

CONTENIDO DE CAPSIDIOL EN RAÍCES DE CHILE CM-334 INFECTADAS POR *NACOBBUS ABERRANS* Y SU EFECTO EN JUVENILES DEL SEGUNDO ESTADIO

D. Godinez-Vidal¹, M. Soto-Hernández¹, M. Rocha Sosa², E. Lozoya-Gloria³, R. I. Rojas-Martínez¹, L. Guevara Olvera⁴, y E. Zavaleta-Mejía^{1*}

¹Laboratorio de Fisiología de la Interacción Planta-Patógeno. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carr. México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México CP 56230; ²Departamento de Biología Molecular de Plantas. Instituto de Biotecnología-UNAM. Av. Universidad No. 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México CP 62210; ³Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Productos Naturales de Plantas. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Km 9.6 Libramiento Norte Carr. Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, México CP 36821; ⁴Departamento de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Celaya. Av. Tecnológico y A., García Cubas S/N, Apdo. Postal 57. Celaya, Guanajuato, CP 38010; *Correspondencia: zavaleta@colpos.mx

RESUMEN

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

Los objetivos del presente trabajo fueron comparar la acumulación de la fitoalexina capsidiol en raíces de chile (*Capsicum annuum* L.) CM-334 no infectadas e infectadas con *Nacobbus aberrans*, y determinar el efecto del capsidiol en juveniles del segundo estadio (J₂) del nematodo *in vitro*. El contenido de capsidiol en las raíces de plantas inoculadas con 2000 J₂ y mantenidas en cámaras de crecimiento fue menor que el encontrado en las raíces no inoculadas; tal reducción fue significativa a los 7 (Tukey, $\alpha = 0.01$) y a los 14 días (Tukey, $\alpha = 0.05$) después de la inoculación con el nematodo. En plantas de un experimento realizado en invernadero con suelo naturalmente infestado con *N. aberrans*, también se obtuvo un menor contenido de capsidiol en plantas infectadas por el nematodo en comparación con las no infectadas; las diferencias fueron significativas a los 14 (Tukey, $\alpha = 0.01$) y a los 21 días (Tukey, $\alpha = 0.05$) posteriores al trasplante en suelo infestado. La exposición de los J₂ de *N. aberrans* al capsidiol, causó la inmovilización de los juveniles, la cual aumentó en la medida en que se incrementó la concentración (desde 0.01 hasta 1.50 μg de capsidiol/mL) y el tiempo de exposición a la fitoalexina. Este efecto en los juveniles se observó a partir de las 24 h de exposición al compuesto y fue más evidente a las 72 h, tiempo en el que se encontraron diferencias altamente significativas entre todas las concentraciones probadas en comparación con el testigo (Tukey, $\alpha = 0.0001$). Sin embargo, los J₂ recobraron su movilidad cuando el capsidiol fue reemplazado por agua, lo que sugiere que el efecto de la fitoalexina fue sólo nematostático. El hecho de que el capsidiol fue tóxico a *N. aberrans* y de que hubo una reducción en la acumulación de la fitoalexina en las raíces infectadas por el nematodo, sugiere que los mecanismos de defensa del chile CM-334 pueden ser abatidos por el nematodo para favorecer su establecimiento y desarrollo.

Palabras clave: Fitoalexinas, HPLC, Mecanismos de defensa, Nematodo falso nodulador.

ABSTRACT

Godinez-Vidal, D., M. Soto-Hernández, M. Rocha Sosa, E. Lozoya-Gloria, R. I. Rojas-Martínez, L. Guevara Olvera, y E. Zavaleta-Mejía. 2010. Capsidiol content in CM-334 pepper roots infected with *Nacobbus aberrans* and its effect on second stage juveniles. *Nematropica* 40:227-237.

The objectives of the present work were to compare the accumulation of the phytoalexin capsidiol in roots of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) CM-334 non-infected and infected with *Nacobbus aberrans*, and to determine the effect of capsidiol on second stage juvenile's nematode (J₂) *in vitro*. Cap-

sidiol content in roots of plants inoculated with 2000 J₂ and maintained in growth chambers was lower than in the non-inoculated ones. The reduction was significant at 7 (Tukey, $\alpha = 0.01$) and 14 (Tukey, $\alpha = 0.05$) days after nematode inoculation. In plants of an experiment carried out under greenhouse conditions with soil naturally infested with *N. aberrans*, a lower accumulation of capsidiol was also shown in plants infected by the nematode in comparison to the non-infected ones. Differences were significant at 14 (Tukey, $\alpha = 0.01$) and 21 (Tukey, $\alpha = 0.05$) days after planting into the infested soil. Exposure of *N. aberrans* juveniles to capsidiol resulted in nematode immobilization. This effect increased with higher capsidiol concentration (from 0.01 to 1.50 μg of capsidiol/mL) and longer exposure periods. Juvenile's immobilization was observed at 24 h of exposure being more evident at 72 h, where differences were highly significant at all tested concentrations in comparison to the control (Tukey, $\alpha = 0.0001$). However, the phytoalexin effect was only nematostatic since J₂ recovered their mobility when capsidiol was replaced by water. The reduction of phytoalexin accumulation in nematode infected roots and the capsidiol toxicity to *N. aberrans* suggest that the plant defense mechanisms of chilli pepper CM-334 may be arrested by the nematode to favor its establishment and development.

Key words: Defense mechanisms, False root-knot nematode, HPLC, Phytoalexins.

INTRODUCCIÓN

Una de las principales enfermedades que limita la producción de chile (*Capsicum annuum* L.) en México, es la marchitez ocasionada por *Phytophthora capsici* L. y se considera que la mejor estrategia para su manejo es el uso de variedades resistentes. La línea de chile tipo serrano Criollo de Morelos 334 (CM-334) destaca por el alto grado de resistencia mostrado a las cepas más patogénicas de *P. capsici* (Redondo y Rodríguez, 1987; Fernández-Pavía, 1997; Glosier *et al.*, 2008). A pesar de esta resistencia las plantas han mostrado susceptibilidad al oomiceto cuando son previamente inoculadas con el nematodo falso agallador *Nacobbus aberrans* (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). Como ocurre con otros nematodos que inducen en su hospedante la formación de sitios especializados de alimentación, *N. aberrans* provoca modificaciones morfológicas (Manzanilla-López *et al.*, 2002), a nivel celular (Castillo y Marbán-Mendoza, 1984) y molecular (Godinez-Vidal *et al.*, 2009) en las raíces de las plantas hospedantes.

La resistencia de CM-334 a *P. capsici* se asocia con la reacción de hipersensibilidad

(Fernández-Pavía, 1997; Villar-Luna *et al.*, 2009), y la producción de diferentes metabolitos cuya síntesis se dispara como consecuencia de la interacción con el patógeno (Fernández-Pavía, 1997; Candela *et al.*, 2000; López, 2007; Godinez-Vidal *et al.*, 2008). Uno de los compuestos probablemente asociados con la resistencia de CM-334 al oomiceto es la fitoalexina capsidiol, la cual puede acumularse en concentraciones tóxicas (Candela *et al.*, 2000; Villar-Luna *et al.*, 2009). Con frecuencia en interacciones incompatibles chile-*P. capsici*, la respuesta de hipersensibilidad va acompañada por la acumulación de capsidiol en cantidades cuantificables (Ward, 1976; Egea *et al.*, 1996a). Por ejemplo en los genotipos de chile Yolo Wonder, Americano y Smith-5 resistentes a *P. capsici*, el capsidiol se acumuló en las zonas necróticas de los tallos luego de la inoculación con el oomiceto (Egea *et al.*, 1996a).

El capsidiol es la principal fitoalexina sesquiterpénica sintetizada en chile (Kuc y Rush, 1985) y su síntesis y acumulación se dispara como consecuencia de la aplicación o presencia de diversos estimuladores bióticos (Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria, 1996) y/o abióticos (Back *et al.*, 1998).

También, es una de las fitoalexinas más estudiadas con relación al nivel de producción luego del ataque principalmente por oomicetos y hongos fitopatógenos. Sin embargo, a pesar del conocimiento relativamente amplio que se tiene acerca de esta fitoalexina, poco se sabe de la dinámica de su acumulación en raíces infectadas por nematodos agalladores y de su efecto tóxico en estos fitopatógenos. En general, el conocimiento acerca de la acumulación de fitoalexinas en interacciones planta-nematodo es incipiente comparado con el que se tiene para otros fitopatógenos. De los reportes que existen podemos citar la acumulación de gliccolina en plantas de soya después de la infección por *Meloidogyne incognita* (Kaplan *et al.*, 1980) y *Heterodera glycines* (Huang y Barker, 1991). En el caso de la interacción de *Pinus strobus*-*Bursaphelenchus xylophilus* ocurrió la acumulación de un estilbeno (3-*O*-metildihidropinosilvin estilbenoide) y una flavonona (2*S*-pinocembrin flavonona), ambos con propiedades antimicrobianas (Hanawa *et al.*, 2001).

Respecto a la interacción compatible chile CM-334-*N. aberrans*, aunque se tiene el antecedente de que en presencia del nematodo hubo una menor acumulación de la fitoalexina capsidiol (Godínez-Vidal *et al.*, 2009), se desconoce tanto la relación que existe entre la acumulación del capsidiol y el desarrollo del nematodo en las raíces infectadas, como la toxicidad de la fitoalexina en el nematodo. Por otro lado, se tiene evidencia de que en plantas de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans* se abatieron algunos mecanismos de defensa, como la actividad de las enzimas PAL y peroxidadas, el contenido de fenoles solubles y de capsidiol en comparación con las plantas no inoculadas con el nematodo (Godínez-Vidal *et al.*, 2008; Zavaleta-Mejía *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere que la susceptibilidad del chile CM-334 a *P. capsici* en

presencia de *N. aberrans* podría parcialmente explicarse por la reducción en algunos de sus mecanismos de defensa. Con base en estos antecedentes los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Comparar la acumulación de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas con *N. aberrans* y no infectadas, a diferentes tiempos posteriores a la inoculación con el nematodo y 2) determinar el efecto del capsidiol en juveniles del segundo estadio del nematodo en condiciones *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Interacción de las plantas de chile con el nematodo

Se utilizaron plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) CM-334 resistentes a *P. capsici* con seis a ocho hojas verdaderas. En las cámaras de crecimiento se establecieron 80 plantas, 40 fueron inoculadas con 2000 juveniles del segundo estadio (J₂) de *N. aberrans* y las 40 restantes constituyeron los testigos no inoculados. Los juveniles infectivos J₂ del nematodo, se obtuvieron a partir de masas de huevos extraídas de raíces de jitomate agalladas por el nematodo. Las masas se incubaron a + 28°C en cajas Petri con agua destilada y una vez emergidos los J₂, se cuantificó el número de juveniles por mL de agua. Se inocularon 2000 J₂ en la base del tallo de cada planta y a los 0, 2, 7, 14 y 21 días después de la inoculación (ddi), se colectaron las raíces de ocho plantas de cada uno de los tiempos, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

En invernadero se establecieron 74 plantas, 37 fueron transplantadas en suelo naturalmente infestado con el nematodo, y las 37 restantes en suelo esterilizado (plantas testigo). A los 0, 7, 14, 21 y 28 días después del trasplante (ddt), se colectaron las raíces de siete plantas de cada tiempo, se congelaron y almacenaron.

Extracción, detección y cuantificación de capsidiol

Se empleó la metodología propuesta por Egea *et al.* (1996b), con algunas modificaciones. Se maceraron 0.5 g de raíces del chile en nitrógeno líquido y se mezclaron con 10 mL de cloroformo-metanol (2:1 v/v). Los extractos obtenidos se filtraron a través de papel Whatman® No.3, se les adicionó una pequeña cantidad de sulfato de sodio anhidro, se incubaron a temperatura ambiente por 12 h en oscuridad y posteriormente se evaporaron a sequedad a 65°C en baño María. El residuo se resuspendió en 2 mL de metanol y se cubrió con papel aluminio. El capsidiol se detectó mediante el desarrollo de cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ de 10 × 10 cm, en ciclohexano:acetato de etilo (1:1 v/v). Los cromatofolios se asperjaron con vainillina-etanol al 10% y ácido sulfúrico-etanol al 10% y se incubaron a 110°C por 5 min, empleando capsidiol (10 µg/µL) como estándar (donado por el MC. Edgar Villar-Luna). La banda correspondiente al capsidiol se raspó de cada cromatofolio, eluyó en 200 µL de metanol e incubó a -20°C toda la noche. La fase acuosa se separó centrifugando a 14,000 rpm por 1 min y se cuantificó.

La cuantificación de capsidiol se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), y por espectrofotometría. Para el análisis por HPLC se utilizó un equipo Hewlett Packard Mod. 1100 equipado con detector de Arreglo de Diodos y lámpara de Deuterio (UV)-Wolframio (VIS-IR); se empleó una columna Zorbax XDB-CN 3 × 150 mm con un tamaño de partícula de 5 µm, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min y con una proporción de 97:3 hexano:isopropanol (v/v) (Moreau *et al.*, 1992). La curva patrón se obtuvo utilizando diferentes concentraciones de capsidiol (5, 10, 15, 20, 40 y 100 ng/µL). Se analizaron tres muestras de los extractos

obtenidos de las raíces de ambos experimentos y de cada una se realizaron tres lecturas de 20 µL. La concentración de capsidiol se calculó mediante el software Agilent ChemStation versión B02.01.

La determinación espectrofotométrica se llevó a cabo empleando dos agentes reveladores, vainillina y metanol. Para la determinación por vainillina, se empleó la metodología propuesta por Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria (1996) con algunas modificaciones. Se tomaron 25 µL de cada muestra y se agregaron 25 µL de una mezcla de vainillina al 2% y ácido sulfhídrico 1:1 (v/v); posteriormente, se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 30 min para permitir el desarrollo de color, y se cuantificaron a 640 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Para la cuantificación por metanol, primero se realizó un escaneo de 200 a 800 nm UV-Vis utilizando como control al metanol y como referencia el estándar capsidiol y se determinó que la máxima absorbancia del estándar capsidiol, fue a 230 nm. La curva patrón se obtuvo como se indicó con anterioridad. Se tomaron 10 µL de cada muestra, se les agregó 1 µL de sulfato cérico amoniacal (2N H₂SO₄) y se incubaron a temperatura ambiente por 3 min. La cuantificación se realizó a 230 nm en el NanoDrop ND-1000.

Efecto del capsidiol en J₂ de N. aberrans

Debido al bajo grado de solubilidad que presenta el capsidiol en agua, primero se disolvió 1 mg del compuesto en 300 µL de MeOH y posteriormente se aforó con agua destilada esterilizada a 1 mL, para tener una solución stock 1 mg/mL. Las concentraciones a probar se definieron tomando como base la concentración promedio de capsidiol (1.50 µg/g de raíz), que se obtuvo en raíces de chile CM-334 infectadas con *N. aberrans* en la primera fase del

presente estudio. Se establecieron ocho tratamientos con cuatro repeticiones en un diseño completamente al azar. Seis tratamientos correspondieron a diferentes concentraciones de capsidiol (0.01, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, y 1.50 μg de capsidiol/mL) y los dos restantes constituyeron los testigos, un testigo absoluto con agua (TA) y otro con metanol (TM). Este último se estableció con el fin de evaluar el efecto del metanol presente en la solución stock. Para evaluar el efecto del capsidiol en los J_2 de *N. aberrans*, se establecieron cuatro microsiracunas de vidrio conteniendo cada una 100 J_2 y la solución correspondiente a cada concentración probada. Se mantuvieron a 28°C y después de 24, 48 y 72 h, se cuantificó el número de juveniles inmóviles. Para determinar si los juveniles inactivos recuperaban o no su movilidad, al término de las 72 h de exposición se eliminó con cuidado la solución del tratamiento sustituyéndola por agua destilada esterilizada, y después de transcurridas 24 h se volvió a registrar el número de juveniles inactivos.

Con la finalidad de corroborar que se había logrado la solubilización del capsidiol se realizó la evaluación de su toxicidad sobre *P. capsici*; para ello se prepararon cajas Petri con medio V8 conteniendo un círculo de papel filtro Whatman® No.3 de aproximadamente 3 cm de diámetro, que fue previamente sumergido en una solución de 500, 1000 y 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En esta prueba también se incluyeron los testigos TA y TM. Para establecer el rango de concentraciones a probar se tomó como referencia lo reportado por Egea *et al.*, (1996a), quienes encontraron que una concentración de 1200 μg de capsidiol en el medio de cultivo tuvo un efecto tóxico sobre *P. capsici*. En cada caja se colocó sobre el papel filtro, un disco de medio V8 de 1 cm de diámetro colonizado por micelio de *P. capsici* (cepa 6143, proporcionada por la Dra. Sylvia Fernández Pavía, Cate-

drática de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo). Las cajas se incubaron a 28°C, y se midió el crecimiento radial del micelio después de 24, 48 y 72 h de exposición. Para determinar si el efecto del capsidiol era de tipo fungicida o solamente fungistático, después de las 72 h de exposición el micelio se transfirió a medio sin la fitoalexina.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se establecieron en un diseño completamente al azar. Con los datos obtenidos de cada variable se realizaron los análisis de varianza (ANOVA) correspondientes para detectar diferencias entre tratamientos y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

RESULTADOS

Detección y contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas por N. aberrans

En los cromatofolios de sílica gel después de la aspersión con vainillina y ácido sulfúrico, se evidenció la presencia de capsidiol al desarrollarse una banda de color azul violáceo con un valor de Rf igual a 0.2 después de incubarla a 110°C por 5 min (Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria, 1996; Egea *et al.*, 1996b). También en los cromatogramas obtenidos por HPLC se detectó un pico único a los 8.93 min (Fig. 1), correspondiente al capsidiol (Moreau *et al.*, 1992).

En los extractos de las raíces de chile CM-334 inoculadas con *N. aberrans*, el contenido de capsidiol siempre fue menor en comparación con el de las plantas testigo no inoculadas. En el experimento realizado en cámaras de crecimiento, el contenido de la fitoalexina se redujo significativamente en un 86 y 85% a los 7 (Tukey, $\alpha = 0.01$) y a los 14 días (Tukey, $\alpha =$

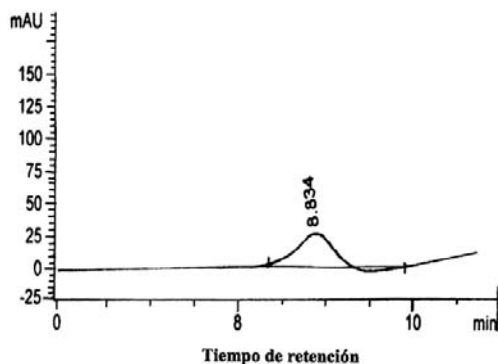


Fig. 1. Cromatograma del estándar capsidiol, obtenido con un detector de UV a $\lambda = 205$ nm. Se detectó un pico único a los 8.93 min.

0.05), respectivamente (Fig. 2A); mientras que, en el experimento en invernadero las reducciones fueron de 96 y 77% a los 14 (Tukey, $\alpha = 0.01$) y a los 21 días (Tukey, $\alpha = 0.05$) después del trasplante en suelo infestado con el nematodo, respectivamente (Fig. 2B). La tendencia en los resultados obtenidos en el contenido de capsidiol con los tres métodos utilizados (HPLC, vainillina y metanol), fue similar (datos no mostrados).

Efecto del capsidiol sobre P. capsici en condiciones in vitro

Con todas las concentraciones probadas se observó una reducción altamente significativa (Tukey, $\alpha = 0.0001$) en el crecimiento micelial del oomiceto a partir de las 24 h de exposición a la fitoalexina, con respecto a los testigos. Con la concentración mayor de capsidiol la reducción fue de 30 y 53%, a las 48 y 72 h de exposición, respectivamente (Fig. 3). Cuando el micelio se transfirió a medio sin la fitoalexina se reactivó su crecimiento, lo cual indicó que el efecto del capsidiol fue solamente fungistático.

Efecto del capsidiol en J_2 de N. aberrans

La exposición de los J_2 al capsidiol, afectó su movilidad y el porcentaje de

nematodos inmóviles se incrementó a medida que la concentración y el tiempo de exposición a la fitoalexina aumentaron. La inmovilización de los juveniles se observó desde las 24 h de exposición al compuesto; no obstante, el efecto fue más evidente a las 48 y 72 h de exposición. A las 48 h, se encontraron diferencias altamente significativas entre las concentraciones 0.01, 0.1 y 1.5 μg de capsidiol (Tukey, $\alpha = 0.0001$), y de éstas con respecto a los testigos. A las 72 h, el efecto del capsidiol en los juveniles fue más evidente, encontrándose diferencias altamente significativas entre todas las concentraciones en comparación con los testigos (Tukey, $\alpha = 0.0001$). Los nematodos recobraron su movilidad cuando después de 72 h de exposición al capsidiol, éste se sustituyó por agua destilada. A las 24 h después de haber retirado el capsidiol, aproximadamente el 87% de los juveniles recobraron su movilidad; esto sugiere, que el efecto del capsidiol fue sólo nematostático.

DISCUSIÓN

En interacciones incompatibles chile-*P. capsici* la fitoalexina capsidiol se acumula en concentraciones tóxicas para el oomiceto (Egea *et al.*, 1996a), tal respuesta fue también confirmada en la interacción chile CM-334-*P. capsici* (Villar-Luna *et al.*, 2009). Aunque en interacciones compatibles también se dispara la acumulación de capsidiol, su síntesis es más lenta y se acumula en menores cantidades (Egea *et al.*, 1996b). Tal es el caso de la interacción compatible CM-334-*N. aberrans*, en donde la acumulación de la fitoalexina siempre fue menor en las plantas infectadas con el nematodo en comparación con las plantas testigo. La reducción en la acumulación del capsidiol en las raíces infectadas por *N. aberrans*, sugiere que el nematodo ha desarrollado estrategias para abatir y sobrepasar las res-

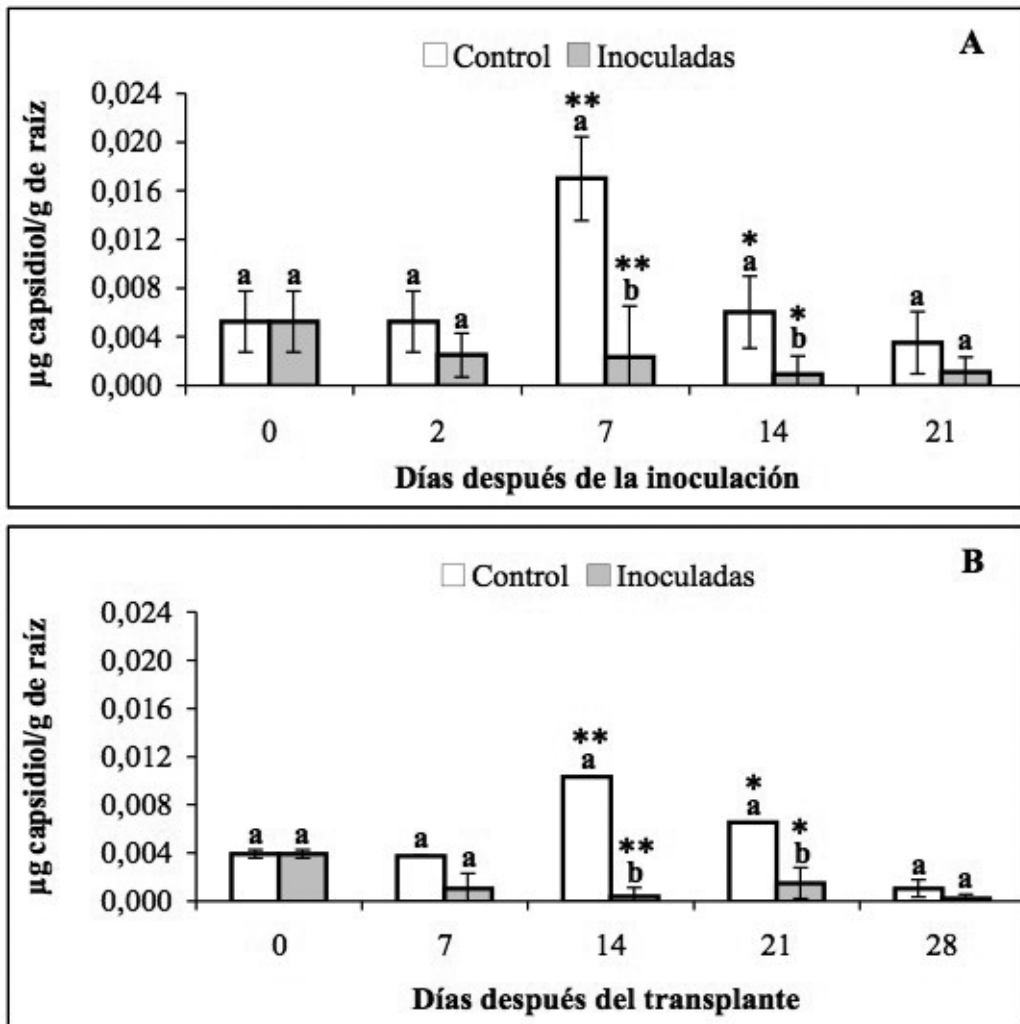


Fig. 2. Contenido de capsidiol en raíces de chile CM-334 infectadas y no infectadas por *N. aberrans* a diferentes tiempos posteriores a la exposición al nematodo. Experimento en cámaras de crecimiento (A) y en invernadero (B). Para cada tiempo, las barras con diferente letra fueron significativamente diferentes $\alpha = 0.05^*$, $\alpha = 0.01^{**}$ de acuerdo con la prueba de Tukey.

puestas de defensa de sus plantas hospedantes; tales estrategias pueden consistir en adaptaciones fisiológicas o de comportamiento (Hussey y Glundler, 1998). Los tiempos en que ocurrieron diferencias substanciales entre plantas inoculadas y no inoculadas con respecto al contenido de capsidiol entre ambos experimentos, no

fueron los mismos; el comportamiento diferente podría estar relacionado con los tiempos en que ocurre la mayor penetración del nematodo en las raíces. Previamente se observó que cuando plantas CM-334 se inocularon con J_2 , el mayor número de nematodos dentro de la raíz se presentó a los 7 días posteriores a la inoculación;

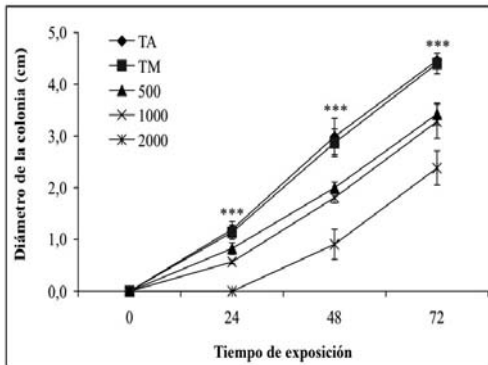


Fig. 3. Efecto del capsidiol sobre el crecimiento micelial de *P. capsici* *in vitro*. Para cada tiempo, las diferencias significativas entre las concentraciones probadas y los testigos se indican como $\alpha = 0.0001$ *** de acuerdo con la prueba de Tukey. (TA), Testigo Absoluto de agua; (TM), Testigo Metanol; (500, 1000 y 2000), μg de capsidiol/mL.

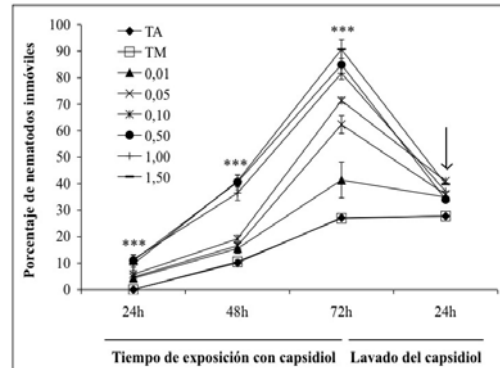


Fig. 4. Porcentaje de J_2 de *N. aberrans* inmóviles después de su exposición al capsidiol por 12, 24 y 72 h. La flecha indica el porcentaje de nematodos inmóviles 24 h después de substituir el capsidiol por agua. (***), diferencias altamente significativas entre las concentraciones probadas y los testigos ($\alpha = 0.0001$), de acuerdo con la prueba de Tukey. (TA), Testigo Absoluto de agua; (TM), Testigo Metanol; (0,01, 0,05, 0,10, 0,50, 1,00, y 1,50), μg de capsidiol/mL.

mientras que, cuando las plantas fueron expuestas en suelo naturalmente infestado fue hasta los 14 días después del trasplante que se registró el mayor número de nematodos dentro de la raíz (datos no publicados). En ambos ensayos fue evidente que el contenido de capsidiol en las plantas testigo no inoculadas no se mantuvo a nivel basal, sino que varió en los diferentes tiempos evaluados; de manera similar, Üstün (1995) observó que el contenido de capsidiol en las plantas testigo de diferentes genotipos de Chile, incluyendo a CM-334, no se mantuvo constante en los diferentes tiempos que se evaluaron.

Existe evidencia de que *N. aberrans* también podría estar interfiriendo con otras respuestas de defensa en plantas de Chile CM-334; por ejemplo, López (2007) reportó que los niveles de fenoles solubles totales y de ácido clorogénico en particular, fueron reducidos significativamente en presencia del nematodo. Al respecto, Pegard *et al.* (2005) asociaron la acumulación de ácido clorogénico con la resis-

cia del Chile CM-334 a *M. arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*. Asimismo, recientemente se consignó que la expresión de los genes *Hmg2* y *EAS*, ambos implicados en la síntesis de la fitoalexina capsidiol, fue modificada en las raíces de plantas CM-334 por *N. aberrans* (Godínez-Vidal *et al.*, 2009).

En este estudio, el capsidiol fue tóxico para *P. capsici* confirmando los resultados reportados por Egea *et al.* (1996a). Sin embargo, aún con la concentración mayor probada (2000 μg de capsidiol/mL) solamente se observó un efecto fungistático; mientras que los autores mencionados obtuvieron un efecto fungicida con concentraciones de 1204 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esta aparente discrepancia podría explicarse por las diferencias que existieron entre ambos estudios, respecto al tiempo de exposición del micelio del oomiceto a la fitoalexina. Mientras que Egea *et al.* (1996a) lo expusieron por 5 días, antes de transferirlo a medio libre del compuesto, en nuestro caso el tiempo de exposición fue de sólo 3 días. Por otro lado, las cepas de *P. capsici*

utilizadas fueron diferentes y no se puede descartar la posibilidad de que entre aislamientos haya variación en su nivel de sensibilidad al efecto tóxico del capsidiol o en su capacidad para detoxificarlo; la cepa 6143 utilizada en el presente estudio, fue seleccionada de entre 26 aislamientos por Fernández-Pavía (1997) por su alta agresividad. En relación con lo anterior, se ha reportado que *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* pueden mediante oxidación, convertir al capsidiol en capsenona cuya fungitoxicidad es menor (Ward y Stoessl, 1972; Stoessl y Ward, 1973). Es interesante resaltar que en contraste con los altos niveles de capsidiol que fueron tóxicos a *P. capsici* *in vitro*, para *N. aberrans* fueron aproximadamente 1000 veces menores.

Aún cuando el efecto antimicrobiano del capsidiol está ampliamente documentado (Stoessl *et al.*, 1972; Egea *et al.*, 1996a; Egea *et al.*, 1996b; Back *et al.*, 1998; Maldonado-Bonilla *et al.*, 2008; Villar-Luna *et al.*, 2009), hasta ahora no se contaba con información acerca de su efecto nematológico. Los resultados obtenidos en esta investigación indicaron que la fitoalexina tiene un efecto tóxico sobre los J₂ de *N. aberrans*, siendo de tipo nematostático. Este hallazgo es relevante, pues el abatimiento de la acumulación del capsidiol en las plantas CM-334 infectadas por *N. aberrans*, no solamente resulta ventajoso para el nematodo, sino también podría favorecer el establecimiento de otros patógenos en la raíz del chile. Al respecto, se menciona que plantas CM-334 resistentes a *P. capsici* se comportaron como susceptibles, es decir se rompió su resistencia, cuando el oomiceto se inoculó en plantas infectadas por *N. aberrans* (Vargas *et al.*, 1996; Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005). Marley y Hillocks (1994) también encontraron que en genotipos de *Cajanus cajan* resistentes a *Fusarium udum*, hubo decrementos en la acumulación de la

fitoalexina cajanol después de que las plantas fueron infectadas por *M. incognita* y *M. javanica*, lo que se asoció con el rompimiento de su resistencia al hongo.

En la presente investigación el contenido de capsidiol en las raíces de chile CM-334 infectadas por *N. aberrans*, fue menor en comparación con las plantas testigo, y este metabolito afectó negativamente la movilidad de los J₂ del nematodo. El hecho de que el capsidiol tenga un efecto nematostático en condiciones *in vitro* y de que la acumulación de esta fitoalexina en la raíz se reduzca en presencia del nematodo, sugieren que el abatimiento de este mecanismo de defensa en chile CM-334 inducido por *N. aberrans*, puede ser favorable para su establecimiento y desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al MC. Francisco Franco Navarro por su asesoría en el presente trabajo y por la revisión de este documento. Al MC. Rúben San Miguel Chávez por su apoyo en el manejo del HPLC. AL CONACYT por el financiamiento otorgado para el desarrollo del presente trabajo mediante el Proyecto 28594-b.

LITERATURA CITADA

- Back, K., S. He, K. U. Kim, and D. H. Shin. 1998. Cloning and bacterial expression of sesquiterpene cyclase, a key branch point enzyme for the synthesis of sesquiterpenoid phytoalexin capsidiol in UV-challenged leaves of *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiology* 39:899-904.
- 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.
- Castillo, P. G., y N. Marbán-Méndez. 1984. Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen 1944 en raíces de *Capsicum annuum* y *C. baccatum*. *Agrociencia* 56:85-93.
- 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.

- 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., D. García, and M. E. Candela. 1996b. Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 49:762-764.
- Fernández-Pavía, S. 1997. Host-Pathogen interactions in the root rot resistant *Phytophthora capsici*/*Capsicum annuum* CM-334 pathosystem. Ph. D. Thesis. New Mexico State University. Las Cruces, New Mexico. 109 p.
- Glosier B. R., E. A. Ogundiwin, G. S. Sidhu, D. R. Sicho, and J. P. Prince. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. *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 chilli 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.
- Hanawa, F., T. Yamada, and T. Nakashima. 2001. Phytoalexins from *Pinus strobus* bark infected with pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Phytochemistry* 57:223-228.
- Huang, J.-S., and K. R. Barker. 1991. Glyceollin I in soybean-cyst nematode interactions. *Plant Physiology* 96:1302-1307.
- Hussey, R., and F. Grondler. 1998. Nematode parasitism of plants. Pp. 213-243 in R. Perry and D. Wright, Ed. *The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes*. CABI Publishing. Oxon, UK.
- Kaplan, D. T., N. T. Keen, and I. J. Thomason. 1980. Association of glyceollin with the incompatible response of soybean roots to *Meloidogyne incognita*. *Physiological Plant Pathology* 16:309-318.
- Küc, J., and J. S. Rush. 1985. Phytoalexins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 236:455-572.
- López, M. N. 2007. Actividad enzimática y fenoles solubles en Chile (*Capsicum annuum* L.) 'CM-334' durante la pérdida de resistencia a *Phytophthora capsici* inducida por *Nacobbus aberrans*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 68 p.
- 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.
- 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 & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): Systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149-227.
- Marley, P. S., and R. J. Hillocks. 1994. Effect of root-knot nematodes on cajanol accumulation in the vascular tissues of pigeonpea after stem inoculation with *Fusarium udum*. *Plant Pathology* 43:172-176.
- Moreau, R. A., C. L. Preisig, and S. F. Osman. 1992. A rapid quantitative method for the analysis of sesquiterpene phytoalexins by High Performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis* 3:125-128.
- Pegard, A., G. Brizzard, A. Fazari, O. Soucaze, P. Abad, and C. Djian-Caporalino, C. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95:158-165.
- Redondo, E., y R. Rodríguez. 1987. Mecanismos de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 77:123-137.
- Stoessl, A., C. H. Unwin, and E. W. B. Ward. 1972. Postinfectious inhibitors from plant. I. Capsidiol, an antifungal compound from *Capsicum frutescens*. *Journal of Phytopathology* 74:141-152.
- Stoessl, A., C. H. Unwin, and E. W. B. Ward. 1973. Postinfectious fungus inhibitors from plants: fungal oxidation of capsidiol in pepper fruit. *Phytopathology* 63:1225-1231.
- Trujillo-Viramontes, F., E. Zavaleta-Mejía, R. I. Rojas-Martínez, y J. Lara R. 2005. Tiempo de inoculación y nivel de inóculo, factores determinantes para el rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* inducido por *Nacobbus aberrans* en Chile. *Nematropica* 35:37-44.
- Üstün, A. S. 1995. Effects of the some elicitors on the capsidiol amount in the leaves of peppers (*Capsicum annuum* L.) having different sensitivities to root rot (*Phytophthora capsici* Leon.). *Journal of Turkish Phytopathology* 24:101-114.
- Vargas, M., E. Zavaleta-Mejía, y A. Hernández. 1996. Rompimiento de resistencia a *Phytophthora capsici* Leo en Chile serrano CM-334 por *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen. *Nematropica* 26:159-166.

- Villar-Luna, E., 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 CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.
- Ward, E. W. B., and A. Stoessl. 1972. Postinfectious inhibitors from plant. III. Detoxification of capsidiol, an antifungal compound from peppers. *Phytopathology* 62:1186-1187.
- Ward, E. W. B. 1976. Capsidiol production in pepper leaves in incompatible interactions with fungi. *Phytopathology* 66:175-176.
- Zavaleta-Mejía, E., D. Godinez-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 chili. II International Congress of Tropical Nematology/XV Annual Meeting. Organization of Nematologists of Tropical America. October 4-8. Maceió Alagoas State, Brazil.

Received:

30/VIII/2010

Accepted for publication:

17/XI/2010

Recibido:

Aceptado para publicación:

