

RESEARCH/INVESTIGACIÓN

EXPRESIÓN DE GENES DE DEFENSA Y ACUMULACIÓN DE CAPSIDIOL EN LA INTERACCIÓN COMPATIBLE CHILE CM334/*NACOBBUS ABERRANS* E INCOMPATIBLE CHILE CM334/*MELOIDOGYNE INCOGNITA*

H. Villar-Luna¹, B. Reyes-Trejo², O. Gómez-Rodríguez¹, E. Villar-Luna¹ y E. Zavaleta-Mejía^{1*}

¹Programa de Fitopatología, Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, km 36.5 Carretera México-Texcoco, Texcoco, Estado de México, México, CP 56230; ²Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México, México. *Corresponding author: zavaleta@colpos.mx

ABSTRACT

Villar-Luna, H., B. Reyes-Trejo, O. Gómez-Rodríguez, E. Villar-Luna and E. Zavaleta-Mejía. 2015. Expression of defense genes and accumulation of capsidiol in the compatible interaction CM334/*Nacobbus aberrans* and incompatible CM334/*Meloidogyne incognita*. *Nematologica* 45:9-19.

The chili pepper (*Capsicum annuum*) line CM334 is highly resistant to the oomycete *Phytophthora capsici* and three major species of root-knot nematodes (*Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. javanica*). It is susceptible to *M. enterolobii* and *Nacobbus aberrans*. Resistance to *Meloidogyne* spp is associated with the over-expression of genes encoding the transcription factors *WRKY* and *WRKY2-a*, and the accumulation of chlorogenic acid. With the oomycete, resistance is associated with the over-expression of several defense genes and high accumulation of the phytoalexin capsidiol. The objective of this study was to estimate by qRT-PCR the expression levels of the defense genes *EAS*, *HMG2*, *WRKY-a*, *PR-1* and *POX* in the compatible interaction between CM334 and *N. aberrans* and in the incompatible interaction between CM334 and *M. incognita*, and to compare the accumulation of capsidiol in both interactions. All defense genes were over-expressed in the two interactions, but over-expression and capsidiol accumulation were higher in the incompatible (*M. incognita*) than compatible (*N. aberrans*) interaction, although over-expression differences were not always significant ($P = 0.05$). The increased transcript and capsidiol levels induced by *M. incognita* were associated with lower infection and only 0.1% of the number in the initial inoculum were found in the root at 21 d post-inoculation.

Key words: *Capsicum annuum*, capsidiol, mevalonate pathway, qRT-PCR, root-knot nematodes, transcription factor.

RESUMEN

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*. *Nematologica* 45:9-19.

La línea de chile serrano (*Capsicum annuum*) CM334 es altamente resistente al oomiceto *Phytophthora capsici* y a las tres principales especies de nematodos agalladores (*Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* y *M. javanica*), pero es susceptible a *M. enterolobii* y *Nacobbus aberrans*. La resistencia a *Meloidogyne* spp se asocia con la sobre-expresión de genes que codifican para los factores de transcripción *WRKY2* y *WRKY-a* y con la acumulación de ácido clorogénico, y en el oomiceto, con la sobre-expresión de varios genes de defensa y una elevada acumulación de la fitoalexina capsidiol. El objetivo de este trabajo fue estimar mediante qRT-PCR los niveles de expresión de los genes de defensa *EAS*, *HMG2*, *WRKY-a*, *PR-1* y *POX*, en la interacción compatible CM334/*N. aberrans* y en la incompatible CM334/*M. incognita*, y comparar los niveles de acumulación de la fitoalexina capsidiol en ambas interacciones. Todos los genes de defensa se sobre-expresaron en las dos interacciones, pero, tanto la sobre-expresión como la acumulación de capsidiol siempre fueron mayores en la interacción incompatible (*M. incognita*) que en la compatible (*N. aberrans*); aunque las diferencias en la sobre-expresión no siempre fueron significativas ($P = 0.05$). Los mayores incrementos en los niveles de transcritos y capsidiol inducidos por *M. incognita*, se relacionaron con la restricción en su establecimiento y reproducción, como lo indica el hecho de que solamente el 0.1% de los juveniles se encontrara dentro de la raíz a los 21 días post-inoculación.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, capsidiol, factores de transcripción, nematodos agalladores, qRT-PCR, ruta mevalónica.

INTRODUCCIÓN

La línea de chile serrano “Criollo de Morelos” CM334 es altamente resistente a las tres principales especies de *Meloidogyne*: *M. arenaria*, *M. incognita*, y *M. javanica* (Pegard *et al.*, 2005); pero susceptible a *Nacobbus aberrans* (Trujillo-Viramontes *et al.*, 2005) y *M. enterolobii* (Villar-Luna, 2013). En relación con los mecanismos de resistencia en CM334, se conoce que la respuesta de hipersensibilidad (RH) es evidente a los 3 días posteriores a la inoculación con *M. incognita* (Pegard *et al.*, 2005). Los mecanismos moleculares asociados con la resistencia a *Meloidogyne* spp. en algunos genotipos de chile involucran incrementos en la expresión (i.e., acumulación de transcritos) de genes que codifican para factores de transcripción *WRKY2* y *WRKY-a* y en la acumulación de ácido clorogénico (Pegard *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). Los factores de transcripción WRKY son una familia multigénica de proteínas asociadas con la respuesta a estrés biótico, estos se unen a elementos promotores de genes de defensa para regular su expresión (Eulgem y Somssich, 2007). La línea de chile CM334 muestra además resistencia al oomiceto *Phytophthora capsici* y la RH se manifiesta a nivel de raíz, tallo y follaje (Fernández-Pavía, 1997; Candela *et al.*, 2000; Ueeda *et al.*, 2006). Los mecanismos moleculares asociados con la resistencia al oomiceto implican la sobre-expresión de genes de defensa de la 5-*epi*-aristoloxeno sintasa (*EAS*), proteínas relacionadas con patogénesis [PR1 (*PR-1*) y peroxidasas (*POX*)]; así como la acumulación de compuestos con propiedades antimicrobianas como el ácido trans-cinámico (Candela *et al.*, 1995; Fernández-Pavía, 1997; Zavala-Páramo *et al.*, 2000) y de la fitoalexina sesquiterpénica capsidiol, frecuentemente utilizada como marcador de resistencia (Candela *et al.*, 2000). La biosíntesis de esta fitoalexina, es regulada por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) específica de la ruta del mevalonato (vía biosintética de fitoalexinas sesquiterpénicas) (Ha *et al.*, 2003). La HMGR es codificada por una familia multigénica, y en chile se encuentran los genes *HMG1*, *HMG2* y *HMG3* involucrados en la biosíntesis de diversos isoprenoides (e.g., esteroides y fitoalexinas sesquiterpénicas) (Ha *et al.*, 2003; Chappell *et al.*, 1991). En jitomate y papa, el gen *HMG2* está asociado con la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas en respuesta a estrés biótico (Choi *et al.*, 1992; Weissenborn *et al.*, 1995).

La enzima clave para la biosíntesis del capsidiol es la 5-*epi*-aristoloxeno sintasa codificada por el gen *EAS*. En chile y tabaco, la expresión del gen *EAS* se induce por el ataque de patógenos o tratamiento con elicitores abióticos (Zavala-Páramo *et al.*, 2000;

Bohlmann *et al.*, 2002). En Chile inoculado con *P. capsici*, la sobre-expresión de *EAS* se asocia con una acumulación elevada de capsidiol (Zavala-Páramo *et al.*, 2000).

La respuesta de defensa de las plantas además incluye las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) que podrían modificar la pared celular y proporcionar resistencia a la invasión por patógenos (Benhamou *et al.*, 1991) o mostrar actividad antifúngica (Niderman *et al.*, 1995). La defensa del chile CM334 contra *P. capsici* se ha asociado con la expresión de los genes *PR-1* y de *POX* (peroxidasas) (Fernández-Pavía, 1997; Fernández-Herrera *et al.*, 2012).

Por otra parte, durante la formación del sitio especializado de alimentación inducido por los nematodos endoparásitos sedentarios ocurre una alteración drástica en la expresión de genes (Kyndt *et al.*, 2013; Rodiuc *et al.*, 2014). En la interacción compatible de chile CM334/*N. aberrans* se redujo la acumulación de transcritos de genes relacionados con defensa, como *EAS*, *POX*, *GLU* y *PR-1* (Fernández-Herrera *et al.*, 2012) y la expresión de la RH en CM334 se retrasó en presencia del nematodo (Villar-Luna *et al.*, 2009). De igual forma, la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y el contenido de fenoles solubles totales se redujo en plantas de CM334 infectadas por *N. aberrans* e inoculadas con *P. capsici* (López-Martínez *et al.*, 2011).

Considerando estos antecedentes, surgió el interés por conocer las alteraciones que ocurren durante la interacción incompatible de CM334/*M. incognita* y compararlas con las inducidas por el nematodo falso agallador *Nacobbus aberrans* (interacción compatible). La información generada contribuirá al conocimiento de la reprogramación génica que ocurre en las plantas infectadas por nematodos agalladores. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue estimar mediante qRT-PCR los niveles de expresión de los genes de defensa *EAS*, *HMG2*, *WRKY-a*, *PR-1* y *POX*, en la interacción compatible y en la incompatible; y comparar los niveles de acumulación de la fitoalexina capsidiol en ambas interacciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Semillas de chile “tipo serrano” CM334, se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (1%, v/v), y se germinaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Las plántulas se trasplantaron a macetas conteniendo 25 mL de arena estéril (una plántula por maceta) y se mantuvieron en cámaras de crecimiento a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 14 hr a una intensidad luminosa

de 6768 lux (luz fluorescente) y 10 hr de oscuridad. Los riegos se realizaron cada 24 hr con agua esterilizada y semanalmente se fertilizó aplicando una solución nutritiva (3.15 g de Nitrofoska® 12-12-12 disuelto en un litro de agua esterilizada).

Inoculación con N. aberrans y M. incognita

El inóculo se obtuvo de raíces agalladas de jitomate (*Solanum lycopersicum*). La extracción de los huevos se efectuó según Vrain (1977) y para la obtención de los juveniles del segundo estadio (J₂), los huevos se incubaron a 28 ± 1°C en cajas Petri conteniendo agua destilada esterilizada. Cuando las plantas presentaron entre cuatro y cinco hojas verdaderas, se inocularon con una suspensión del nematodo correspondiente (500 J₂ por planta).

Establecimiento del experimento

El experimento constó de tres tratamientos: Plantas de CM334 i) inoculadas con *N. aberrans* (CM334/Na), ii) inoculadas con *M. incognita* (CM334/Mi) y iii) sin nematodo (Testigo), para cada tratamiento se establecieron 48 plantas. A los 2, 7 y 21 días post-inoculación (dpi), se tomaron 12 plantas/tratamiento para evaluar la expresión génica; y 12 plantas/tratamiento a los 7 dpi para determinar el contenido de capsidiol. El sistema radical completo de cada planta se separó y congeló con N₂ líquido y se mantuvo a -80°C hasta su utilización. El experimento se repitió una vez.

En los tratamientos con nematodos se incluyeron plantas adicionales para verificar la invasión de las raíces a los 2, 7 y 21 dpi (4 plantas/dpi), las raíces se tiñeron por el método hipoclorito de sodio-fucsina acida (Byrd *et al.*, 1983). El número de individuos por raíz se contabilizó bajo un microscopio óptico.

Extracción de RNA total y síntesis de cDNA

El RNA total de raíces de CM334 se extrajo utilizando el RNeasy® Plant mini kit (Qiagen), seguida de una digestión con DNasa de acuerdo al protocolo del fabricante (Qiagen). La pureza e integridad del RNA se verificó por espectrofotometría (ND-1000, Nanodrop Technologies) y por electroforesis en gel de agarosa desnaturante a 1.2%, respectivamente. La síntesis de cDNA se desarrolló a partir de 2 µg de RNA total utilizando oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen) y la enzima M-MLV transcriptasa reversa (Promega). Dos µg de RNA total se mezclaron con 0.5 µl de oligo dT₁₂₋₁₈ aforando a un volumen de 12 µl con agua libre de RNasas y DNasas y la mezcla se incubó a 65°C por 10 min; a esta reacción se le adicionaron 8 µl de una segunda mezcla, que contenía 6 µl de

tampón 5x para retrotranscripción, 1 µl de dNTP mix (10 mM) y 1 µl de la retrotranscriptasa. La mezcla resultante se incubó en un termociclador (TC-3000 Techne) durante 60 min a 37°C y 10 min a 70°C. El cDNA generado se utilizó para medir los niveles de expresión génica relativa, mediante PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real

La PCR cuantitativa se desarrolló en un sistema ABI7500 (Applied Biosystems). La mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL, consistió de tampón 10X, MgCl₂ 1.5 mM, de cada oligonucleótido 0.4 µM, de dNTPs 0.2 mM, amplificasa (Biotecmol), SYBR Green I (1:75000) (Molecular Probes, Eugene, OR) como fluoróforo, fluoresceína 10 nM como referencia pasiva, y 2 µL de cDNA. Las características de los oligonucleótidos utilizados se muestran en el Cuadro 1.

Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 95°C por 4 min, seguida de 35 ciclos a 95°C por 15 s, alineamiento a 60°C (55°C para *WRKY-a*) por 35 s, y extensión a 72°C por 35 s. Los datos se colectaron durante el paso de extensión. Adicionalmente, se incluyó una curva de disociación para descartar la formación de productos inespecíficos. La expresión relativa se calculó mediante el método 2^{-ΔΔCt} (Schmittgen y Livak, 2008), utilizando como referencia interna el gen que codifica para gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) para normalizar la expresión del gen de interés, y las plantas testigo (sin nematodos) para calibrar los niveles de expresión. Los niveles de transcritos del gen de interés se expresaron en número de “veces” en respuesta al tratamiento y en relación al nivel basal de transcritos en las plantas testigo (1X).

Contenido de capsidiol

La extracción de capsidiol se efectuó a partir de 1 g de raíces de plantas de CM334, siguiendo la metodología descrita por Egea *et al.*, (1996). El tejido se maceró en un mortero conteniendo N₂ líquido, el macerado se transfirió a tubos de vidrio y se le agregó una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH (2:1). Cada extracto se filtró y evaporó a sequedad a temperatura ambiente, posteriormente se disolvió en la mezcla CH₂Cl₂:MeOH (2:1) para separar las fracciones mediante cromatografía en capa delgada (placas cromatográficas de silica gel 60 F₂₅₄, Merck®) utilizando una mezcla de hexano: acetato de etilo (1:6). Para cada tratamiento, las muestras se cromatografiaron en banda y eluyeron conjuntamente con una muestra de capsidiol puro

extraído y purificado por nuestro grupo de trabajo. Se recortó la porción correspondiente al estándar, la cual se reveló con una disolución de sulfato cérico amoniacal 2N en H_2SO_4 y se confrontó físicamente con la porción eluída y no revelada de cada tratamiento. Las regiones correspondientes al $Rf = 0.28$ característico del capsidiol se rasparon, se extrajeron con CH_2Cl_2 , filtraron y evaporaron a sequedad. Las determinaciones del contenido de capsidiol se efectuaron siguiendo la metodología descrita por Chávez-Moctezuma y Lozoya-Gloria (1996) con algunas modificaciones. Las muestras se redisolviéron en metanol, preparándose una mezcla de reacción en la proporción 1:1, extracto:vainillina al 2% en ácido sulfúrico. Las muestras tratadas se incubaron por 1 hr a temperatura ambiente y se cuantificaron por espectrofotometría (ND-1000, Nanodrop Technologies) a una longitud de onda de 640 nm, utilizando una curva de calibración previamente elaborada con capsidiol puro. Los datos obtenidos se expresaron en $\mu g\ g^{-1}$ de tejido fresco de raíz.

Análisis estadístico

Para cada tiempo de evaluación, los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a un análisis de comparación de medias con el método de Tukey ($P \leq 0.05$) utilizando el programa SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc., 2002). Los análisis estadísticos de los datos de los dos experimentos realizados mostraron una tendencia similar, por lo tanto en cuadros y figuras se muestran los resultados solamente de uno de los dos experimentos.

RESULTADOS

Infección de chile CM334 por *N. aberrans* y *M. incognita*

Nacobbus aberrans penetró las raíces de CM334 en mayor número que *M. incognita* en todos los tiempos post-inoculación (Fig. 1). En las raíces infectadas por *N. aberrans* los nematodos presentaron la forma de "C" o de espiral a los 21 dpi (Fig. 2c), típica de los juveniles del tercer estadio (J_3). La mayor invasión de raíces por J_2 de *M. incognita* se registró a los 2 dpi (50 J) y a los 7 y 21 dpi el número de individuos descendió a 10 y 0.5 individuos por planta (Fig. 1 y 2).

Expresión de genes de defensa

Todos los genes estudiados se sobre-expresaron en las raíces de chile CM334 tanto en la interacción compatible como incompatible a los 2, 7 y 21 dpi;

sin embargo, la sobre-expresión invariablemente fue mayor ($P \leq 0.05$) en las plantas inoculadas con *M. incognita* que con *N. aberrans*, aunque las diferencias no siempre fueron significativas (Fig. 3). La mayor expresión de los genes *EAS* y *HMG2* se registró a los 7 dpi para ambos nematodos, así, el incremento de *EAS* fue de 5.03 y 7.14 veces y el de *HMG2* de 2.02 y 3.20 veces en los tratamientos CM334/*Na* y CM334/*Mi*, respectivamente.

Los incrementos en los niveles de transcritos del gen *PR-1* en la interacción incompatible (CM334/*Mi*) fueron muy similares en los tres tiempos evaluados (Fig. 3) y fueron significativamente diferentes a los de CM334/*Na* (1.63 veces) sólo a los 7 dpi.

La sobre-expresión del gen *POX* en CM334/*Mi* (2.82, 2.28 y 2.27 veces) fue significativamente mayor que en CM334/*Na* (1.73, 1.75 y 1.66, respectivamente) a los 2, 7 y 21 dpi. La mayor acumulación de transcritos se registró a los 2 dpi en la interacción incompatible, mientras que en la compatible (tratamiento CM334/*Na*) los niveles fueron muy similares en los tres tiempos. El gen *WRKY-a* sólo presentó niveles de expresión diferencial entre tratamientos (CM334/*Na* 1.85 y CM334/*Mi* 2.95 veces) a los 2 dpi.

Contenido de capsidiol

El contenido de capsidiol fue mayor ($P \leq 0.05$) en la interacción incompatible (CM334/*Mi*) ($2.73\ \mu g\ g^{-1}$ raíz), que en la compatible ($1.97\ \mu g\ g^{-1}$ raíz) y en las plantas testigo (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

La línea de chile CM334 es resistente a las tres principales especies de nematodos agalladores (*Meloidogyne incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*) y su resistencia se manifiesta como una reacción de hipersensibilidad (RH) asociada con incrementos en los niveles de ácido clorogénico (AC) (Pegard *et al.*, 2005). Sin embargo, CM334 es susceptible al nematodo falso agallador *Nacobbus aberrans* y en plantas inoculadas con este nematodo se han reportado niveles reducidos de ácido clorogénico, en comparación con las inoculadas con *M. incognita* (López-Martínez, *et al.*, 2011). En el presente estudio, el bajo número de individuos de *M. incognita* presentes en raíces de CM334 (interacción incompatible) podría asociarse con la RH y con el AC u otros metabolitos secundarios capaces de restringir su establecimiento exitoso en esta línea de chile (Pegard *et al.*, 2005), lo opuesto pudo haber ocurrido en la interacción compatible, dado el mayor número de individuos de *N. aberrans* presentes en todos los tiempos post-inoculación y a

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de expresión génica.

Proteína	Gen	Número de acceso ^a		[§] Secuencias (5' → 3')	Producto de PCR (pb)
GAPDH ^b	<i>GAPDH</i>	AJ246011	[§] Fw Rv	GGCCTTATGACTACAGTTCACTCC GATCAACCACAGAGACATCCACAG	217
EAS ^c	<i>EAS</i>	AJ005588	[§] Fw Rv	GCTCAAGAAATTGAACCGCCGAAG TCTTCATTATAGACATCGCCCTCG	200
WRKY-a	<i>WRKY-a</i>	AY391747	[§] Fw Rv	CATTACCGTCAACCATCTCA TCAACATCCTCATCTCCAAA	377
HMGR2 ^d	<i>HMG2</i>	AF110383	[§] Fw Rv	ATTACCTTCAGAATGAATACGCT CTCTCTAIGTTTTGTGCTGGGT	316
POX ^e	<i>POX</i>	AF442386	[§] Fw Rv	CCAGTACGTGCCCAAGAGCTG GGATGCGTCGATTGAAGGGTC	560
PR-1 ^f	<i>PR-1</i>	AF053343	^h Fw Rv	GTTGTGCTAGGGTTCGGTG CAAGCAATTATTTAAACGATCCA	301

^aNCBI (National Center for Biotechnology Information); ^bGAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; ^cEAS: 5-epiaristoloueno sintasa. ^dHMGR2: hidroximetilglutaril-CoA reductasa 2. ^ePOX: peroxidasa. ^fPR-1: proteína relacionada con patogénesis 1. [§]Diseñados por nuestro grupo de trabajo. ^hGayoso *et al.* (2007).

Cuadro 2. Acumulación de capsidiol en raíces de plantas de chile CM334 a los 7 días post-inoculación con *Nacobbus aberrans* o *Meloidogyne incognita*.

Tratamiento	Capsidiol ($\mu\text{g g}^{-1}$ de raíz)
Control	1.90 \pm 0.10 b
<i>N. aberrans</i>	1.97 \pm 0.26 b
<i>M. incognita</i>	2.73 \pm 0.29 a

Cada valor representa el promedio de tres extracciones \pm desviación estándar. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes (Test de Tukey, $P \leq 0.05$). El experimento se repitió una vez.

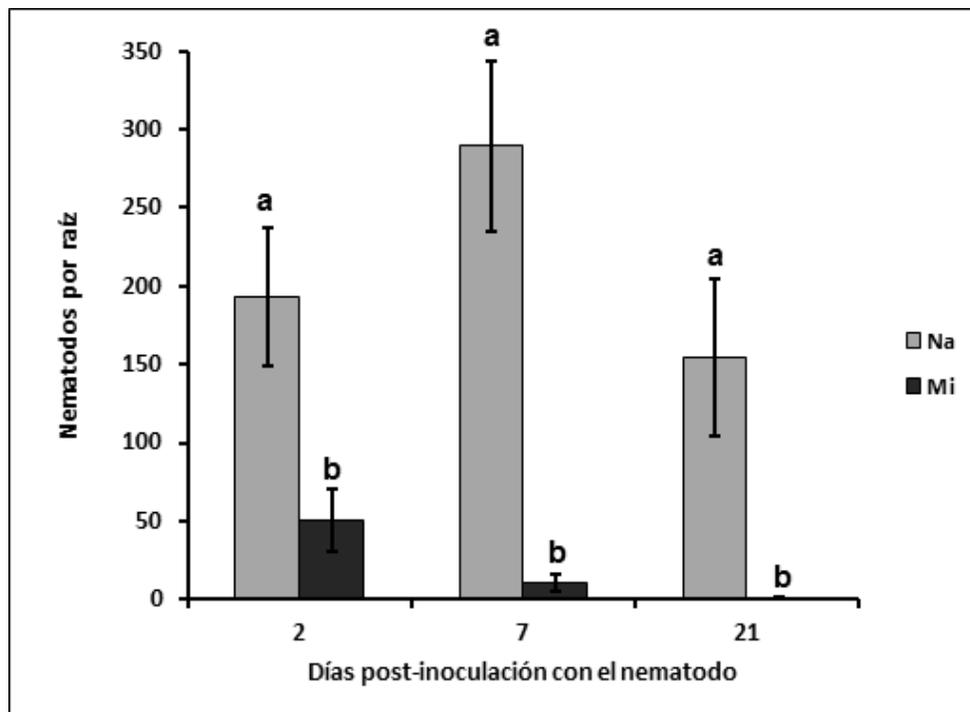


Fig. 1. Número de individuos de *Nacobbus aberrans* (Na) y *Meloidogyne incognita* (Mi) que ingresaron en raíces de chile CM334 a los 2, 7 y 21 días post-inoculación. Cada barra representa el promedio de cuatro raíces analizadas, y la línea en cada barra, la desviación estándar. El experimento se repitió una vez.

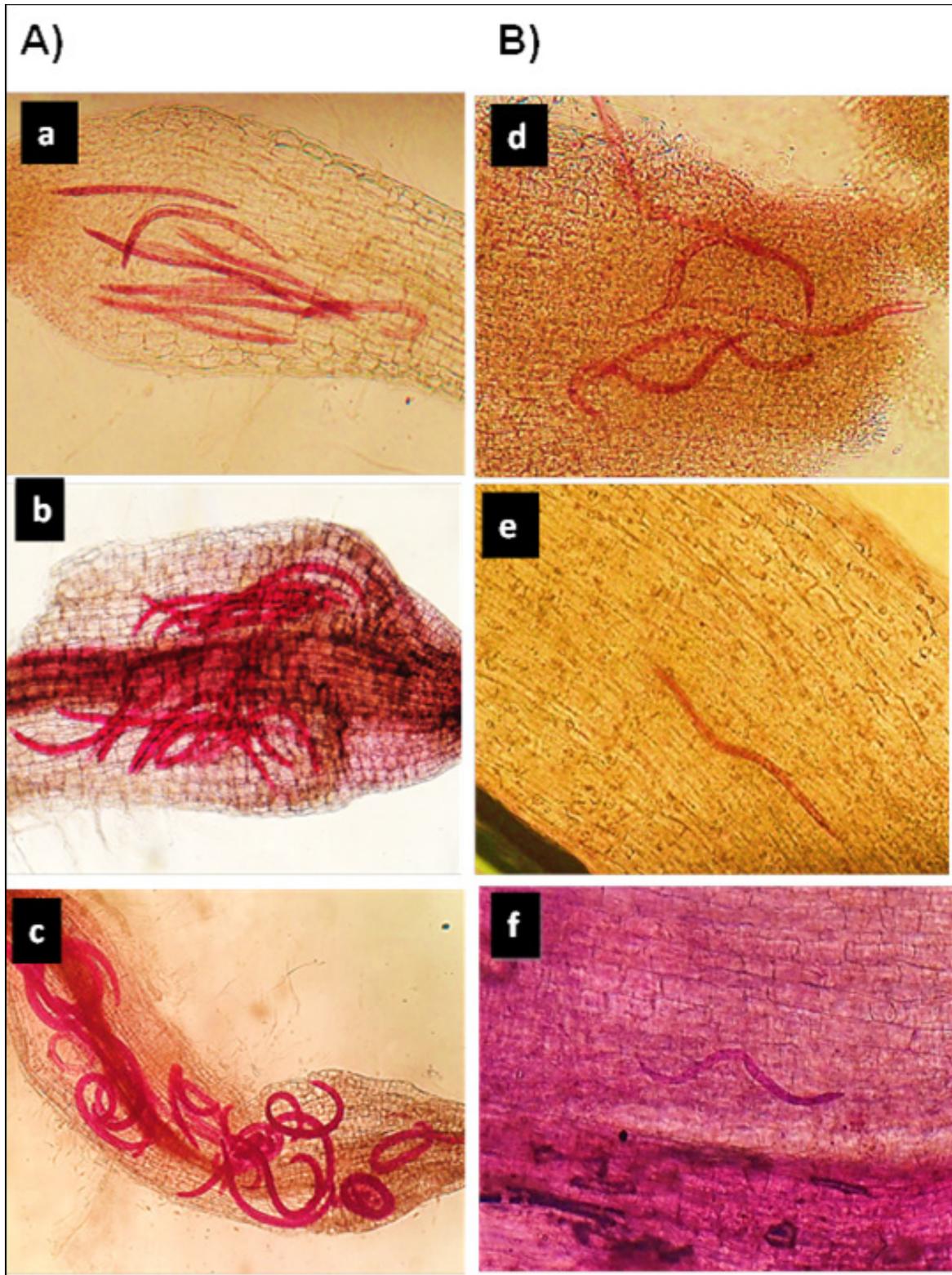


Fig. 2. Desarrollo de A) *Nacobbus aberrans* y B) *Meloidogyne incognita* en raíces de chile CM334 a los 2 (a y d), 7 (b y e), y 21 (c y f) días posteriores a la inoculación. Fotos representativas de raíces teñidas con fucsina acida.

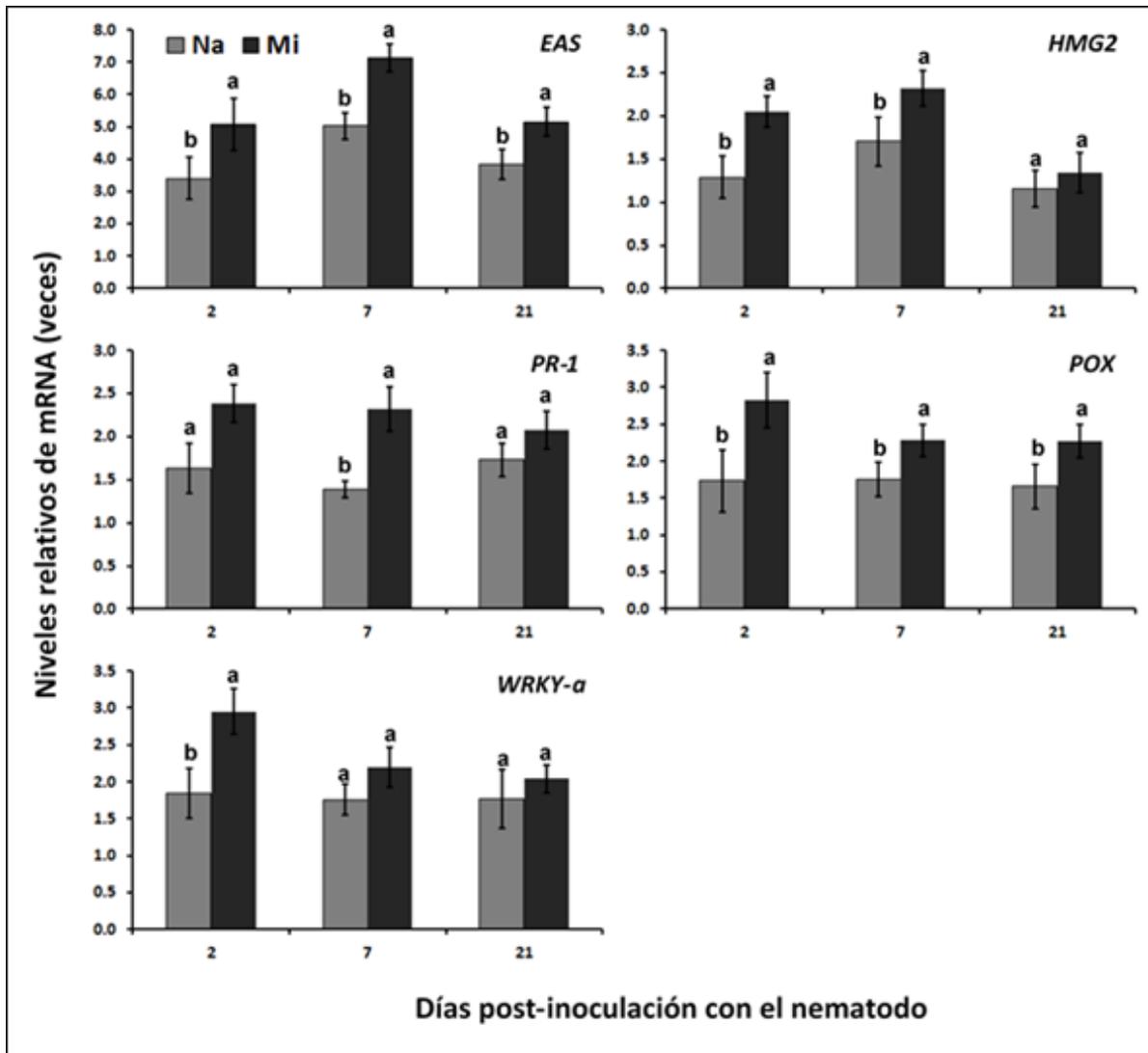


Fig. 3. Niveles relativos de transcritos de los genes *EAS*, *HMG2*, *PR-1*, *POX* y *WRKY-a* en raíces de chile CM334 resistente a *Meloidogyne incognita*. Na: plantas inoculadas con *Nacobbus aberrans*; Mi: inoculadas con *M. incognita*. Cada barra representa el promedio de tres réplicas técnicas y la línea en cada barra, la desviación estándar. Los niveles de transcritos se expresaron como cambios en veces en respuesta al tratamiento con relación al nivel basal de transcritos en las plantas testigo (1x) y se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen y Livak, 2008), utilizando como referencia interna el gen que codifica para Glicerilaldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) para normalizar la expresión, y las plantas testigo para calibrar los niveles de expresión del gen de interés. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Test de Tukey, $P \leq 0.05$). El experimento se repitió una vez.

la presencia de estadios J_3 a 21 dpi. Datos similares sobre la infección de raíces de chile CM334 por *N. aberrans* ya han sido documentados (Godínez-Vidal *et al.*, 2013). Pegard *et al.* (2005) reportaron que a 9 dpi con *M. incognita*, en raíces de chile (cv. Doux Long des Landes) (interacción compatible) la presencia de células gigantes multinucleadas fue evidente, mientras que a este mismo tiempo en la interacción incompatible (CM334-*M. incognita*), se observaron individuos J_2 muertos confinados por células necróticas producto de la RH. Con respecto a las alteraciones transcripcionales observadas en

este estudio, los máximos niveles acumulados de *EAS*, *HMG2*, *WRKY-a*, *PR-1* y *POX* se registraron en la interacción incompatible, en comparación con la compatible. En *C. annuum* los genes *EAS* y *HMG2*, codifican para las enzimas 5-*epi* aristoloqueno sintasa e hidroximetilglutaril-CoA reductasa 2, respectivamente, implicados en la biosíntesis de fitoalexinas sesquiterpénicas como el capsidiol (Zavala-Páramo *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2003). La mayor sobre-expresión de estos genes en la interacción incompatible (CM334/*Mi*) estuvo asociada con un mayor incremento en la acumulación

de capsidiol, lo cual contrastó con los cambios registrados en la interacción compatible (CM334/*Na*), donde los niveles de expresión y el contenido de la fitoalexina fueron bajos. El efecto tóxico del capsidiol sobre los J_2 de *N. aberrans* fue demostrado por Godínez-Vidal *et al.* (2010) y sobre el oomiceto *P. capsici* por Egea *et al.* (1996). En interacciones incompatibles chile/*P. capsici*, los incrementos en el contenido de capsidiol se asocian frecuentemente con la resistencia (Egea *et al.*, 1996; Candela *et al.*, 2000). En *C. annuum*, se han reportado altos niveles de expresión de *HMG2* (Ha *et al.*, 2003; Villar-Luna, 2013) y de *EAS* en respuesta al ataque por *P. capsici* (Villar-Luna, 2013). Se tiene evidencia de que *N. aberrans* reduce la expresión de genes implicados en la defensa de la planta abatiendo y retrasando las respuestas de defensa, para proveerse de condiciones adecuadas que le permitan establecerse y completar su ciclo de vida exitosamente (Fernández-Herrera *et al.*, 2012; Villar-Luna *et al.*, 2009; Godínez-Vidal *et al.*, 2013). Los niveles de expresión de los genes *EAS* y *HMG2* se redujeron en plantas de chile CM334 inoculadas con *N. aberrans* tanto a nivel local (Fernández-Herrera *et al.*, 2012) como sistémico (Villar-Luna, 2013).

En la interacción incompatible (CM334/*Mi*), la mayor sobre-expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis como PR-1 y *POX* (peroxidases) contrastó con los niveles inferiores registrados en raíces de plantas CM334 infectadas por *N. aberrans*. La implicación de estas proteínas en respuesta al ataque por patógenos está bien documentada (Van Loon *et al.*, 2006). Así, niveles bajos de transcritos de PR-1 se han reportado en la interacción compatible chile CM334/*N. aberrans* y contrastaron con altos niveles registrados en la incompatible CM334/*Phytophthora capsici* (Fernández-Herrera *et al.*, 2012). La sobre-expresión de PR-1 se asocia con los mecanismos de defensa en chile; por ejemplo la acumulación del gen *CABPR-1*, que codifica para una proteína PR-1, fue mayor en la interacción incompatible chile cv. Hanbyul-*Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria* (aislamiento Bv5-4a), que en la compatible chile cv. Hanbyul-*X. campestris* pv. *vesicatoria* (aislamiento Ds1) (Kim y Hwang, 2000). La relación de *PR1* con la resistencia a nematodos fitoparásitos también se ha descrito; por ejemplo, en plantas de tomate resistentes a *M. incognita*, se incrementó la expresión del gen *PR-1* cuando se inocularon con el nematodo (Molinari *et al.*, 2013). Todo lo anterior sugiere que la alteración de la expresión del gen PR1 inducida por *N. aberrans* podría estar favoreciendo su establecimiento exitoso.

Por lo que respecta a las peroxidases, enzimas involucradas en el metabolismo de las auxinas, lignina, especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno

(RNS), así como en la formación de suberina y en la síntesis de fitoalexinas (Almagro *et al.*, 2009), se ha consignado que los niveles de expresión de los genes que las codifican, son abatidos en las interacciones planta-nematodo. En la interacción compatible CM334/*N. aberrans* los niveles de expresión de *POX* se redujeron (Villar-Luna, 2013) y en interacciones incompatibles entre cultivares de Caupí (*Vigna unguiculata*) resistentes a *M. incognita*, se registraron los niveles más elevados de actividad de peroxidases en comparación con las compatibles (Oliveira *et al.*, 2012). En jitomate, el agallamiento de raíces inducido por *Meloidogyne javanica* estuvo asociado con una expresión reducida de genes que codifican para PRs como peroxidases (Bar-Or *et al.*, 2005). A 2 dpi, en raíces de jitomate (línea Motelle) inoculadas con *M. javanica* (interacción incompatible), el gen *TPXI* (peroxidases) fue sobre-expresado, en contraste, en raíces de la línea MoneyMaker (interacción compatible) el gen fue reprimido; el gen *TPXI* se ha asociado con la deposición de lignina (Portillo *et al.*, 2013). Adicionalmente, Portillo *et al.* (2013) reportan que en plantas transgénicas de jitomate sobre-expresando el gen *TPXI*, se observó un reducido número de agallas y masas de huevos de *M. javanica*. Melillo y colaboradores (2006) indican que durante una interacción incompatible planta-nematodo, las peroxidases juegan un papel fundamental en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se asocian con el desarrollo de la RH.

En el presente trabajo los niveles de transcritos del gen *WRKY-a*, fueron significativamente mayores en la interacción incompatible (CM334/*Mi*) que en la compatible (CM334/*Na*). Diversos miembros de la familia multigénica de factores de transcripción WRKY, asociados con defensa, se sobre-expresan en respuesta a patógenos. En la interacción incompatible *C. annuum*/*M. incognita*, la resistencia se asoció con la sobre-expresión de los genes *WRKY-a* y *WRKY2* (Li *et al.*, 2008); de manera similar en chile CM334 la sobre-expresión de *WRKY-a* fue muy superior en la interacción incompatible CM334/*P. capsici* en comparación con la compatible CM334/*N. aberrans* (Villar-Luna, 2013). La reprogramación transcripcional inducida por nematodos agalladores en sus hospedantes susceptibles implica la sobre-expresión de aquellos genes cuyos productos favorecen al nematodo (e.g., genes asociados con la formación del sitio especializado de alimentación, SEA), mientras que aquellos que codifican para moléculas que pueden restringir su establecimiento y reproducción, son reprimidos (genes de defensa) (Caillaud *et al.*, 2008). Un análisis transcriptómico reciente en *N. aberrans*, reveló la presencia de genes funcionales asociados con el parasitismo (e.g., efectores) implicados en su migración, represión de

mecanismos de defensa, e inducción del SEA, estos genes exhiben similitudes con los de *Meloidogyne* spp. y los nematodos que se enquistan (Eves-van den Akker *et al.*, 2014).

Los resultados de la presente investigación demuestran una vez más, que las defensas de la planta se disparan independientemente del tipo de fitopatógeno que interaccione con ella y que la incompatibilidad o compatibilidad planta-patógeno estará determinada por la velocidad y la magnitud con la que ocurre la expresión de los genes asociados con las defensas que restringen el desarrollo de un patógeno potencial (Kuc, 1997). La sobre-expresión de los diversos genes de defensa evaluados y el contenido de capsidiol en plantas de chile CM334 se incrementó tanto en presencia de *N. aberrans* como de *M. incognita*; sin embargo, los incrementos fueron mayores en la interacción incompatible (CM334/*M. incognita*). Los altos incrementos inducidos por *M. incognita*, se relacionaron con la restricción de su establecimiento y reproducción, como lo indica el hecho de que solamente el 0.1% de los juveniles inoculados se encontrara dentro de la raíz a los 21 días después de haber realizado la inoculación.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado al primer autor para realizar sus estudios de maestría y para el desarrollo de esta investigación como parte del Proyecto 46331-Z.

LITERATURA CITADA

- Almagro, L., L. G. Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. R. Barceló, and M. A. Pedreño. 2009. Class III peroxidases in plant defense reactions. *Journal of Experimental Botany* 60:377-390.
- Bar-Or, C., Y. Kapulnik, and H. Koltai. 2005. A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *European Journal of Plant Pathology* 111:181-192.
- Benhamou, N., J. Grenier, and A. Asselin. 1991. Immunogold localization of pathogenesis-related protein P14 in tomato root cells infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 38:237-253.
- Bohlmann, J., E. J. Stauber, B. Krock, N. J. Oldham, J. Gershenzon, and I. T. Baldwin. 2002. Gene expression of 5-*epi* aristolochene synthase and formation of capsidiol in roots of *Nicotiana attenuate* and *N. sylvestris*. *Phytochemistry* 60:109-116.
- Byrd Jr, D. W., T. Kirkpatrick, and K. R. Barker 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology* 15:142.
- Caillaud, M. C., G. Dubreuil, M. Quentin, L. Perfus-Barbeoch, P. Lecomte, J. de A. Engler, P. Abad, M. N. Rosso, and B. Favery. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology* 165:104-113.
- Candela, M. E., M. D. Alcazar, A. Espin, C. Egea, and L. Almela. 1995. Soluble phenolic acids in *Capsicum annuum* stems infected with *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology* 44:116-123.
- Candela, M. E., C. Egea, M. D. Garcia-Perez, J. Costa, and M. Candela. 2000. Breeding paprika type peppers resistant to *Phytophthora capsici*. *Acta Horticulturae* 522:79-86.
- Chappell, J., C. VonLanken, and U. Vögeli. 1991. Elicitor-inducible 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity is required for sesquiterpene accumulation in tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiology* 97:693-698.
- Chávez-Moctezuma, M. P., and E. Lozoya-Gloria. 1996. Biosynthesis of the sesquiterpene phytoalexin capsidiol in elicited root cultures of chili pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Cell Reports* 15:360-366.
- Choi, D., B. L. Ward, and R. M. Bostock. 1992. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid. *Plant Cell* 4:1333-1344.
- Egea, C., D. García, and M. E. Candela. 1996. Capsidiol accumulation in *Capsicum annuum* stems during the hypersensitive reaction to *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* 49:762-764.
- Eulgem, T., and I. E. Somssich. 2007. Networks of *WRKY* transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 10:366-371.
- 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 plant-parasitic nematodes. *Genome Biology and Evolution* 6:2181-2194.
- Fernández-Herrera, E., R. I. Rojas-Martínez, L. Guevara-Olvera, M. E. Rivas-Dávila, E. Valadez-

- Moctezuma, y E. Zavaleta-Mejía. 2012. Defensa en Chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici* e infectado por *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 42:96-107.
- Fernández-Pavía, S. 1997. Host pathogen interaction in the root *Phytophthora capsici*-*Capsicum annuum* resistant CM-334 pathosystem. Ph.D. Thesis. New Mexico State University. 109 pp.
- Gayoso, C., O. M. de Ilárduya, F. Pomar, and F. M. de Cáceres. 2007. Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. *European Journal of Plant Pathology* 118: 199-209.
- Godínez-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.
- 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* 372:339-348.
- Ha, S. H., J. B. Kim, Y. S. Hwang, and S. W. Lee. 2003. Molecular characterization of three 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase genes including pathogen-induced *HMG2* from pepper (*Capsicum annuum*). *Biochimica Biophysica Acta* 1625:253-260.
- Kim, Y. J., and B. K. Hwang. 2000. Pepper gene encoding a basic pathogenesis-related 1 protein is pathogen and ethylene inducible. *Physiologia Plantarum* 108:51-60.
- Kuc, J. 1997. Molecular aspects of plant responses to pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* 19: 551-559.
- Kyndt, T., P. Vieira, G. Gheysen, and J. de Almeida-Engler. 2013. Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. *Planta* 238:807-818.
- Li, S. M., Z. C. Mao, L. Li, D. X. Feng, Y. H. Yang and B. Y. Xie. 2008. Isolation of WRKY genes in the incompatible interaction between *Meloidogyne incognita* and *Capsicum annuum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 10:1467-1472.
- López-Martínez, N., M. T. Colinas-León, C. B. Peña-Valdivia, Y. Salinas-Moreno, P. Fuentes-Montiel, M. Biesaga, and E. Zavaleta-Mejía. 2011. Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM-334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant Soil* 338:399-409.
- Melillo, M. T., P. Leonetti, M. Bongiovanni, P. Castagnone-Sereno, and T. Blevé-Zacheo. 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. *New Phytologist* 170:501-512.
- Molinari, S., E. Fanelli, and P. Leonetti. 2013. Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in Mi-1-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. *Molecular Plant Pathology* 15:255-264.
- Niderman, T., I. Genetet, T. Bruyere, R. Gees, A. Stintzi, M. Legrand, and E. Mosinger. 1995. Pathogenesis related *PR-1* proteins are antifungal isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic *PR-1* of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 108:17-27.
- Oliveira, J. T. A., N. C. Andrade, A. S. Martins-Miranda, A. A. Soares, D. M. F. Gondim, J. H. Araújo-Filho, F.R. Freire-Filho, and I. M. Vasconcelos. 2012. Differential expression of antioxidant enzymes and PR-proteins in compatible and incompatible interactions of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the root-knot *Meloidogyne incognita*. *Plant Physiology and Biochemistry* 51:145-152.
- Pegard, A., G. Brizzard, A. Fazari, O. Soucaze, P. Abad, and C. Djian-Caporalino. 2005. Histological characterization of resistance to different root-knot nematode species related to phenolics accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 95:158-165.
- Portillo, M., J. Cabrera, K. Lindsey, J. Topping, M. F. Andrés, M. Emiliozzi, J. C. Oliveros, G. García-Casado, R. Solano, H. Koltai, N. Resnick, C. Fenoll, and C. Escobar. 2013. Distinct and conserved transcriptomic changes during nematode-induced giant cell development in tomato compared with Arabidopsis: A functional role for gene repression. *New Phytologist* 197:1276-1290.
- Rodiuc, N., P. Vieira, M. Y. Banora, and J. de Almeida Engler. 2014. On the track of transfer cell formation by specialized plant-parasitic nematodes. *Frontiers in Plant Science* 5:1-14.
- SAS Institute Inc., 2002. SAS Procedures Guide, Version 9.0 (Computer program). SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Schmittgen, T. D., and K. J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT

- method. *Nature Protocols* 3:1101-1108.
- 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. *Nematropica* 35:37-44.
- Ueda, M., M. Kubota, and K. Nishi. 2006. Contribution of jasmonic acid to resistance against *Phytophthora* blight in *Capsicum annuum* cv. SCM334. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67:149-154.
- Van Loon, L. C., M. Rep, and C. M. J. Pieterse. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44:135-162.
- Villar-Luna, E. 2013. Transcritos de genes de defensa acumulados en Chile CM334 infectado por *Nacobbus aberrans* o por *Meloidogyne enterolobii* e inoculado con *Phytophthora capsici*. Tesis de Doctorado en Ciencias Colegio de Postgraduados Montecillo, Edo. de México. 118 pp.
- Villar-Luna, E., B. Reyes-Trejo, R. I. Rojas-Martínez, O. Gómez-Rodríguez, A.M. Hernández-Anguiano, y E. Zavaleta-Mejía. 2009. Respuesta hipersensitiva en el follaje de Chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 39:143-155.
- Vrain, T. C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. *Journal of Nematology* 9:249.
- Weissenborn, D. L., C. J. Denbow, M. Laine, S. S. Lång, Z. Yang, X. Yu, and C. L. Cramer. 1995. HMG-CoA reductase and terpenoid phytoalexins: Molecular specialization within a complex pathway. *Physiologia Plantarum* 93:393-400.
- Zavala-Páramo, G., M. P. Chávez-Moctezuma, E. García-Pineda, S. Yin, J. Chappell, and E. Lozoya-Gloria. 2000. Isolation of an elicitor-stimulated 5-epi aristolochene synthase gene (gPEAS1) from chili pepper (*Capsicum annuum*). *Physiologia Plantarum* 110:410-418.

Received:

6/X/2014

Accepted for publication:

6/II/2015

Recibido:

Aceptado para publicación: