

## EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON PATOGÉNESIS EN CHILE (*Capsicum annuum* L.) INOCULADO CON *Bacillus subtilis* Y *Meloidogyne enterolobii*

### EXPRESSION OF GENES RELATED TO PATHOGENESIS IN CHILI PEPPER (*Capsicum annuum* L.) INOCULATED WITH *Bacillus subtilis* AND *Meloidogyne enterolobii*

Luis Yobani Gayosso-Rosales<sup>1</sup>, Edgar Villar-Luna<sup>2</sup>, María Dolores Rodríguez-Torres<sup>1</sup>, María Valentina Angoa-Pérez<sup>1</sup>, Hortencia Gabriela Mena-Violante<sup>1</sup>, Carlos Méndez-Inocencio<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-IPN Unidad Michoacán. Justo Sierra 28, 59510, Ji-quilpan, Michoacán, México. (cmendezi@ipn.mx). <sup>2</sup>CONACYT-Instituto Politécnico Nacio-nal, CIIDIR-IPN Unidad Michoacán. Justo Sierra 28, 59510, Ji-quilpan, Michoacán, México.

#### RESUMEN

El cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) destaca por el valor agro-alimenticio alto del producto, aunado a su valor comercial. Los nematodos *Meloidogyne incognita* y *M. enterolobii* (*Me*) afectan al cultivo; *M. enterolobii* (*Me*) es el más relevante por su agresividad notable. El estudio de alternativas ecológicas es de interés para control estos fitoparásitos. Los objetivos de esta investigación fueron conocer el efecto de *Bacillus subtilis* (*Bs*) (CH90) sobre la expresión de los genes *PR-1*, *PR-5*, y *PR-12* que codifican proteínas relacionadas con patogénesis en chile cv. California Wonder (*Cw*) infectado con *Me*; y evaluar el efecto de *Bs* sobre agallamiento (A) y producción de huevos (H) del nematodo en raíces de *Cw*. Dos experimentos independientes (E1 y E2) se establecieron con diseño completamente al azar. En E1 y E2 los tratamientos fueron: *Cw* inoculado solo con *Me* (*CwMe*), *Cw* con *Bs* y *Me* (*CwBsMe*), *Cw* solo con *Bs* (*CwBs*), y *Cw* sin inoculación (*Cw*). En ambos experimentos, el nivel de inóculo de *Bs* fue 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, y para *Me* fue 500 J<sub>2</sub> por planta. En E1 la expresión génica se determinó a 3, 7, y 14 d después de inoculación (DPI) con *Me*. En E2 las variables A y H se evaluaron 45 DPI con *Me*. *PR-1* y *PR-5* se sobre expresaron 3 y 7 DPI en los tratamientos *CwBsMe* y *CwBs*, en contraste con *CwMe* (p≤0.05). A los 14 DPI, los genes en todos los tratamientos tuvieron una expresión menor (p≤0.05). La sobre expresión máxima de *PR-12* se registró a 14 DPI en los tratamientos *CwBsMe* y *CwBs* (p≤0.05). Las plantas de cv. C. Wonder tratadas con *B. subtilis* CH90 solo o en combinación con *M. enterolobii* activaron las rutas de defensa dependientes del ácido salicílico (AS) y jasmónico (AJ) pero dicha activación no afectó la reproducción del nematodo en raíces de chile.

#### ABSTRACT

Chili (*Capsicum annuum* L.) cultivation is remarkable for the high agro-nutritional value of the product, coupled with its commercial value. The nematodes *Meloidogyne incognita* and *M. enterolobii* (*Me*) affect the crop; *M. enterolobii* (*Me*) is the most relevant for its bold aggressiveness. To control these phytoparasites with ecological alternatives is of interest. The objectives of this research were to know the effect of *Bacillus subtilis* (*Bs*) (CH90) on the expression of the *PR-1*, *PR-5*, and *PR-12* genes that encode proteins related to pathogenesis in chili cv. California Wonder (*Cw*) infected with *Me*; and evaluate the effect of *Bs* on galls (A) and egg (H) production by the nematode in *Cw* roots. Two independent experiments (E1 and E2) were established with a completely randomized design. In E1 and E2 the treatments were: *Cw* inoculated only with *Me* (*CwMe*), *Cw* with *Bs* and *Me* (*CwBsMe*), *Cw* only with *Bs* (*CwBs*), and *Cw* without inoculation (*Cw*). In both experiments, the inoculum level for *Bs* was 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, and for *Me* it was 500 J<sub>2</sub> per plant. In E1, the gene expression was determined at 3, 7, and 14 d after inoculation (DPI) with *Me*. In E2, variables A and H were evaluated 45 DPI with *Me*. *PR-1* and *PR-5* were overexpressed 3 and 7 DPI in the *CwBsMe* and *CwBs* treatments, in contrast with *CwMe* (p≤0.05). At 14 DPI, the genes in all treatments had a lower expression (p≤0.05). The maximum overexpression of *PR-12* was recorded at 14 DPI in the *CwBsMe* and *CwBs* treatments (p≤0.05). Plants of cv. C. Wonder treated with *B. subtilis* CH90 alone or in combination with *M. enterolobii* activated the defense pathways dependent on salicylic (AS) and jasmonic (AJ) acids; however, this activation did not affect the reproduction of the nematode in chili roots.

\* Autor para correspondencia ♦ Author for correspondence.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1563-9678>

Recibido: junio, 2020. Aprobado: febrero, 2021.

Publicado en *Agrociencia* 55: 261-272. 2021.

**Key words:** *Capsicum annuum* L., *Meloidogyne enterolobii*, *Bacillus subtilis*, plant growth promoting bacteria, defense induction.

**Palabras clave:** *Capsicum annuum* L., *Meloidogyne enterolobii*, *Bacillus subtilis*, bacterias promotoras del crecimiento vegetal, inducción de defensa.

## INTRODUCCIÓN

La importancia del chile (*Capsicum annuum* L.) se debe a su consumo y valor comercial. En el mundo México es el segundo productor de chile verde después de China (FAOSTAT, 2018)<sup>3</sup>. La producción del cultivo está limitada por hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos (García-Neria y Rivera-Bustamante, 2011; Núñez-Pastrana *et al.*, 2011; Mhatre *et al.*, 2019). Los nematodos agalladores (NAGs) (*Meloidogyne* spp.) son los más importantes por los daños económicos que ocasionan en la agricultura (Jones *et al.*, 2013; Siddique and Grundler, 2018). *M. enterolobii* es el más relevante por su distribución geográfica creciente, agresividad alta y capacidad de reproducirse exitosamente en genotipos de jitomate y chile resistentes a las especies comunes de nematodos agalladores (Villar-Luna *et al.*, 2017). Los NAGs son estrictamente biotróficos e inducen la formación de agallas en las raíces, con ello alteran la absorción de agua y nutrientes (Mhatre *et al.*, 2019).

Durante la interacción de los NAGs con sus plantas hospedantes, los juveniles del segundo estadio (J<sub>2</sub>) invaden las raíces con la combinación de mecanismos físicos (estilete) y bioquímicos (enzimas celulolíticas y pectolíticas) (Jones *et al.*, 2013). Los J<sub>2</sub> inducen la formación de células gigantes multinucleadas (CGM), las cuales proveen al nematodo de los nutrientes necesarios para su desarrollo y reproducción (Jones *et al.*, 2013). Las CGM son producto de las modificaciones transcripcionales que el nematodo ocasiona en el hospedante (Jones *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2017).

Un análisis transcriptómico en raíces de *Arabidopsis thaliana* infectadas por *M. incognita*, reveló que los genes sobre expresados fueron los implicados en el desarrollo y reproducción vegetal; en contraste, genes codificantes de proteínas relacionadas con patogénesis (*PRs*) fueron reprimidos. También enzimas

## INTRODUCTION

The importance of chili (*Capsicum annuum* L.) is due to its consumption and commercial value. Mexico is the second world largest producer of green chili after China (FAOSTAT, 2018)<sup>3</sup>. Crop production is limited by fungi, bacteria, viruses and phytopathogenic nematodes (García-Neria and Rivera-Bustamante, 2011; Núñez-Pastrana *et al.*, 2011; Mhatre *et al.*, 2019). Root-knot nematodes (NAGs) (*Meloidogyne* spp.) are the most important due to the economic damage they cause in agriculture (Jones *et al.*, 2013; Siddique and Grundler, 2018). *M. enterolobii* is the most relevant due to its increasing geographic distribution, high aggressiveness, and ability to reproduce successfully in tomato and chili genotypes resistant to common root-knot nematode species (Villar-Luna *et al.*, 2017). NAGs are strictly biotrophic and induce the formation of galls in the roots, thereby altering the absorption of water and nutrients (Mhatre *et al.*, 2019).

During the interaction of NAGs with their host plants, juveniles of the second stage (J<sub>2</sub>) invade the roots with a combination of physical (stylet) and biochemical (cellulolytic and pectolytic enzymes) mechanisms (Jones *et al.*, 2013). The J<sub>2</sub> induce the formation of multinucleated giant cells (CGM), which provide the nematode with the necessary nutrients for its development and reproduction (Jones *et al.*, 2013). The CGMs are the product of the transcriptional modifications that the nematode causes in the host (Jones *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2017).

A transcriptomic analysis in roots of *Arabidopsis thaliana* infected by *M. incognita* revealed that the overexpressed genes were those involved in plant development and reproduction. In contrast, genes encoding pathogenesis-related proteins (*PRs*) were repressed. As well as enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids (example: phenylalanine ammonium lyase, PAL) and PAD4, an important protein for salicylic acid signaling (Jammes *et al.*, 2005). Several *PRs* possess antimicrobial activity, reinforcement of cell walls, and may be

<sup>3</sup>FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database). 2018. World Crop Statistics by domain. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (Consulta: diciembre 2019).

implicadas en la biosíntesis de fenilpropanoides (por ejemplo, fenilalanina amonio liasa, PAL) y PAD4, una proteína importante para la señalización del ácido salicílico (Jammes *et al.*, 2005). Varios *PRs* poseen actividad antimicrobiana, reforzamiento de paredes celulares, y pueden estar involucrados en la señalización de defensa contra patógenos (Molinari *et al.*, 2014). Así, algunos estudios se enfocan en conocer los mecanismos de defensa de las plantas por medio del análisis de expresión de *PRs* (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014).

La protección contra patógenos biotróficos está mediada por ácido salicílico (AS), el cual activa genes como *PR-1*, *PR-2* y *PR-5* esenciales para desencadenar resistencia sistémica adquirida (RSA). En contraste, la resistencia sistémica inducida (RSI) dependiente de ácido jasmónico (AJ) parece ser más efectiva contra patógenos necrotróficos; esta vía de señalización implica una expresión mayor de *PR-3*, *PR-4* y *PR-12* (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014). La RSI se activa por microorganismos benéficos como *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, y rizobacterias como *B. subtilis*. Varios de estos microorganismos fueron eficaces para disminuir la infección por *M. incognita* en jitomate (*Solanum lycopersicum*), así como incrementar la biomasa vegetal (Mhatre *et al.*, 2019).

*M. enterolobii* es la especie de nematodo con importancia mayor por su distribución geográfica y agresividad alta para superar la defensa de genotipos de jitomate, chile, y otros de interés agronómico portadores de genes de resistencia (por ejemplo, *Mi-1*, *N* y *Tabasco*) efectivos contra *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. incognita* (Ye *et al.*, 2013). Por ello, surge la necesidad de estudiar alternativas sustentables para su control. El objetivo de este estudio fue conocer el efecto de *B. subtilis* sobre la expresión de genes marcadores de resistencia sistémica adquirida (*PR-1* y *PR-5*), e inducida (*PR-12*) en plantas de chile cv. California Wonder infectadas con *M. enterolobii*; además, se evaluó el efecto de *B. subtilis* (CH90) sobre el agallamiento inducido por la producción de huevos del nematodo en las raíces. La hipótesis estableció que, en plantas de cv. C. Wonder tratadas solo con *B. subtilis* o con infección por el nematodo se activarían las rutas de defensa dependientes de AS y AJ como respuesta a las interacciones con los organismos.

involved in defense signaling against pathogens (Molinari *et al.*, 2014). Thus, some studies focus on knowing the defense mechanisms of plants through the analysis of *PRs* expression (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014).

Protection against biotrophic pathogens is mediated by salicylic acid (AS), which activates genes such as *PR-1*, *PR-2* and *PR-5* essential to trigger systemic acquired resistance (RSA). In contrast, induced systemic resistance (RSI) dependent on jasmonic acid (AJ) appears to be more effective against necrotrophic pathogens; this signaling pathway implies a higher expression of *PR-3*, *PR-4* and *PR-12* (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014). The RSI is activated by beneficial microorganisms such as *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, and rhizobacteria such as *B. subtilis*. Several of these microorganisms were effective in reducing the *M. incognita* infection in tomato (*Solanum lycopersicum*), as well as increasing plant biomass (Mhatre *et al.*, 2019).

*M. enterolobii* is the nematode species of greatest importance due to its geographic distribution and high aggressiveness to overcome the defense of genotypes of tomato, chili, and others of agronomic interest that carry effective resistance genes (for example, *Mi-1*, *N* and *Tabasco*) against *M. javanica*, *M. arenaria*, and *M. incognita* (Ye *et al.*, 2013). Therefore, it becomes necessary to study sustainable alternatives for control. The objective of this study was to know the effect of *B. subtilis* on the expression of marker genes for acquired systemic resistance (*PR-1* and *PR-5*), and induced (*PR-12*) in chili plants cv. California Wonder infected with *M. enterolobii*; besides, the effect of *B. subtilis* (CH90), on the galls induced by the production of nematode eggs in the roots, was evaluated. The hypothesis established that in plants of cv. C. Wonder treated only with *B. subtilis* or with infection by the nematode would activate defense pathways dependent on AS and AJ in response to interactions with organisms.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Chili plants cv. California Wonder (Cw), genotype highly susceptible to *M. enterolobii*, were used in this study. The seeds

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Plantas de chile cv. California Wonder (*Cw*), genotipo altamente susceptible a *M. enterolobii*, se utilizaron en este estudio. Las semillas se germinaron en cajas de plástico sobre papel absorbente húmedo a  $28 \pm 1$  °C. Las plántulas se trasladaron a macetas con 25 cm<sup>3</sup> de arena esterilizada, y se mantuvieron en condiciones controladas con fotoperiodo de 14 h luz, temperatura de  $28 \pm 1$  °C, y humedad relativa de 70%. Los riegos se realizaron cada 24 h con agua esterilizada y la fertilización se realizó cada 15 d con una solución de Nitrofoska<sup>®</sup> (3.15 g L<sup>-1</sup> de agua esterilizada).

### Inoculación con *B. subtilis* y *M. enterolobii*

La cepa CH90 de *B. subtilis* (GenBank JF951247) se usó; el Laboratorio de Biología Molecular de Bacterias de CINVESTAV - Unidad Irapuato proporcionó la cepa. Para la preparación del inóculo, la bacteria se multiplicó en caldo nutritivo "Difco<sup>™</sup> Nutrient Broth" (8 g de medio nutritivo en 1000 mL<sup>-1</sup> de agua destilada), la suspensión se mantuvo en agitación (0.24 x g) a 28 °C durante 72 h. La inoculación de las plantas se realizó al momento del trasplante, con la raíz sumergida en una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> durante 15 min.

El inóculo de *M. enterolobii* se obtuvo de raíces de jitomate agalladas, cultivo monoxénico procedente de una población en Ahome, Sinaloa (Villar-Luna *et al.*, 2017). La extracción de los huevos se realizó de acuerdo con Vrain (1977) y la obtención de juveniles del segundo estadio (J<sub>2</sub>) con el método de Baermann. A los 21 días post-inoculación (DPI) con la bacteria (Adam *et al.*, 2014), las plantas se infectaron con el nematodo (500 J<sub>2</sub> por planta)

### Variables evaluadas y diseño experimental

Dos experimentos independientes (E1 y E2) se establecieron con un diseño completamente al azar. En el E1 y E2 los tratamientos fueron: *Cw* inoculado solo con *Me* (*CwMe*), *Cw* con *Bs* y *Me* (*CwBsMe*), *Cw* solo con *Bs* (*CwBs*) y testigo *Cw* solo con medio de cultivo (*Cw*). Cada tratamiento consistió de 15 plantas. En el E1, a 3, 7, y 14 días post-inoculación (DPI) con *Me*, se determinaron los niveles de expresión génica de *PR-1* (proteína relacionada con patogénesis 1), *PR-5* (taumatina) y *PR-12* (defensina J1-2). Las muestras de raíz se congelaron con N<sub>2</sub> líquido y se mantuvieron en ultracongelación (-22 °C) hasta su uso.

En el E2, a 45 DPI con *Me*, se evaluó el número de agallas, y la producción de huevos por gramo de raíz. La extracción de

were germinated in plastic boxes on wet absorbent paper at  $28 \pm 1$  °C. Seedlings were transplanted into pots with 25 cm<sup>3</sup> of sterilized sand and kept under controlled conditions with a photoperiod of 14 h light, a temperature of  $28 \pm 1$  °C, and a relative humidity of 70%. Irrigation was carried out every 24 h with sterile water and fertilization every 15 d with a Nitrofoska<sup>®</sup> solution (3.15 g L<sup>-1</sup> of sterilized water).

### Inoculation with *B. subtilis* and *M. enterolobii*

The *B. subtilis* strain CH90 (GenBank JF951247) was used; it was provided by the Laboratorio de Biología Molecular de Bacterias de CINVESTAV - Unidad Irapuato. For the preparation of the inoculum, the bacteria were multiplied in "Difco<sup>™</sup> Nutrient Broth" (8 g of nutrient medium in 1000 mL<sup>-1</sup> of distilled water), the suspension was stirred (0.24 x g) for 72 h at 28 °C. The inoculation of the plants was done at the time of transplantation, with the root submerged in a bacterial suspension of  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> for 15 min.

The inoculum of *M. enterolobii* was obtained from tomato roots with galls, a monoxenic culture from a population in Ahome, Sinaloa (Villar-Luna *et al.*, 2017). The extraction of the eggs was made according to Vrain (1977) and to obtain juveniles of the second stage (J<sub>2</sub>) we used the Baermann method. At 21 days post-inoculation (DPI) with the bacteria (Adam *et al.*, 2014), plants were infected with the nematode (500 J<sub>2</sub> per plant).

### Variables evaluated and experimental design

Two independent experiments (E1 and E2) were established with a completely randomized design. In E1 and E2 the treatments were: *Cw* inoculated only with *Me* (*CwMe*), *Cw* with *Bs* and *Me* (*CwBsMe*), *Cw* only with *Bs* (*CwBs*) and control *Cw* only with culture medium (*Cw*). Each treatment consisted of 15 plants. At E1, at 3, 7, and 14 days post-inoculation (DPI) with *Me*, we determined the levels of gene expression of *PR-1* (protein related to pathogenesis 1), *PR-5* (thaumatin) and *PR-12* (defensin J1-2). Root samples were frozen with liquid N<sub>2</sub> and kept deep-frozen (-22 °C) until use.

In E2, at 45 DPI with *Me*, we evaluated the number of galls and the production of eggs per gram of root. The egg extraction occurred as it was already described and they were counted with a 4X (Zeiss Primo STAR, Germany) stereoscopic microscope. In this experiment, we also evaluated the production of fresh and dry biomass (root and foliage). The fresh biomass was determined immediately after sampling, and for dry weight, the plants were placed in an air forced oven at 65 °C until weight remained constant (4 d).

huevos fue como ya se describió y se contabilizaron con un microscopio estereoscópico 4X (Zeiss Primo STAR, Germany). En este experimento también se evaluó la producción de biomasa fresca y seca (raíz y follaje). La biomasa fresca se determinó de inmediato después del muestreo, y para el peso seco, las plantas se colocaron en una estufa a 65 °C hasta que el peso se mantuvo constante (4 d).

### Extracción de RNA total, síntesis de cDNA, y PCR en tiempo real

La extracción de RNA total de raíces de chile cv. California Wonder se realizó con el kit RNeasy® Plant mini kit (Qiagen) y se incluyó una digestión con DNasa (Qiagen); todo este procedimiento se desarrolló de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza del RNA obtenido se verificó por espectrofotometría de 260 nm, y la integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Para la síntesis de cDNA se utilizó la M-MLV retro transcriptasa (Promega™) y el oligo dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen); se siguieron las instrucciones del fabricante.

Los niveles de expresión génica se determinaron en un sistema CFX Connect™ Real-Time PCR Detection (Bio-Rad). Oligonucleótidos específicos se usaron para *PR-1*, *PR-5* y *PR-12* (Cuadro 1) (García-Neria y Rivera-Bustamante, 2011; Núñez-Pastrana *et al.*, 2011; Villar-Luna *et al.*, 2017). La mezcla de reacción consistió de 5 µL de amortiguador de pH Buffer pro, 1 µL de cada oligonucleótido (10 mM), 2 µL SYBR Green I (Invitrogen) 1:75000, 0.125 µL Amplificasa® (BioTecMol) 0.625 U, y 3 µL de cDNA, para un volumen final de 25 µL ajustado con agua libre de nucleasas.

Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguida 39 ciclos (95 °C por 10 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s). Para descartar la formación de productos inespecíficos se incluyó un análisis de disociación.

### Total RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time PCR

The extraction of total RNA from roots of chili cv. California Wonder was performed with the RNeasy® Plant mini kit (Qiagen), including a digestion with DNase (Qiagen); this entire procedure was performed in accordance with the manufacturer instructions. The purity of the RNA obtained was verified by 260 nm spectrophotometry, and integrity by electrophoresis in 1.2% agarose gel. For cDNA synthesis, we used M-MLV reverse transcriptase (Promega™) and oligo dT<sub>12-18</sub> (Invitrogen); and followed the manufacturer instructions.

Gene expression levels were determined on a CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Specific oligonucleotides were used for *PR-1*, *PR-5* and *PR-12* (Table 1) (García-Neria and Rivera-Bustamante, 2011; Núñez-Pastrana *et al.*, 2011; Villar-Luna *et al.*, 2017). The reaction mixture consisted of 5 µL of pH Buffer pro, 1 µL of each oligonucleotide (10 mM), 2 µL SYBR Green I (Invitrogen) 1: 75000, 0.125 µL Amplificasa® (BioTecMol) 0.625 U, and 3 µL of cDNA for a final volume of 25 µL adjusted with nuclease-free water.

The amplification conditions consisted of an initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 39 cycles (95 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s). To discard the formation of nonspecific products, we included a dissociation analysis, and then determined the relative expression levels by using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Schmittgen and Livak, 2008), as an internal reference the *GAPDH* gene (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase). As a calibrator of the values of the control plants we carried out three technical replications per treatment.

### Statistical analysis

With the data, we performed an analysis of variance (ANOVA) and the means comparison Tukey test ( $p \leq 0.05$ ) in

**Cuadro 1. Oligonucleótidos usados para el análisis por PCR en tiempo real.**  
**Table 1. Oligonucleotides used for real-time PCR analysis.**

Gen	Número de acceso	Secuencia (5' → 3')	Amplicón (pb)
<i>GAPDH</i>	AJ246011	F: GGCCTTATGACTACAGTTCCTCC R: GATCAACCACAGAGACATCCACAG	217
<i>PR-1</i>	XM_016683907	F: CCCAAAATTACGCCAATCAAAG R: ACATCTTCACGGCACCAG	120
<i>PR-5</i>	NM_00132489 6	F: TGGTGGAGTCTTGCAGTGC R: CGTGCAATGGATCGCGTG	181
<i>PR-12</i>	X95730	F: CAAGGGGTTGTGCCTTAGTA R: TTCCTGCAGAAGCATTAAAGA	105

*GAPDH* (Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa), *PR-1* (Proteína relacionada con patogénesis 1), *PR-5* (Taumatina) y *PR-12* (Defensina J1-2). ♦ *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), *PR-1* (Protein related to pathogenesis 1), *PR-5* (Thaumatoin) and *PR-12* (Defensin J1-2).

Los niveles de expresión relativa se determinaron por el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Schmittgen y Livak, 2008), y como referencia interna el gen *GAPDH* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa). Como calibrador de los valores de las plantas control se realizaron tres réplicas técnicas por tratamiento.

#### Análisis estadístico

Con los datos de las variables se realizaron, un análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) en cada experimento independiente. Antes del ANDEVA, los datos de número de agallas y de huevos se transformaron a  $\log_{10}(x + 1)$ . Todos los análisis se realizaron con el programa SAS v. 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Expresión de genes *PRs* en raíces de chile inoculadas con *B. subtilis* y *M. enterolobii*

Los genes *PR-1* y *PR-5*, los cuales son marcadores de RSA dependiente de AS (Gruner *et al.*, 2013; Molinari *et al.*, 2014) se sobre expresaron 3 y 7 DPI con el nematodo en los tratamientos *CwBsMe* y *CwBs*; en contraste, en el tratamiento *CwMe* la expresión fue inferior. A los 3 DPI, los niveles de *PR-1* en *CwBsMe* y *CwBs*, fueron 85.48% superiores al registrado en *CwMe* ( $p \leq 0.05$ ). La expresión de *PR-5* en el tratamiento *CwBs* fue 58.27% superior a la registrada en *CwBsMe* y *CwMe* ( $p \leq 0.05$ ). A los 14 DPI, *PR-1* y *PR-5* tuvieron una expresión menor en todos los tratamientos (Figura 1A y 1B).

Respecto al gen *PR-12*, un marcador de RSI dependiente de AJ (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014), 3 DPI la expresión en *CwMe* fue 67.40% superior al de los tratamientos *CwBs* y *CwBsMe*. A los 7 DPI, la sobre expresión de *PR-12* en el tratamiento *CwBsMe* fue 57.21% superior ( $p \leq 0.05$ ) respecto a *CwMe* y *CwBs* (Figura 1C). Todos los tratamientos presentaron sobre expresión de *PR-12* en los 14 DPI. Los tratamientos *CwBsMe* y *CwBs* fueron los que mostraron la expresión mayor ( $p \leq 0.05$ ) en contraste con *CwMe*.

En el tratamiento *CwMe*, los niveles de expresión de *PR-1* y *PR-5* se asociaron con la interacción compatible que se estableció entre *Cw* y *Me*. Es decir, el nematodo inhibió la expresión de los genes de defensa para crear las condiciones favorables para su establecimiento y reproducción (Hamamouch *et*

each independent experiment. Before the ANOVA, the data for the number of galls and eggs were transformed to  $\log_{10}(x + 1)$ . All analyses were performed with SAS v. 9.0 (SAS Institute Inc., 2002).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Expression of *PRs* genes in chili roots inoculated with *B. subtilis* and *M. enterolobii*

The *PR-1* and *PR-5* genes, which are markers of AS-dependent RSA (Gruner *et al.*, 2013; Molinari *et al.*, 2014) were overexpressed at 3 and 7 DPI with the nematode in the treatments *CwBsMe* and *CwBs*; in contrast, in the *CwMe* treatment the expression was lower. At 3 DPI, the *PR-1* levels in *CwBsMe* and *CwBs* were 85.48% higher than that registered in *CwMe* ( $p \leq 0.05$ ). The expression of *PR-5* in the *CwBs* treatment was 58.27% higher than that registered in *CwBsMe* and *CwMe* ( $p \leq 0.05$ ). At 14 DPI, *PR-1* and *PR-5* had a lower expression in all treatments (Figure 1A and 1B).

Regarding the *PR-12* gene, an AJ-dependent RSI marker (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014), at 3 DPI the expression in *CwMe* was 67.40% higher than that of the *CwBs* and *CwBsMe* treatments. At 7 DPI, the overexpression of *PR-12* in the *CwBsMe* treatment was 57.21% higher ( $p \leq 0.05$ ) compared to *CwMe* and *CwBs* (Figure 1C). All treatments presented overexpression of *PR-12* at 14 DPI. The treatments *CwBsMe* and *CwBs* were those that showed the highest expression ( $p \leq 0.05$ ) in contrast to *CwMe*.

In the *CwMe* treatment, the expression levels of *PR-1* and *PR-5* were associated with the compatible interaction that was established between *Cw* and *Me*. That is, the nematode inhibited the expression of defense genes to create favorable conditions for their establishment and reproduction (Hamamouch *et al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014). The main line of defense activated against biotrophic pathogens is a response at local and systemic levels (RSA) (Molinari *et al.*, 2014). *M. enterolobii* could interfere with the salicylic acid (AS) pathway as an early defense response indicator and activator of RSA (Jammes *et al.*, 2005; Hamamouch *et al.*, 2011) during giant cell formation. Similarly to reports in other interactions with *Meloidogyne* spp., *M. incognita* regulated RSA by reducing AS and AJ levels and consequently

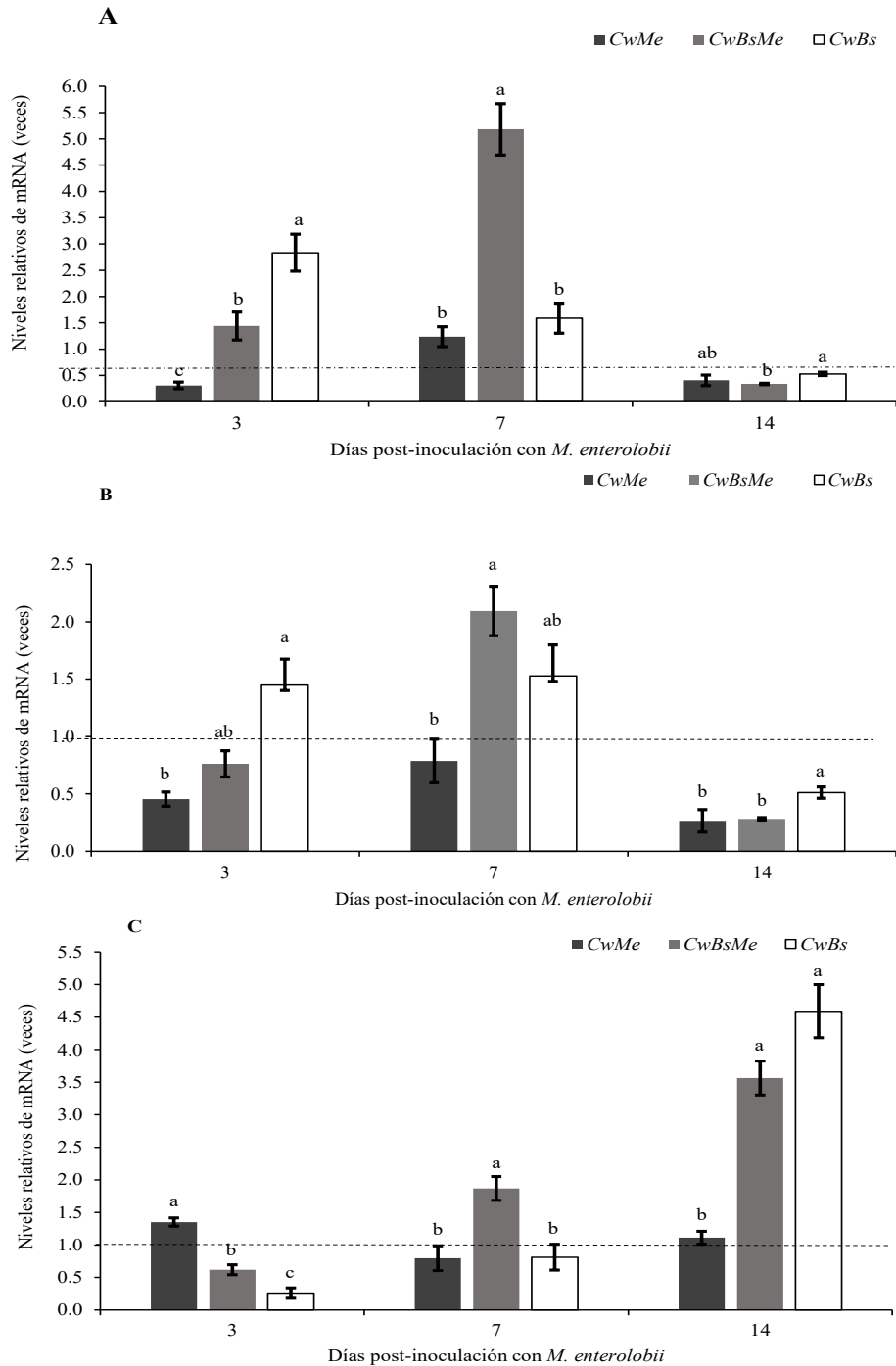


Figura 1. Niveles relativos de expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (A: *PR-1*, B: *PR-5*, C: *PR-12*) en plantas de chile cv. California Wonder. *Me*: *M. enterolobii*, *MeBs*: *B. subtilis* y *M. enterolobii*; *Bs*: *B. subtilis*. Barras son medias de tres replicas y línea sobre barra es el error estándar. Medias con letra diferente fueron significativas (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). Valores debajo de la línea punteada indican represión génica y arriba de la línea indican sobre expresión (Schmittgen y Livak, 2008).

Figure 1. Relative levels of expression of genes that code for proteins related to pathogenesis (A: *PR-1*, B: *PR-5*, C: *PR-12*) in chili plants cv. California Wonder. *Me*: *M. enterolobii*, *MeBs*: *B. subtilis*, and *M. enterolobii*; *Bs*: *B. subtilis*. Bars are the means of three replicates and the line in each bar is the standard error. Means with different letters were significant (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). Values below the dotted line indicate gene repression, and above the line indicate overexpression (Schmittgen and Livak, 2008).

*al.*, 2011; Molinari *et al.*, 2014). La línea de defensa principal activada contra patógenos biotróficos es una respuesta a niveles local y sistémico (RSA) (Molinari *et al.*, 2014). *M. enterolobii* podría interferir en la ruta del ácido salicílico (AS) como indicador de respuesta de defensa temprana y activador de RSA (Jammes *et al.*, 2005; Hamamouch *et al.*, 2011) durante la formación de las células gigantes. En forma similar a lo reportado en otras interacciones con *Meloidogyne* spp., *M. incognita* reguló la RSA por medio de reducir los niveles de AS y AJ y en consecuencia disminuyó la expresión de *PR-1* y *PR-5* en *A. thaliana* (Hamamouch *et al.*, 2011).

Durante la interacción incompatible de *M. incognita* con jitomate, se observó una sobre expresión de *PR-1*, en contraste con lo registrado en las interacciones compatibles; lo cual sugiere que, durante la defensa contra *M. incognita*, *PR-1* tuvo una función importante dependiente de la activación de AS (Lavrova *et al.*, 2017). Martínez-Medina *et al.* (2016) indicaron que el hongo *Trichoderma* redujo la infección por *M. incognita* en plantas de tomate por medio de la activación de las respuestas de defensa dependientes de AS y AJ. A pesar de la expresión de genes *PRs* como *PR-1* y *PR-5*, importantes para desencadenar la RSA, *M. incognita* puede superar o bloquear dicho mecanismo de defensa y establecerse exitosamente en el hospedante (Hamamouch *et al.*, 2011).

En la actualidad se han evaluado cepas diferentes de *Bacillus* para desencadenar RSI en plantas susceptibles a *Meloidogyne*; lo cual ha resultado una opción prometedora para el control de nematodos en cultivos de importancia agrícola (Adam *et al.*, 2014). En los tratamientos *CwBsMe* y *CwBs*, en etapas tempranas de la interacción (3 y 7 DPI), *B. subtilis* (CH90) pudo activar la ruta de AS con la expresión de *PR-1* y *PR-5*. Las rizobacterias como *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus* spp. pueden activar la resistencia sistémica (Mhatre *et al.*, 2019). En su estudio Niu *et al.* (2016) demostraron que *B. cereus* AR156 promovió la resistencia sistémica en *A. thaliana* Col-0 contra *P. syringae* pv. *tomato* con la activación de AS, AJ y ET, para así sobre expresar los genes *PR-1*, *PR-2*, *PR-5* y *PDF1.2 (PR-12)*; además, aumentó la biomasa de las plantas tratadas. *B. subtilis* es eficaz para el control de *Meloidogyne*, principalmente por medio de la activación de RSI a través de las vías de señalización dependientes de AJ (Adam *et al.*, 2014).

Leonetti *et al.* (2017) encontraron que los genes marcadores de la vía de señalización del AS (*PR-1* y

decreased the expression of *PR-1* and *PR-5* in *A. thaliana* (Hamamouch *et al.*, 2011).

During the incompatible interaction of *M. incognita* with tomato, an overexpression of *PR-1* was observed, in contrast to that registered in the compatible interactions; which suggests that during the defense against *M. incognita*, *PR-1* had an important function dependent on the activation of AS (Lavrova *et al.*, 2017). Martínez-Medina *et al.* (2016) indicated that the *Trichoderma* fungus reduced the *M. incognita* infection in tomato plants through the activation of defense responses dependent on AS and AJ. Despite the expression of *PRs* genes such as *PR-1* and *PR-5*, important for triggering RSA, *M. incognita* can overcome or block this defense mechanism and successfully establish in the host (Hamamouch *et al.*, 2011).

At present, different strains of *Bacillus* have been evaluated to trigger RSI in plants susceptible to *Meloidogyne*; which has become a promising option for the control of nematodes in crops of agricultural importance (Adam *et al.*, 2014). In the *CwBsMe* and *CwBs* treatments, in the early stages of the interaction (3 and 7 DPI), *B. subtilis* (CH90) was able to activate the AS pathway with the expression of *PR-1* and *PR-5*. Rhizobacteria such as *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus* spp. can activate systemic resistance (Mhatre *et al.*, 2019). Niu *et al.* (2016) demonstrated that *B. cereus* AR156 promoted systemic resistance in *A. thaliana* Col-0 against *P. syringae* pv. *tomato* with the activation of AS, AJ and ET, in order to overexpress the *PR-1*, *PR-2*, *PR-5* and *PDF1.2 (PR-12)* genes; in addition, biomass of the treated plants increased. *B. subtilis* is effective for the control of *Meloidogyne*, mainly by the activation of RSI through AJ-dependent signaling pathways (Adam *et al.*, 2014).

Leonetti *et al.* (2017) found that the marker genes of the AS signaling pathway (*PR-1* and *PR-5*) and the *ACO* gene that encodes a precursor oxidase enzyme of ET biosynthesis, were induced in tomato plants inoculated with *T. harzianum* and then with *M. incognita* at 5 DPI of the nematode. But the expression of the *JERF3* gene (AJ/ET3 response factor) was not affected. Those same authors observed that the activation of RSA and the production of ET by *T. harzianum* reduced the infection of *M. incognita*; while the compatible nematode-plant interaction in the absence of *T. harzianum* suppressed locally and systemically the expression of the *PR-1*, *PR-5* and *ACO* genes

*PR-5*) y el gen *ACO* que codifica para una enzima oxidasa precursora de la biosíntesis de ET, se indujeron en plantas de jitomate inoculadas con *T. harzianum* y después con *M. incognita* a los 5 DPI del nematodo. Pero la expresión del gen *JERF3* (factor de respuesta AJ/ET3) no se afectó, los mismos autores observaron que la activación de RSA, y producción de ET por *T. harzianum* redujo la infección de *M. incognita*; mientras que la interacción nematodo-planta compatible en ausencia de *T. harzianum* suprimió la expresión de los genes *PR-1*, *PR-5* y *ACO* de manera local y sistémica.

Los cambios transcripcionales del gen *PR-12* fueron más notorios a los 14 DPI, se observó una sobre expresión del gen en los tratamientos *CwBs* y *CwBsMe*, donde fue evidente el antagonismo entre la ruta del AS y AJ, de esta forma la expresión de *PR-1* y *PR-5* (AS) fue menor, mientras que *PR-12* (AJ) fue sobre expresado. Molinari *et al.* (2014) encontraron que *M. incognita* puede activar la RSA, tanto dependiente de AS como dependiente de AJ, en plantas de *A. thaliana*; de modo que se considera que existe una vía de AS dependiente y una independiente de la acción del AJ y ET (Zhang *et al.*, 2012).

Las vías de señalización pueden activarse mutuamente para desencadenar respuestas de defensa contra patógenos; sin embargo, también puede ser una herramienta utilizada por los patógenos para activar o reprimir las respuestas de defensa del hospedero y poder desarrollarse (Zhang *et al.*, 2012). Otros estudios demostraron que existe un antagonismo entre la vía de señalización de AS y AJ/ET lo cual repercute en la activación de defensa (Caarls *et al.*, 2015); por lo tanto, *Meloidogyne* puede manipular las respuestas de defensa, al aprovechar las interacciones entre AS y AJ para establecerse exitosamente (Shim *et al.*, 2013).

#### **Número de agallas, huevos y biomasa vegetal en la interacción chile-*B. subtilis*-*M. enterolobii***

Todas las raíces de los tratamientos *CwMe* y *CwBsMe* fueron agalladas con éxito. El tratamiento *CwMe* presentó 24.67% menos agallas que el tratamiento *CwBsMe* ( $p \leq 0.05$ ); sin embargo, respecto al número de huevos no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos (Cuadro 2). El tratamiento *CwBsMe* presentó 41.71% mayor biomasa fresca de raíz con respecto al testigo ( $p \leq 0.05$ ), mientras que los tratamientos *CwMe* y *CwBsMe* tuvieron 34.61%

The transcriptional changes of the *PR-12* gene were more noticeable at 14 DPI. An overexpression of the gene was observed in the *CwBs* and *CwBsMe* treatments, where the antagonism between the AS and AJ pathways was evident; thus, the expression of *PR-1* and *PR-5* (AS) was lower, while *PR-12* (AJ) was overexpressed. Molinari *et al.* (2014) found that *M. incognita* can activate RSA, both AS-dependent and AJ-dependent, in *A. thaliana* plants; thus, it is considered that there is one AS pathway dependent and one independent from the action of JA and ET (Zhang *et al.*, 2012).

Signaling pathways can activate each other to trigger defense responses against pathogens; however, they can also be a tool used by pathogens to activate or repress host defense responses and be able to develop (Zhang *et al.*, 2012). Other studies showed that there is an antagonism between the AS and AJ/ET signaling pathway, which affects defense activation (Caarls *et al.*, 2015); therefore, *Meloidogyne* can manipulate defense responses, taking advantage of the interactions between AS and AJ to establish itself successfully (Shim *et al.*, 2013).

#### **Number of galls, eggs and plant biomass in the chile-*B. subtilis*-*M. enterolobii* interaction**

All the roots of the *CwMe* and *CwBsMe* treatments were successfully infected with galls. The *CwMe* treatment expressed 24.67% less galls than the *CwBsMe* treatment ( $p \leq 0.05$ ); however, regarding the number of eggs there were no significant differences between both treatments (Table 2). The *CwBsMe* treatment presented 41.71% higher fresh root biomass in regard to the control ( $p \leq 0.05$ ), while the *CwMe* and *CwBsMe* treatments recorded 34.61% more fresh foliage biomass ( $p \leq 0.05$ ) than the control. The dry foliage biomass increased 40.95% in the *CwBsMe* and *CwMe* treatments ( $p \leq 0.05$ ) compared to the control (Table 2).

Even when *B. subtilis* (CH90) activated the expression of defense genes, this effect was not decisive to reduce galls and egg production; thus, *M. enterolobii* successfully concluded its life cycle in cv. California Wonder roots. Xia *et al.* (2019) evaluated different species of *Bacillus* against *M. javanica* in tomato plants; and it was *B. halotolerans* the one that showed the greatest reduction in galls and eggs of *M. incognita*. Therefore, it is suggested that not all

**Cuadro 2. Efecto de *B. subtilis* en plantas de cv. California Wonder infectadas con *M. enterolobii*.**  
**Table 2. Effect of *B. subtilis* on cv. California Wonder plants infected with *M. enterolobii*.**

Tratamiento	Agallas por g de raíz <sup>†</sup>	Huevos por g de raíz <sup>†</sup>	Biomasa fresca (g)		Biomasa seca (g)	
			Raíz	Follaje	Raíz	Follaje
<i>CwBs</i>	0.00±0.00 (0.00±0.00 <sup>c</sup> )	0.00±0.00 (0.00±0.00 <sup>b</sup> )	1.120±0.084 <sup>ab</sup>	1.960±0.100 <sup>b</sup>	0.057±0.004 <sup>a</sup>	0.175±0.009 <sup>b</sup>
<i>CwBsMe</i>	26.59±1.94 (1.42±0.03 <sup>a</sup> )	3215.56±338.65 (3.47±0.04 <sup>a</sup> )	1.407±0.124 <sup>a</sup>	2.747±0.162 <sup>a</sup>	0.056±0.007 <sup>a</sup>	0.272±0.011 <sup>a</sup>
<i>CwMe</i>	20.03±1.29 (1.31±0.02 <sup>b</sup> )	3439.39±200.60 (3.52±0.02 <sup>a</sup> )	1.193±0.120 <sup>ab</sup>	2.493±0.148 <sup>a</sup>	0.060±0.006 <sup>a</sup>	0.270±0.014 <sup>a</sup>
<i>Control</i>	0.00±0.00 (0.00±0.00 <sup>c</sup> )	0.00±0.00 (0.00±0.00 <sup>b</sup> )	0.820±0.057 <sup>b</sup>	1.713±0.110 <sup>b</sup>	0.042±0.005 <sup>a</sup>	0.160±0.012 <sup>b</sup>

Los valores representan la media±error estándar (n=15). Medias con letra diferente en cada columna son significativamente diferentes (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). <sup>†</sup>El análisis ANOVA se realizó con datos transformados [ $\log_{10}(x + 1)$ ], los valores se muestran entre paréntesis. *Cw*: cv. California Wonder; *CwBs*: *Cw* inoculado solo con *B. subtilis*; *CwBsMe*: *Cw* inoculado con *B. subtilis* y con *M. enterolobii*; *CwMe*: *Cw* inoculado solo con *M. enterolobii*; Control: *Cw* inoculado solo con medio de cultivo. ♦ The values represent the mean ± standard error (n=15). Means with different letters in each column are significantly different (Tukey;  $p \leq 0.05$ ). <sup>†</sup>ANOVA analysis was performed with transformed data [ $\log_{10}(x + 1)$ ], values are shown in parentheses. *Cw*: cv. California Wonder; *CwBs*: *Cw* inoculated only with *B. subtilis*; *CwBsMe*: *Cw* inoculated with *B. subtilis* and with *M. enterolobii*; *CwMe*: *Cw* inoculated only with *M. enterolobii*; Control: *Cw* inoculated only with culture medium.

más biomasa fresca de follaje ( $p \leq 0.05$ ) que el testigo. La biomasa seca de follaje aumentó 40.95% en los tratamientos *CwBsMe* y *CwMe* ( $p \leq 0.05$ ) respecto al testigo (Cuadro 2).

Aun cuando *B. subtilis* (CH90) activó la expresión de los genes de defensa, este efecto no fue determinante para reducir el agallamiento y producción de huevos, de esta forma *M. enterolobii* concluyó con éxito su ciclo de vida en raíces del cv. California Wonder. Xia *et al.* (2019) evaluaron distintas especies de *Bacillus* contra *M. javanica* en plantas de jitomate; y fue *B. halotolerans* la que mostró una mayor reducción de agallas y huevos de *M. incognita*. Por lo tanto, se sugiere que no todas las bacterias del género *Bacillus* pueden tener un efecto antagónico efectivo contra nematodos agalladores.

En este estudio se observó que *B. subtilis* no tuvo un efecto importante sobre la producción de biomasa fresca y seca. En otros, *B. subtilis* se reportó como promotora de crecimiento vegetal y ha sido eficaz para disminuir la infección de *M. incognita* en cultivos de jitomate (Adam *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2016). Sin embargo, en nuestro estudio la cepa CH90 de *B. subtilis* no mostró dichas características, lo cual podría estar relacionado con la agresividad alta de *M. enterolobii*.

Los tratamientos *CwMe* y *CwBsMe* tuvieron mayor biomasa fresca de raíz y follaje, y un incremento en

bacteria of the genus *Bacillus* may have an effective antagonistic effect against root-knot nematodes.

In this study, we observed that *B. subtilis* had no important effect on the production of fresh and dry biomass. In others, *B. subtilis* was reported as a plant growth promoter and has been effective in reducing *M. incognita* infection in tomato crops (Adam *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2016). However, in our study the CH90 strain of *B. subtilis* did not show those characteristics, which could be related to the high aggressiveness of *M. enterolobii*.

The *CwMe* and *CwBsMe* treatments had greater fresh root and foliage biomass, and an increase in dry foliage biomass, which suggests that in our study, *M. enterolobii* had a promoting effect on biomass. *Meloidogyne* spp. can induce transcriptional changes in their hosts in order to be able to develop; these changes can directly affect plant development (Jones *et al.*, 2013). The high values of fresh biomass registered in those treatments that involved *M. enterolobii* could be the result of the metabolic modifications induced by the nematode (for example, accumulation of water in the roots). Since it has been shown that in the compatible interactions of *M. incognita* with tomato and *A. thaliana* over expressions of genes involved in cell transport occur, such as those encoding for aquaporins (Jammes *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2017), and proteins associated

biomasa seca de follaje, lo cual sugiere que en nuestro estudio, *M. enterolobii* tuvo un efecto promotor sobre la biomasa. *Meloidogyne* spp. puede inducir cambios transcripcionales en sus hospederos para poder desarrollarse, estos cambios pueden repercutir directamente en el desarrollo de las plantas (Jones *et al.*, 2013). Los valores altos de biomasa fresca registrados en aquellos tratamientos que involucraron a *M. enterolobii* podrían ser producto de las modificaciones metabólicas que induce el nematodo (por ejemplo, acumulación de agua en las raíces). Ya que se ha demostrado que, en las interacciones compatibles de *M. incognita* con jitomate y *A. thaliana*, ocurren sobreexpresiones de genes implicados en el transporte celular, como aquellos que codifican para acuaporinas (Jammes *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2017), y proteínas asociadas al transporte de agua y la osmorregulación celular (Jammes *et al.*, 2005).

## CONCLUSIONES

*Meloidogyne enterolobii* resistió la respuesta temprana de defensa de *C. annuum* dependiente del ácido salicílico (*PR-1* y *PR-5*) e indujo la respuesta dependiente del ácido jasmónico (*PR-12*). Las plantas tratadas con *B. subtilis* (CH90) solo, o en combinación con el nematodo activaron las rutas de defensa dependientes de ambos ácidos. Sin embargo, dicha activación no afectó la reproducción de *M. enterolobii* en raíces de Chile.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca 717850 proporcionada al primer autor.

## LITERATURA CITADA

- Adam, M., H. Heuer, and J. Hallmann. 2014. Bacterial antagonists of fungal pathogens also control root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. *PLoS One*. 9: 1-8.
- Caarls, L., C. M. Pieterse, and S. Van Wees. 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front. Plant Sci.*, 6: 170.
- García-Neria, M. A., and R. F. Rivera-Bustamante. 2011. Characterization of geminivirus resistance in an accession of *Capsicum chinense* Jacq. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 172-182.
- Gruner, K., T. Griebel, H. Návárová, E. Attaran, and J. Zeier. 2013. Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Front. Plant Sci.* 4: 252.

with water transport and cellular osmoregulation (Jammes *et al.*, 2005).

## CONCLUSIONS

*Meloidogyne enterolobii* resisted the salicylic acid-dependent early defense response of *C. annuum* (*PR-1* and *PR-5*) and induced the jasmonic acid-dependent response (*PR-12*). Plants treated with *B. subtilis* (CH90) alone, or in combination with the nematode activated the defense pathways dependent on both acids. However, this activation did not affect the reproduction of *M. enterolobii* in chili roots.

## ACKNOWLEDGEMENTS

To the National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT) for the scholarship 717850 granted to the first author.

—End of the English version—



- Hamamouch, N., C. Li, P. J. Seo, C. M. Park, and E. L. Davis. 2011. Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. *Mol. Plant Pathol.* 12: 355-364.
- Jammes, F., P. Lecomte, J. Almeida-Engler, F. Bitton, M. L. Martin-Magniette, J. P. Renou, P. Abad, and B. Favery. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *Plant J.* 44: 447-458.
- Jones, J. T., A. Haegeman, E. G. Danchin, H. S. Gaur, J. Helder, M. G. Jones, T. Kikuchi, R. Lopez-Manzanilla, J. E. Rius-Palomares, W. M. Wesemael L, and R. N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 14: 946-961.
- Lavrova, V. V., S. V. Zinovieva, Z. V. Udalova, and E. Matveeva. 2017. Expression of *PR* genes in tomato tissues infected by nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) Chitwood, 1949. *Dokl. Biochem. Biophys.* 476: 306-309.
- Leonetti, P., M. C. Zonno, S. Molinari, and C. Altomare. 2017. Induction of SA-signaling pathway and ethylene biosynthesis in *Trichoderma harzianum*-treated tomato plants after infection of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Cell Rep.* 36: 621-631.
- Martínez-Medina, A., I. Fernández, G. B. Lok, M. J. Pozo, C. M. Pieterse, and S. Van Wees. 2017. Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytol.* 213: 1363-1377.
- Mhatre, P. H., C. Karthik, K. Kadirvelu, K. L. Divya, E. P. Venkatasalam, S. Srinivasan, G. Ramkumar, C. Saranyae,

- and R. Shanmuganathan. 2019. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a potential alternative tool for nematodes bio-control. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 17: 119-128.
- Molinari, S., E. Fanelli, and P. Leonetti. 2014. Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in *Mi-1*-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. *Mol. Plant Pathol.* 15: 255-264.
- Niu, D., X. Wang, Y. Wang, X. Song, J. Wang, J. Guo, and H. Zhao. 2016. *Bacillus cereus* AR156 activates PAMP-triggered immunity and induces a systemic acquired resistance through a NPR1-and SA-dependent signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469: 120-125.
- Núñez-Pastrana, R., G. F. Arcos-Ortega, R. A. Souza-Perera, C. A. Sánchez-Borges, Y. E. Nakazawa-Ueji, F. J. García-Villalobos, A. A. Guzmán-Antonio, and J. J. Zúñiga-Aguilar. 2011. Ethylene, but not salicylic acid or methyl jasmonate, induces a resistance response against *Phytophthora capsici* in Habanero pepper. *Eur. J. Plant Pathol.* 131: 669-683.
- SAS Institute Inc. 2002. SAS Procedures Guide, Version 9.0 (Computer program). SAS Institute Inc, Cary, NC.
- Schmittgen, T. D., and K. J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3: 1101.
- Shim, J. S., C. Jung, S. Lee, K. Min, Y. W. Lee, Y. Choi, J. S. Lee, J. T. Song, J. K. Kim, and Y. D. Choi. 2013. *AtMYB44* regulates *WRKY70* expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Plant J.* 73: 483-495.
- Shukla, N., R. Yadav, P. Kaur, S. Rasmussen, S. Goel, M. Agarwal, A. Jagannath, R. Gupta, and A. Kumar. 2017. Transcriptome analysis of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*)-infected tomato (*Solanum lycopersicum*) roots reveals complex gene expression profiles and metabolic networks of both host and nematode during susceptible and resistance responses. *Mol. Plant Pathol.* 1-19.
- Siddique, S., and F. M. Grundler. 2018. Parasitic nematodes manipulate plant development to establish feeding sites. *Curr. Opin. Microbiol.* 46: 102-108.
- Villar-Luna, E., R. I. Rojas-Martínez, B. Reyes-Trejo, O. Gómez-Rodríguez, and E. Zavaleta-Mejía. 2017. Mevalonate pathway genes expressed in chilli CM334 inoculated with *Phytophthora capsici* and infected by *Nacobbus aberrans* and *Meloidogyne enterolobii*. *Eur. J. Plant Pathol.* 148: 867-881.
- Vrain T., C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne spp.* and comparison of eggs and larvae as inocula. *J. Nematol.* 9:249-251.
- Xia, Y., S. Li, X. Liu, C. Zhang, J. Xu, and Y. Chen. 2019. *Bacillus halotolerans* strain LYSX1-induced systemic resistance against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato. *Ann. Microbiol.* 69: 1227-1233.
- Ye, W. M., S. R. Koenning, K. Zhuo, and J. L. Liao. 2013. First report of *Meloidogyne enterolobii* on cotton and soybean in North Carolina, United States. *Plant Dis.* 97: 1262-1262.
- Zhang, X., C. Wang, Y. Zhang, Y. Sun, and Z. Mou. 2012. The Arabidopsis mediator complex subunit16 positively regulates salicylate-mediated systemic acquired resistance and jasmonate/ethylene-induced defense pathways. *Plant Cell.* 24: 4294-4309.