. 2014. The transcriptome of *Nacobbus aberrans* reveals insights into the evolution of sedentary endoparasitism in plan-parasitic nematodes. *Genome Biology and Evolution* 6:2181-2194.
- Godínez-Vidal, D., M. Rocha-Sosa, E. B. Sepúlveda-García, E. Lozoya-Gloria, R. I. Rojas-Martínez, L. Guevara-Olvera, and E. Zavaleta-Mejía. 2013. Transcript accumulation of the mevalonate pathway genes and enzymatic activity of HMGCoA-r and EAS in chilli CM-334 infected by the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. *Plant Soil* 372:329-348.
- Heath, M. C. 2000. Nonhost resistance and nonspecific plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 3:315-319.
- Hewezi, T. 2015. Cellular signaling pathways and posttranslational modifications mediated by nematode effector proteins. *Plant Physiology* 169:1018-1026.
- Hewezi, T., and T. J. Baum. 2013. Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26:9-16.
- Inserra, R. N., N. Vovlas, G. D. Griffin, and J. L. Anderson. 1983. Development of the false root-knot nematode, *Nacobbus aberrans*, on sugar beet. *Journal of Nematology* 15:288-296.

- Jones, J. T., A. Haegeman, E. G. J. Danchin, H. S. Gaur, J. Helder, M. G. K. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-López, J. E. Palomares-Rius, W. M. L. Wesemael and R. N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 14:946-961.
- Kyndt, T., P. Vieira, G. Gheysen, and J. de Almeida E. 2013. Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. *Planta* 238:807-818.
- Lima, E. A., C. Furlanetto, M. Nicole, A. C. M. M. Gomes, M. R. A. Almeida, A. Jorge J., V. R. Correa, S. M. Salgado, M. A. G. Ferrão and R. M. D. G. Carneiro. 2015. The multi-resistant reaction of drought-tolerant coffee 'Conilon clone 14' to *Meloidogyne* spp. and late hypersensitive-like response in *Coffea canephora*. *Nematology* 105:805-814.
- López, C. M. de L., J. Márquez G., G. Murguía S. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo de angiospermas, libro de laboratorio. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 178 pp.
- Manzanilla-López, R. H., M. A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R. N. Inserta, P. S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R. M. Souza, and K. Evans. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149-227.
- Martínez-Fuentes, R., A. Tovar-Soto, R. Torres-Coronel, y A. E. Brechú-Franco. 2009. Histopatología en cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) no hospedantes de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. *Nematropica* 39:311-317.
- Pegard, A., G. Brizzard, A. Fazari, O. Soucaze, P. Abad and C. Djian C. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95:158-165.
- SAS Institute. 2002. User's Guide of SAS (Statistical Analysis System) Version 9.0. SAS Institute Inc. 9th ed. Cary, North Carolina, USA. 550 pp.
- SIAP. Cierre de la producción agrícola. 2015. Disponible en línea: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/> [consultado febrero de 2016].
- Taylor, A. L. 1971. Introduction to research on plant nematology. A FAO guide to the study and control of plant-parasitic nematodes. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. 133 pp.
- Taylor, A. L., and J. N. Sasser. 1978. Biology, identification and control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* species). International *Meloidogyne* Project. Department of Plant Pathology North Carolina State University and the United States Agency for International Development. Raleigh, North Carolina, U.S.A. 107 pp.
- Townsend, G. R., and J. W. Heuberger. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicides experiments. *The Plant Disease Report* 27:340-343.
- 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.
- Villar-Luna, H., B. Reyes-Trejo, O. Gómez-Rodríguez, E. Villar-Luna, y E. Zavaleta-Mejía. 2015. Expresión de genes de defensa y acumulación de capsidiol en la interacción compatible chile CM334/*Nacobbus aberrans* e incompatible chile CM334/*Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 45:9-19.
- Vrain, T. C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inoculum. *Journal of Nematology* 9:249-251.
- Zavaleta M. E. 2011. Especies de nematodos que dañan hortalizas. Pp. 63-78 in Anaya. R. S. (ed.). Hortalizas Plagas y Enfermedades. Trillas. México. 544 p.

Received:

11/X/2016

Accepted for publication:

9/I/2017

Recibido:

Aceptado para publicación: