





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN  
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD MICHOACÁN**



**Cambios transcripcionales de genes de defensa dependientes de ácido salicílico inducidos en *Arabidopsis thaliana* por nematodos agalladores**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable**

**Presenta:**

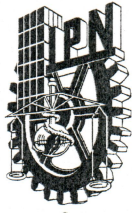
I.B.Q. Irving Hernández Hernández

**Directores:**

Dr. Carlos Méndez Inocencio

Dr. Edgar Villar Luna

Jiquilpan, Michoacán; diciembre 2018



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 12:00 horas del día 16 del mes de Noviembre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Unidad Michoacán para examinar la tesis titulada:

Cambios transcripcionales de genes de defensa dependientes de ácido salicílico inducidos en Arabidopsis thaliana por nematodos agalladores

Presentada por el alumno:

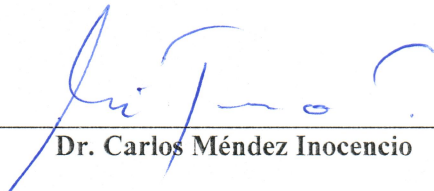
<u>Hernández</u>	<u>Hernández</u>	<u>Irving</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre
Con registro:		
B	1	6
1	2	7
3		

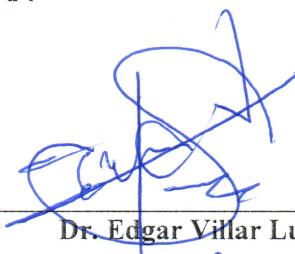
aspirante de:


**Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable**

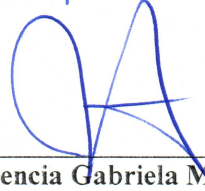
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA Directores de tesis

  
Dr. Carlos Méndez Inocencio

  
Dr. Edgar Villar Luna

  
Dr. Mauricio Nahuam Chávez Avilés

  
Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

  
Dra. María Valentina Angoa Pérez

  
Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante.  
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES.





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de Jiquilpan de Juárez, Michoacán el día 04 del mes de diciembre del año 2018, el (la) que suscribe Irving Hernández Hernández alumno (a) del Programa de **Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable** con número de registro B161273, adscrito a **C.I.I.D.I.R. I.P.N. Unidad Michoacán**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Carlos Méndez Inocencio y el Dr. Edgar Villar Luna y cede los derechos del trabajo intitulado **“CAMBIOS TRANSCRIPCIONALES DE GENES DE DEFENSA DEPENDIENTES DE ÁCIDO SALICÍLICO INDUCIDOS EN *Arabidopsis thaliana* POR NEMATODOS AGALLADORES”** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: cmendezi@ipn.mx, edgar\_villarled@yahoo.com, o irving\_hdezh@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Irving Hernández Hernández

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores el Dr. Carlos Méndez y el Dr. Edgar Villar Luna por brindarme todo su apoyo para el desarrollo de mi proyecto de tesis, por compartir su conocimiento y por la disponibilidad que siempre mostraron con mi persona.

A Paula Itzel Bautista Ortega por ser mi compañera de trabajo, por su apoyo incondicional para la culminación de este proyecto.

A mi comité tutorial por participar en la revisión y evaluación de mi proyecto, con el objetivo de mejorar mi trabajo.

A mis compañeros y maestros de la maestría por hacer más amena mi estancia en la institución, al mostrarme su apoyo incondicional, compartir su conocimiento y experiencias.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para Desarrollo Integral Regional unidad Michoacán (CIIDIR) y al Instituto Politécnico Nacional (IPN), por permitirme formar parte de su comunidad estudiantil, así como por su apoyo a través de su beca institucional BEIFI.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por su programa de becas para estudios de posgrado, la cual recibí durante los dos años de mi programa de maestría, además por su apoyo a este trabajo de tesis como parte del proyecto “Respuesta transcripcional inducida en *Arabidopsis thaliana* durante la infección por nematodos agalladores” (Proyecto No. 251671).

A todos ellos gracias.

## DEDICATORIA

*A mi familia, asesores y amigos por su apoyo,  
a Paula Itzel por ser mi mayor motivación y  
mi compañera.*

## CONTENIDO

CAPÍTULO I. Revisión de literatura .....	1
1.1 Generalidades de nematodos fitoparásitos .....	1
1.1.2 Nematodos fitoparásitos .....	3
1.2.3 Nematodos endoparásitos .....	5
1.2 Características generales de los Nematodos agalladores .....	6
1.2.1 Ciclo de vida de <i>Meloidogyne</i> spp. ....	6
1.2.2 Ciclo de vida de <i>Nacobbus aberrans</i> .....	9
1.3 Cambios transcripcionales inducidos por <i>Meloidogyne</i> spp. y <i>Nacobbus aberrans</i> .....	10
1.4 Interacción compatible e incompatible planta-nematodo.....	12
1.5 Respuesta a patogénesis .....	13
1.5.1 Inducción de respuesta sistémica .....	14
1.6 Ácido salicílico en la respuesta a patogénesis .....	15
1.6.1 Síntesis del ácido salicílico .....	16
1.6.2 Regulación de la biosíntesis del ácido salicílico .....	18
1.6.3 Respuesta de defensa mediada por ácido salicílico.....	19
1.6.4 Proteínas de respuesta a patogénesis asociadas a la ruta del ácido salicílico .....	21
1.6.5 Participación de ácido salicílico y PRs en la interacción planta-nematodo....	22
1.7 REFERENCIAS .....	24
CAPÍTULO 2. Cambios transcripcionales de genes de defensa dependientes de ácido salicílico inducidos en <i>A. thaliana</i> durante la infección por nematodos agalladores ..	33
2.1 INTRODUCCIÓN.....	33
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
2.2.1 Material vegetal .....	35
2.2.2 Inóculo de <i>M. incognita</i> , <i>M. enterolobii</i> y <i>N. aberrans</i> .....	35
2.2.3 Infección de plantas de <i>A. thaliana</i> por los nematodos agalladores .....	36

2.2.4 Crecimiento de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> infectada por nematodos agalladores.....	37
2.2.5 Expresión de PRs en plántulas de <i>A. thaliana</i> inducidos por nematodos agalladores.....	38
2.2.6 Extracción de RNA, síntesis de cADN y PCR en tiempo real.....	39
2.2.7 Análisis estadístico .....	40
2.3 RESULTADOS .....	41
2.3.1 Infektividad y desarrollo de nematodos agalladores.....	41
2.3.2 Agallamiento de nematodos agalladores sobre plántulas de <i>A. thaliana</i> .....	45
2.3.3 Crecimiento vegetal de plántulas de <i>A. thaliana</i> infectadas por nematodos agalladores.....	45
2.3.4 Expresión de PRs asociados a la ruta del ácido salicílico en raíz de plántulas de <i>A. thaliana</i> infectadas con nematodos agalladores .....	47
2.3.5 Expresión de PRs asociados a la ruta del ácido salicílico en follaje de plántulas de <i>A. thaliana</i> infectada con nematodos agalladores.....	49
2.4 DISCUSIÓN.....	52
2.5 CONCLUSIÓN.....	61
2.6 REFERENCIAS .....	62



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de alimentación del infraorden Tylenchomorpha basada en ADN ribosómico .....	4
Figura 2. Ciclo de vida general del género <i>Meloidogyne</i> .....	8
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Nacobbus aberrans</i> .....	10
Figura 4. Rutas de síntesis del ácido salicílico.....	17
Figura 5. Infectividad de nematodos agalladores sobre <i>A. thaliana</i> .....	43
Figura 6. Porcentaje de estadios presentes en raíces de <i>A. thaliana</i> a diferentes tiempos post-inoculación con nematodos agalladores.....	44
Figura 7. Imágenes representativas de estadios observados de nematodos agalladores en raíces de <i>A. thaliana</i> .....	45
Figura 8. Agallamiento inducido por nematodos agalladores en plántulas <i>A. thaliana</i> infectada con nematodos agalladores.....	46
Figura 9. Efecto sobre crecimiento de <i>A. thaliana</i> en respuesta a infección por nematodos agalladores.....	47
Figura 10. Expresión relativa de genes marcadores de resistencia local asociados a la ruta del ácido salicílico en raíz de <i>A. thaliana</i> .....	49
Figura 11. Expresión relativa de genes marcadores de RSA asociados a la ruta del ácido salicílico en follaje de <i>A. thaliana</i> .....	51

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ensayo de infectividad de nematodos agalladores sobre <i>A. thaliana</i> infectadas.....	38
Tabla 2. Ensayo de desarrollo de <i>A. thaliana</i> infectada con nematodos agalladores.....	39
Tabla 3. Tratamientos para los análisis de expresión en <i>A. thaliana</i> infectadas con nematodos agalladores.....	40
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para en análisis de expresión de <i>A. thaliana</i> .....	41

## RESUMEN

Los nematodos fitoparásitos son uno de los principales problemas dentro de la agricultura, debido a las diversas afecciones que éstos ocasionan en cultivos de interés comercial, siendo las especies del género *Meloidogyne* y la especie *Nacobbus aberrans*, de las más importantes, al inducir cambios fisiológicos, morfológicos y transcripcionales en la planta huésped, entre los cuales se encuentran los mecanismos de defensa. Siendo el ácido salicílico una de las principales fitohormonas implicadas en los procesos de defensa contra organismos biotróficos. En este sentido el objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios transcripcionales de genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) dependientes de ácido salicílico, durante la interacción de *Arabidopsis thaliana* con *Meloidogyne enterolobii*, *M. incognita* y *N. aberrans*. Para cumplir con este objetivo, se evaluó el proceso de infección de las tres especies de nematodos en plántulas de *A. thaliana*, las cuales fueron inoculadas con larvas en estadio J2, a los 2, 7, 14 y 30 días después de la inoculación (ddi), se determinó el número total de nematodos y el porcentaje de cada estadio, número de agallas y biomasa. Así mismo, se analizó la expresión génica relativa de *PR1*, *PR2* y *PR3*, mediante PCR en tiempo real (RT-qPCR) a los 2, 7 y 14 días después de la inoculación para las tres especies de nematodos. Los resultados permitieron conocer el desarrollo larval de *M. incognita*, *M. enterolobii* y *N. aberrans* presentes en *A. thaliana*, predominando los estadios J2 a los 2 ddi y J3 a los 7 ddi para las tres especies de nematodos, sin embargo, se observó un desarrollo diferencial de las especies probadas en días posteriores, predominando el estadio J4 para las especies de *Meloidogyne* y J3 para *N. aberrans* a los 14 ddi, mientras que a los 30 ddi se encontraron principalmente hembras adultas y J4 en los tratamientos de *M. enterolobii* y *M. incognita*, y J4 para el caso de *N. aberrans*, siendo *M. enterolobii* la especie que presentó mayor virulencia y agresividad con respecto a *M. incognita*, al presentar una mayor número de individuos y agallas, por su parte *N. aberrans* no logró concluir su ciclo al observarse solo individuos en estadio J4, por lo cual, éste presenta una interacción incompatible con *A. thaliana*. Aunado a esto, los análisis de expresión de *PR1*, *PR2* y *PR5* demuestran que estos genes se expresan en el tejido radical en etapas tempranas (2 ddi) y se reprimen en etapas tardías de la infección (14 ddi),

donde *M. enterolobii* presenta una mayor capacidad para reprimir la expresión de genes como *PR5*, al expresarse 18.5 veces más con respecto al nivel basal a los 2 ddi y reducir sus niveles 2.5 veces a los 7 ddi de forma local, de forma sistémica *M. enterolobii* reprime el gen *PR1* desde etapas tempranas la infección (2 ddi), lo cual puede estar asociado con una mayor capacidad de penetración y reproducción en las raíces de *A. thaliana*, en el caso *N. aberrans* se observó la expresión de *PR1* y *PR2* de forma local a los 14 ddi y la expresión *PR2* de forma sistémica, por lo cual *PR2* puede estar implicado en la defensa en etapas tardías de la infección (14 ddi) impidiendo el establecimiento del nematodo. Los resultados muestran que *M. enterolobii* presenta una mayor capacidad para suprimir los genes de defensa asociados a la ruta del ácido salicílico, lo cual puede estar asociado con una mayor patogenicidad y virulencia en comparación con *M. incognita*; en contraste con *N. aberrans*, donde la expresión de *PR2* puede estar limitando el establecimiento del nematodo, dando lugar a una interacción incompatible.

*Palabras clave: Meloidogyne, Nacobbus aberrans, interacción compatible, modificaciones transcripcionales, proteínas relacionadas con patogénesis.*

## ABSTRACT

The phytoparasitic nematodes are one of the main problems within agriculture, due to the diverse affections that they cause in crops of commercial interest, being the species of the genus *Meloidogyne* and *Nacobbus aberrans*, of the most important. This species inducing physiological, morphological and transcriptional changes in the host plant, among which are the defense mechanisms, where the salicylic acid is one of the main phytohormones involved in defense processes against biotrophic organisms. In this sense, the objective of this work was evaluated the transcriptional changes of genes that encode for Pathogenesis-Related Proteins (PRs) dependent of salicylic acid, during the interaction of *M. enterolobii*, *M. incognita* and *N. aberrans* with *A. thaliana*. To achieve this goal, the infection process of the three nematode species in *A. thaliana* was evaluated, inoculating the *A. thaliana* seedling with J2 stage larvae, at 2, 7, 14 and 30 days after inoculation (dai), where the total number of nematodes, percentage of each stage, number of galls and biomass were determined. In the same way, the relative gene expression of *PR1*, *PR2* and *PR3* was analyzed by real-time PCR (RT-qPCR) at 2, 7 and 14 dai for the three species of nematodes. The results shown larval development of *M. incognita*, *M. enterolobii* and *N. aberrans* was observed in *A. thaliana* seedlings, predominating J2 stage at 2 dai and J3 at 7 dai for the three species of nematodes tested. However, a differential development was observed at 14 dai where the larval stage J4 for *Meloidogyne* species and J3 for *N. aberrans* predominated at 14 dai, while at 30 dai were found mainly adult females and J4 in *M. enterolobii* and *M. incognita* treatments, and J4 for *N. aberrans* treatment, where *M. enterolobii* presented higher virulence and aggressiveness with respect to *M. incognita*, presenting a higher number of individuals and galls, on the other hand, *N. aberrans* presents an incompatible interaction with *A. thaliana*. In addition to this, *PR1*, *PR2* and *PR5* expression assays shown that these genes are expressed in the radical tissue in early stages (2 dai) and were repressed during late stages of infection (14 dai), where *M. enterolobii* presents a higher ability to repress the expression of genes like *PR5*, expressing 18.5 times more with respect to the basal level at 2 dai and reducing its levels 2.5 times at 7 dai locally, systemically *M. enterolobii* represses *PR1* expression in early stages of infection (2 dai), this may be associated with a greater penetration

and reproduction capacity in *A. thaliana* roots, in the case of *N. aberrans*, the expression of *PR1* and *PR2* was observed locally while *PR2* expression was systemic at 14 dai, whereby *PR2* could be involved in the defense mechanism during late stages of infection (14 dai) impeding the establishment of the nematode. The results show that *M. enterolobii* has a greater capacity to suppress defense genes associated with the salicylic acid route, this may be associated with a greater pathogenicity and virulence compared to *M. incognita*. While in the *N. aberrans* case, the expression of *PR2* may be limiting the establishment of the nematode, resulting in an incompatible interaction.

*Key words: Meloidogyne, Nacobbus aberrans, compatible interaction, transcriptional modifications, Pathogenesis-Related Proteins.*

## CAPÍTULO I. Revisión de literatura

### 1.1 Generalidades de nematodos fitoparásitos

Los nematodos son considerados uno de los principales problemas dentro de la agricultura, debido a los daños que éstos ocasionan en los cultivos de interés comercial, causando pérdidas de aproximadamente 80 mil billones de dólares por año (Jones *et al.*, 2013). Estos fitoparásitos pueden dividirse en dos grandes grupos: en ecto y endoparásitos, los cuales pueden presentar estilos de vida migratorios o sedentarios, siendo los nematodos endoparásitos sedentarios los que mayores pérdidas ocasionan, debido a cambios fisiológicos, morfológicos y transcripcionales que éstos provocan en la planta hospedera, reduciendo la producción. Dentro de este grupo encontramos a los nematodos formadores de quistes y los nematodos agalladores, destacando estos últimos por ser los que ocasionan las mayores pérdidas (Jones *et al.*, 2013).

Los nematodos agalladores pertenecientes al género *Meloidogyne*, se caracterizan por estar ampliamente distribuidos y contar con un aproximado de 1,700 plantas hospederas, siendo *M. incognita*, *M. hapla*, *M. javanica* y *M. arenaria*, las principales especies de este género (Hidalgo *et al.*, 2014; Ramírez-Suárez *et al.*, 2014; b Pinheiro, *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2015). Sin embargo, la especie *M. enterolobii* ha adquirido importancia en los últimos años, debido a su alta agresividad y virulencia, al poseer la capacidad de infectar plantas que presentan resistencia contra las principales especies del género *Meloidogyne*, entre las que se encuentran variedades de *Solanum lycopersicon* y *Capsicum annuum*, que presentan el gen de resistencia *Mi-1* (Kiewnick *et al.*, 2009). Otra especie que ha adquirido gran relevancia es *Nacobbus aberrans*, la cual es altamente agresiva al necrosar el tejido radical de la planta hospedera durante su fase migratoria (Jones *et al.*, 2013; Cabrera *et al.*, 2014). Ambas especies inducen cambios en los mecanismos de defensa de la planta, permitiendo así que el nematodo se desarrolle (Wubben *et al.*, 2008; Villar-Luna *et al.*, 2009; Cabrera *et al.*, 2017).

Los mecanismos de defensa de las plantas son regulados por diferentes fitohormonas, siendo el ácido jasmónico, el etileno y el ácido salicílico, las principales fitohormonas involucradas en los mecanismos de defensa (Pieterse *et al.*, 2009; Govere y Smant, 2014). El ácido salicílico ha demostrado estar involucrado en la defensa contra organismos biotróficos, a través de la activación de la respuesta hipersensible y la resistencia sistémica adquirida, participando en la defensa contra nematodos como *Heterodera schachtii* y *Meloidogyne incognita* en especies del género *Solanum* (Solano *et al.*, 2013; Martínez-Medina *et al.*, 2016). Siendo *PR1*, *PR2* y *PR5* los principales genes marcadores de resistencia sistémica adquirida asociados a la ruta del ácido salicílico, los cuales se expresan durante etapas tempranas de la infección y son reprimidos en etapas tardías en raíces de *Arabidopsis thaliana*, infectadas con *M. incognita* y *H. schachtii* condicionados por una interacción compatible. Sin embargo, el comportamiento de la expresión de estos genes en follaje como respuesta sistémica, no está del todo claro, ya que estos genes se expresan diferencialmente, en diversos estudios realizados (Hamamouch *et al.*, 2011; Hamamouch *et al.*, 2012; Molinari *et al.*, 2014; Kammerhofer *et al.*, 2015). La activación de los mecanismos de defensa asociados a la ruta del ácido salicílico están condicionados por el tipo de interacción que la planta hospedera presenta con el fitopatógeno (Jones y Dangl, 2006; Pieterse *et al.*, 2009). En una interacción compatible los genes involucrados en los mecanismos de defensa son reprimidos y las barreras de defensa son activadas durante las primeras etapas de infección, en contraste con una interacción incompatible donde los genes asociados a los mecanismos de defensa son sobre-expresados por tiempos prolongados, limitando el desarrollo del nematodo (Branch *et al.*, 2004; Jones y Dangl, 2006; Kyndt *et al.*, 2012). Sin embargo, la manipulación de los mecanismos de defensa por parte del nematodo en una interacción compatible puede darse a distintos niveles y etapas del desarrollo de la infección, modificando los mecanismos de defensa durante el proceso de migración, la inducción de los sitios especializados de alimentación y durante las mudas de los diferentes estadios, como resultado de los cambios en los efectores producidos por los nematodos en etapas específicas de desarrollo (Wubben *et al.*, 2011; Govere y Smant, 2014; Hewezi y Baun, 2014).



### 1.1.2 Nematodos fitoparásitos

En la actualidad los nematodos son considerados entre los grupos principales de fitopatógenos en la agricultura (Agrios, 2005), hasta el año 2013 se identificaron alrededor de 4,100 especies de nematodos que parasitan distintas especies de plantas, dentro de las cuales se encuentran los cultivos de interés comercial, esto con base en los diferentes reportes de nematodos fitoparásitos en cultivos agrícolas (Jones *et al.*, 2013).

Los nematodos son organismos pluricelulares, clasificados dentro del phylum Nematoda, los cuales se dividen en la clase Chromadorea y Enoplea, subclase Chromadoria, Dorylaimia y Enoplia, orden Rhabditida, Dorylaimida y Enoplida (Bert *et al.*, 2011). Son organismos no segmentados, ampliamente distribuidos en los diferentes ecosistemas del planeta, producto de su capacidad de adaptación a ambientes extremos, lo que les ha permitido el desarrollo de diversos estilos de vida que van desde organismos de vida libre a especies parasitas (Bert *et al.*, 2011; Escobar *et al.*, 2015).

Como resultado de sus diferentes estilos de vida y de alimentación, los nematodos son capaces de alimentarse de bacterias, hongos y parasitar distintas especies de plantas y animales (Agrios, 2005). Sin embargo, en la agricultura los más importantes son aquellos afectan a plantas de interés económico, los cuales presentan diferentes estilos de vida y alimentación (Hewezi y Baun, 2017). Filogenéticamente, los nematodos fitoparásitos de acuerdo con Bert *et al.* (2011), se encuentran principalmente distribuidos dentro de los infraordenes *Tylenchomorpha*, *Dorylaimida*, *Triplonchida*, siendo el infraorden *Tylenchomorpha* perteneciente al suborden *Tylenchina* donde se encuentran los nematodos fitoparásitos de mayor interés económico (Fig. 1), los cuales pueden presentar un comportamiento ecto y endoparásito de acuerdo estilo de alimentación; sedentarios y migratorios de acuerdo a sus estilos de vida, siendo los nematodos endoparásitos los que mayores pérdidas causan dentro de la agricultura (Bert *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2015).

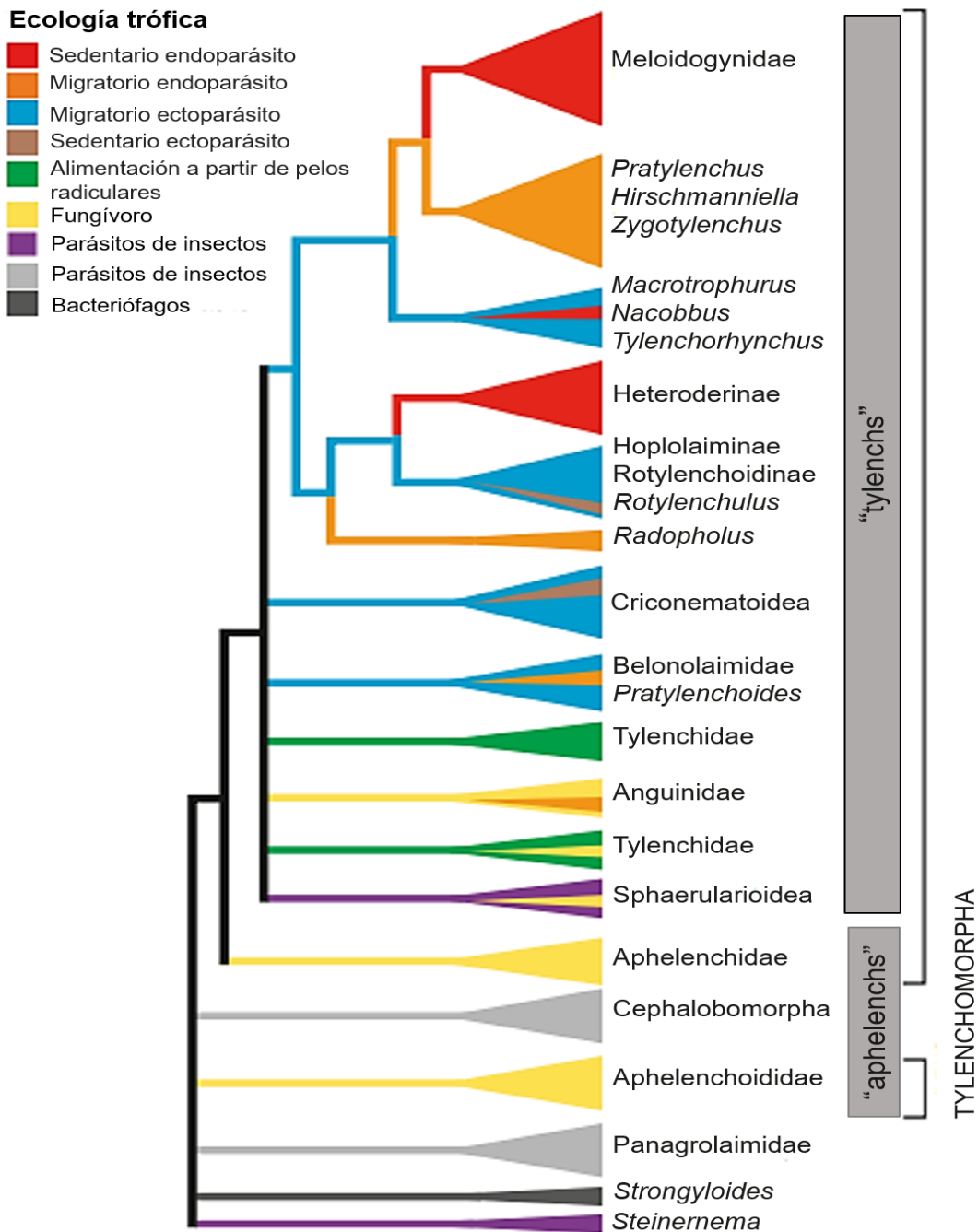


Figura 1. Evolución de alimentación del infraorden *Tylenchomorpha* basada en ADN ribosómico (Bert *et al.*, 2011).

### 1.2.3 Nematodos endoparásitos

Los nematodos endoparásitos afectan frecuentemente el sistema radicular, donde producen daños extensos tales como lesiones y necrosis. Como consecuencia de la infección, las partes de las plantas se pueden ver alteradas, mostrando un crecimiento reducido, clorosis foliar, rendimiento pobre y marchitamiento. Las pérdidas de los cultivos son a veces subestimadas debido a que los síntomas en la planta después de la infección son inespecíficos y pueden identificarse erróneamente como resultado de deficiencias nutricionales o estrés abiótico (Jones *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2015).

Los nematodos endoparásitos pueden ser de dos tipos: a) migratorios, dentro de los cuales se encuentran las especies pertenecientes a los géneros *Radopholus*, *Pratylenchus* y *Hirschmanniella*, los cuales migran al interior del sistema radicular destruyendo las células de la planta huésped, una vez dentro, se alimenta del citoplasma de las células sin establecerse en un sitio específico de alimentación, b) especies como las pertenecientes al género *Meloidogyne*, *Globodera* y *Heterodera* presentan estilos de vida sedentarios, una vez que se introducen en la raíz del hospedero éstos completarán su ciclo dentro de ésta, induciendo sitios especializados de alimentación (Holbein *et al.*, 2016).

Los nematodos agalladores pertenecientes al género *Meloidogyne* son de los más devastadores, debido a los cambios fisiológicos y morfológicos que éstos provocan en la planta hospedera. Este grupo se encuentra dentro de la super familia Tylenchoidea, familia Heteroderidae y sub familia Heteroderinae (Abad y Williamson, 2010; Holbein *et al.*, 2015). Entre los nematodos agalladores se pueden considerar a las especies del género *Nacobbus*, que se clasifica en la super familia Tylenchoidea familia Pratylenchidae y sub familia Nacobbinae (Escobar *et al.*, 2015). Las especies de este género son denominadas como falsos nematodos agalladores, ya que los síntomas que éstos provocan en la planta hospedera son similares a los ocasionados por las especies del género *Meloidogyne* (López-Manzanilla *et al.*, 2002; Eves-van den Akker *et al.*, 2014).

## 1.2 Características generales de los Nematodos agalladores

Los nemátodos del género *Meloidogyne* son considerados los más devastadores fitopatógenos debido a que causan pérdidas que van del 5 al 12 % del total reportado en todo el mundo (Yang *et al.*, 2015). Este género se encuentra ampliamente distribuido, lo que ha permitido que sea capaz de infectar a 1,700 especies de plantas; entre ellas cultivos de interés comercial, siendo *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla*, las especies de mayor importancia dentro de este género (Jones *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2013; Truong *et al.*, 2015).

En los últimos años la especie *M. enterolobii* ha adquirido gran interés dentro de la agricultura por su distribución geográfica, su número de hospederos, su alta agresividad además de que posee la capacidad infectar fenotipos de plantas que poseen genes de resistencia como *Mi-1*, *Mh*, *Mir1*, *N*, *Tabasco* y *Rk*, los cuales son efectivos contra las principales especies de *Meloidogyne* (Ye *et al.*, 2015; b Pinheiro *et al.*, 2015; Villar-Luna *et al.*, 2016). Evaluaciones llevadas a cabo en cultivares de tomate y chile, con presencia dominante del gen *Mi-1*, el cual confiere resistencia contra las principales especies del género *Meloidogyne*, demostraron que *M. enterolobii* es capaz de infectar a los nueve cultivares evaluados, con variaciones en la virulencia y capacidad infectiva (Kiewnick *et al.*, 2009). Dentro del territorio mexicano, *M. enterolobii* ha sido reportado en los estados Sinaloa y Veracruz, en donde se han encontrado parasitando cultivos de tomate, chile y sandía, reduciendo su rendimiento y causando pérdidas en la producción de estos cultivos (Ramírez-Suárez *et al.*, 2014; Martínez-Gallardo *et al.*, 2016; Villar-Luna *et al.*, 2016).

### 1.2.1 Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp.

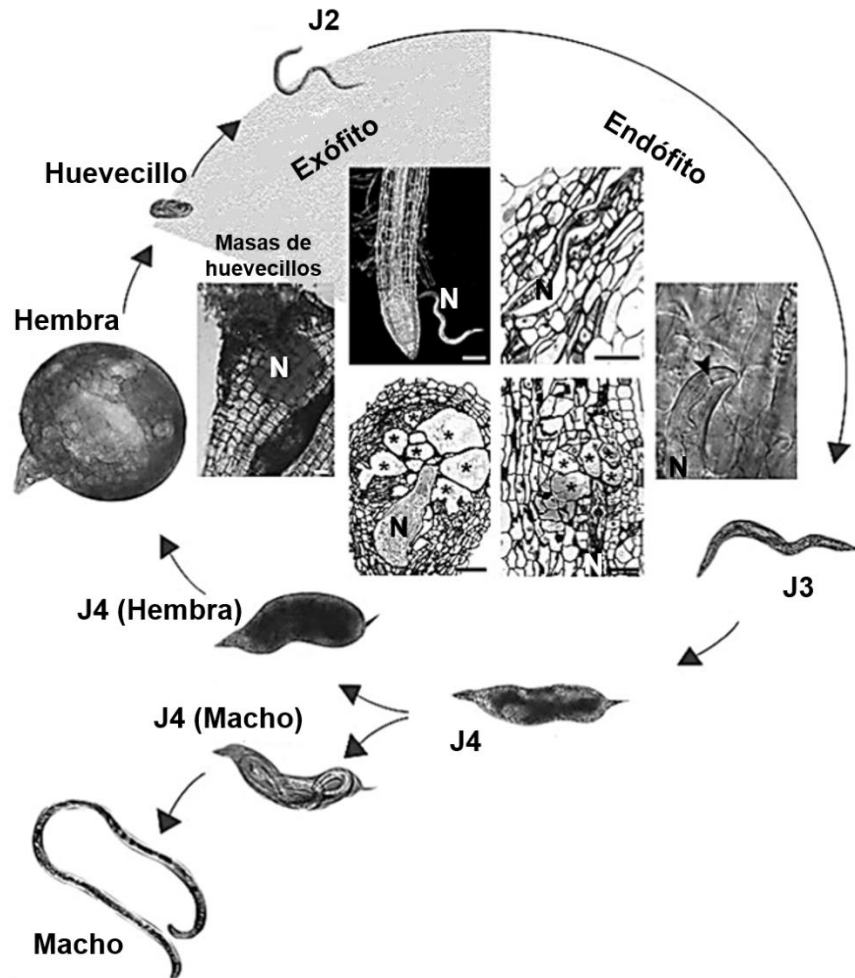
El proceso de infección comienza con el reconocimiento de la planta hospedera por parte de la larva en estadio J2, favorecido por diferentes compuestos producidos por la planta como atrayentes, entre los que se encuentran el CO<sub>2</sub>, aminoácidos, polisacáridos y metabolitos secundarios, los cuales son secretados por la planta y

algunos de los cuales son detectados aun a largas distancias (Teillet *et al.*, 2013; Goverse y Smant, 2014; Hewezi y Baun, 2017).

Una vez ubicada la planta hospedera, el nematodo penetra la raíz por parte del estadio J2, esto mediante el uso de estilete contra la epidermis del hospedero, así como por la excreción de enzimas con actividad lítica como celulasas (Truong *et al.*, 2014). Una vez que el J2 ha penetrado la raíz, éste se abre paso entre las células hasta llegar al ápice o zona meristemática, comportamiento que se atribuye a que la banda de Caspary representa una barrera, la cual no puede ser penetrada por el estilete, por lo cual se ve obligado a migrar a una zona donde este pueda penetrar con mayor facilidad (Abad *et al.*, 2008; Abad y Williamson, 2010; Truong *et al.*, 2015).

Una vez en el ápice de la raíz el J2 se introduce al tejido vascular de la planta a través del espacio intercelular, una vez dentro de tejido vascular migra a la zona de diferenciación, donde selecciona entre cinco y siete células del tejido parenquimatoso, induciendo la transformación de dichas células a una forma denominada células gigantes, las cuales proporcionarán alimento al nematodo hasta alcanzar su etapa adulta (Fig. 2) (Abad y Williamson, 2010; Truong *et al.*, 2015).

Las células gigantes son células multinucleadas e hipertrofiadas, generadas por múltiples divisiones nucleares y crecimiento celular pero sin llegar a una división celular, esto es logrado por los nematodos agalladores a través de la secreción de diferentes proteínas denominadas efectores como el 16D10 que interactúa con factores transcripcionales o SKP1 que son proteínas de unión a actina o tubulina e histonas H3, H2a y H2b, las cuales son introducidas en las células del huésped a través de su estilete (Truong *et al.*, 2015). El desarrollo de estas células interfiere en el transporte de nutrientes al bloquear los tejidos vasculares de la planta, por lo cual la planta se ve afectada en la toma y adquisición de agua así como de nutrientes, lo que provoca efectos negativos sobre el desarrollo y crecimiento de la planta hospedera (Abad y Williamson, 2010; Hewezi y Baun, 2017).



**Figura 2. Ciclo de vida general del género *Meloidogyne*.** Estadios fuera del hospedero huevecillo, J2 y Macho, estadios dentro del hospedero J2, J3 y J4, hembra (Abad *et al.*, 2008).

Una vez inducida la formación de células gigantes, los nematodos permanecen en la zona de alimentación de dos a tres semanas dependiendo de la temperatura y la planta huésped, donde pasan a un estadio de J3 y J4 hasta alcanzar su estado adulto (Escobar *et al.*, 2015). A lo largo de su desarrollo los nematodos suelen mantener una forma vermiforme, la cual es parecida a la de un gusano. Sin embargo, en varias especies de nematodos, como las que se encuentran dentro del género *Meloidogyne*, las hembras adultas adoptan cuerpo hinchado en forma de pera, la cual excreta varios cientos de huevos sobre la superficie de la raíz, que tienen la apariencia de una masa gelatinosa, dentro de cada huevo el nematodo pasa de una etapa embrionaria a un

estadio J1 y J2, el cual sale del huevo para dar lugar al inicio de un nuevo ciclo de vida (Fig. 2) (Truong *et al.*, 2015; Escobar *et al.*, 2015).

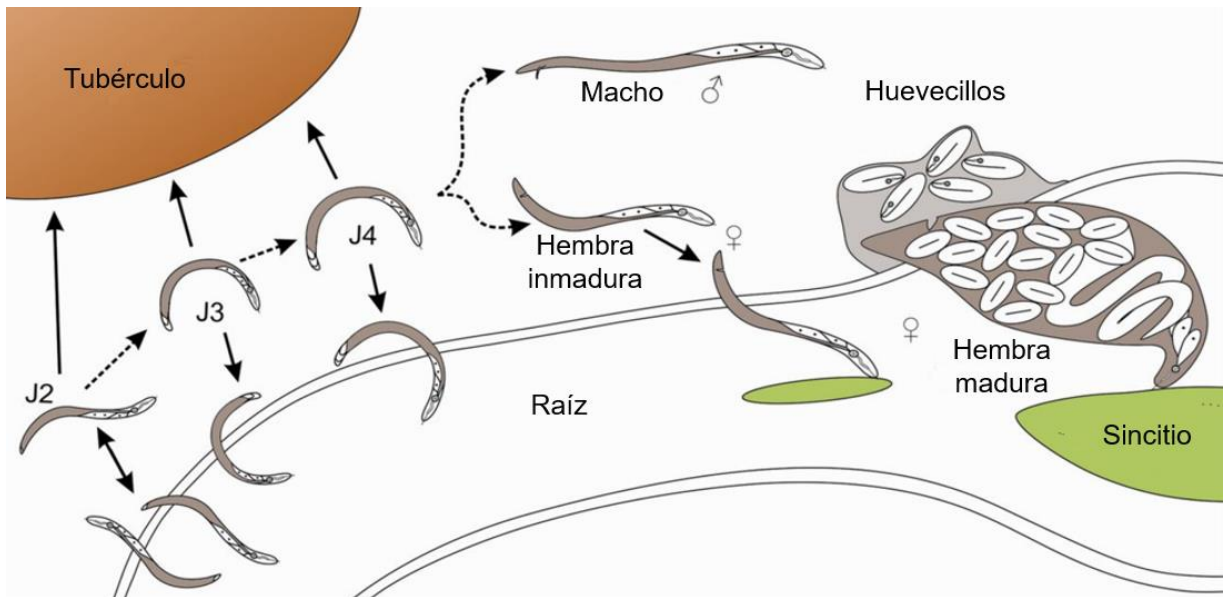
### 1.2.2 Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans*

*N. aberrans* una especie originaria del sur de América, la cual se distribuyó posteriormente al resto de América, Asia y Europa (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Actualmente, *N. aberrans* ataca a 84 especies vegetales de interés comercial dentro de la agricultura distribuidas en 18 familias principalmente del género *Solanum*, *Capsicum* y *Phaseolus*, se han registrado pérdidas de hasta 65 % en *Solanum tuberosum* en Sudamérica, mientras que para el territorio mexicano se ha reportado el 55 y 36 % de pérdidas para *Solanum lycopersicum* y *Phaseolus vulgaris*, respectivamente (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Eves-van den Akker *et al.*, 2014; Sosa *et al.*, 2018). En México se ha reportado su presencia en los estados de Coahuila, Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí, Tlaxcala y Zacatecas, donde se ha encontrado asociado principalmente a los cultivos de chile (*Capsicum annuum*), tomate (*Physalis ixocarpa*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Hidalgo *et al.*, 2014).

El proceso de infección de *N. aberrans* se da a través de las raíces de las plantas huésped, alojándose en los tejidos vasculares de forma similar a las especies del género *Meloidogyne* (López-Manzanilla *et al.*, 2002). Sin embargo, esta especie se caracteriza porque durante sus estadios juveniles J2, J3, J4 e incluso las hembras inmaduras, presentan estilos de vida migratorios, durante su proceso de migración hacia los tejidos vasculares, éste causa la necrosis de las células ya que a diferencia de las especies de *Meloidogyne* la especie *N. aberrans* viaja vía intracelular causando la muerte celular (Fig. 3), siendo los estadios J3 y J4 las etapas que le permiten al nematodo sobrevivir por largos periodos de tiempo en ausencia de alimento y agua (López-Manzanilla *et al.*, 2002). Además, presenta un estilo de vida sedentario y endoparásito dependiendo del estadio en el que se encuentre, se caracteriza por generar agallas en los tejidos radiculares parasitados como resultado de la inducción

y desarrollo del sitio especializado de alimentación (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Manzanilla-López, 2010; Cabrera *et al.*, 2017).

Dentro de las agallas, se establecen una o varias hembras estrechamente asociadas a un sincitio (estructura producto de la fusión celular de dos o más células), inducido por la hembra inmadura a través de enzimas esofágicas, éste es el sitio de alimentación del parásito a partir de cual obtiene todos los nutrientes para su desarrollo a costa de la planta hospedera, limitando el desarrollo y crecimiento de la planta (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Cabrera *et al.*, 2017).



**Figura 3. Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans*.** Su ciclo de vida se caracteriza por presentar dos fases una migratoria y otra sedentaria. La fase migratoria la presentan los estadios larvales J2, J3, J4 e incluso la hembra inmadura. La hembra inmadura induce el sitio especializado de alimentación, la cual excretará masas de huevecillos, donde el nematodo pasará de su etapa embrionaria a un estadio J1 seguido un estadio J2 el cual rompe el huevecillo iniciando un nuevo ciclo (Eves-van den Akker *et al.*, 2014).

### 1.3 Cambios transcripcionales inducidos por *Meloidogyne* spp. y *Nacobbus aberrans*

Durante el proceso de infección la planta experimenta una variedad de cambios metabólicos incluyendo aumentos en la cantidad de reguladores de crecimiento de la



planta, proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos, entre otros, además también hay cambios en la actividad de las enzimas implicadas en las vías metabólicas (Jammes *et al.*, 2005). Los cambios fisiológicos y bioquímicos que experimenta la planta hospedera son producto de un cambio en el patrón de expresión génica de la planta como resultado de la interacción planta-nematodo (Godínez-Vidal *et al.*, 2013).

En el proceso de infección por parte de especies del género *Meloidogyne* y en el proceso de formación del sitio especializado de alimentación se dan una serie de cambios transcripcionales (Escobar *et al.*, 2015). Entre los procesos que son modificados por el nematodo se encuentran la reprogramación del metabolismo, ciclo celular, transporte de nutrientes, mecanismos de defensa, niveles de hormonas entre algunos otros procesos (Jammes *et al.*, 2005; Abad y Williamson, 2010). Especies como *M. graminícola* y *M. incognita*, inducen en etapas tempranas de la infección en *Oryza sativa* y *Arabidopsis thaliana* respectivamente, una sobreexpresión de genes relacionados con el transporte de nutrientes y metabolismo celular, mientras que los genes involucrados en la respuesta de las plantas asociados a fitohormonas como el ácido salicílico, ácido jasmónico y etileno, fueron reprimidos (Jammes *et al.*, 2005; Kyndt *et al.*, 2012).

Durante la interacción compatible de *Arabidopsis thaliana* con *Meloidogyne javanica*, la mayoría de los genes expresados diferencialmente se regularon en el sitio especializado de alimentación (Escobar *et al.*, 2015). Además, se comprobó que los nematodos fitoparásitos pueden suprimir genes que codifican para enzimas como la fenilalanina-amoniaco-liasa (PAL), la cual está implicada en los mecanismos de defensa de las plantas al participar en la ruta de síntesis de compuestos fenólicos como fitoalexinas, que participan en la defensa del hospedero durante la interacción planta-patógeno, además esta enzima participa en una de las dos vías de síntesis de ácido salicílico (Escobar *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015).

En el caso de *N. aberrans*, se ha demostrado que, durante una interacción compatible, tiene la capacidad de modificar la fisiología y morfología de su hospedero, así como

los mecanismos de defensa, facilitando el desarrollo de la infección y la entrada de otros patógenos (López-Manzanilla *et al.*, 2002). En estudios realizados en *C. annuum* CM-334 resistente a *Phytophthora capsici*, se observó que durante el proceso de infección de *N. aberrans*, los genes asociados a la ruta del mevalonato (Ruta MEV) fueron modificados en CM-334, donde se observó que los genes *HMG2* y *HMG1* (implicados en la síntesis de fitoalexinas) fueron expresados diferencialmente durante la infección con 2,000 J2 de *N. aberrans* (Godinez-Vidal *et al.*, 2013). Esto mismo fue observado al analizar la expresión de los genes *HMG2*, *HMG3*, *EAS* y *SS* dentro de la ruta MEV en CM-334 infectado con *N. aberrans*, observándose una disminución en la síntesis de la fitoalexina Capsidiol, tanto de forma local como sistémica, facilitando la infección de *P. capsici* sobre CM-334, en este último caso *N. aberrans* cambio a susceptible un cultivar resistente (Villar-Luna *et al.*, 2017).

#### **1.4 Interacción compatible e incompatible planta-nematodo**

El éxito de la infección por parte del nematodo está condicionado por el tipo de interacción que presente con la planta hospedera, la cual puede ser compatible o incompatible. En una interacción incompatible el desarrollo del nematodo se ve interrumpido en alguna de sus etapas, lo que impide que la infección evolucione como resultado de la rápida respuesta de defensa y con una alta amplitud. En el caso de una interacción compatible, el nematodo logra superar los mecanismos de defensa de la planta, el nematodo logra completar su ciclo en la planta hospedera, al lograr controlar los mecanismos de defensa y bajar la amplitud de las mismas (Branch *et al.*, 2004; Jones y Dangl, 2006; Abad y Williamson, 2010). El tipo de interacción está determinada por la presencia de genes de resistencia en la planta hospedera, los cuales participan en los procesos de reconocimiento y activación de la cascada de señalización, donde están involucradas las diferentes fitohormonas, que participan en la transducción de señales para desencadenar la respuesta de defensa (Li *et al.*, 2015).

## 1.5 Respuesta a patogénesis

Una de las primeras barreras de defensa es la resistencia basal denominada inmunidad inducida por patrones moleculares asociados (PAMS), donde las respuestas de defensa se activan tras el reconocimiento del patógeno a través de receptores específicos a constituyentes estructurales del patógeno, como flagelina, glicoproteínas, quitina, lipopolisacáridos, etc., activando los mecanismos de defensa del hospedero como la respuesta hipersensible o producción de fitoalexinas, limitando el desarrollo del patógeno (Jones y Dangl, 2006; Han *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015). Sin embargo, los fitopatógenos han desarrollado múltiples estrategias que les permiten evadir o suprimir los mecanismos de defensa basales, en este sentido uno de los mecanismos empleados por los nematodos fitoparásitos es la secreción de efectores, los cuales les permiten la manipulación de los mecanismos de defensa del hospedero (Goverse y Smant, 2014; Kammerhofer *et al.*, 2015; Zhuo *et al.*, 2017).

Para contrarrestar las estrategias empleadas por los fitopatógenos y evadir los mecanismos de defensa empleados por la planta, a través de patrones moleculares asociados a patógenos, los hospederos han desarrollado una segunda barrera de defensa denominada inmunidad inducida por efector (Pieterse *et al.*, 2009). La cual está determinada por la presencia de genes de resistencia (R) para la detección de efectores particulares, activando mecanismos de defensa específicos para cada patógeno (Pieterse *et al.*, 2009; Goverse & Smant, 2014; Delaunoy *et al.*, 2014).

Una vez que induce la respuesta de defensa, a través de PAMS o inducida por efectores, se desencadena la respuesta hipersensible, la producción de metabolitos con efecto antimicrobiano, la producción de proteínas de respuesta a patogénesis (PRs), el reforzamiento estructural, etc. Los mecanismos de defensa en la planta son el resultado de una superposición de ambos tipos de defensa, los cuales son regulados a través de diferentes fitohormonas que participan en la transducción de señales en las diferentes vías de señalización (Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2014).

### 1.5.1 Inducción de respuesta sistémica

La inducción de la respuesta de defensa se puede presentar de dos formas local y sistémica. La respuesta local se da en la zona de infectada por el patógeno o en tejido específico del hospedero, dando lugar a la producción de elementos de defensa como las fitoalexinas, proteínas de respuesta a patogénesis, especies reactivas de oxígeno y engrosamiento de estructuras celulares. La respuesta sistémica consiste en la inducción de defensa en tejidos no infectados, es decir, el tejido que presenta una separación especial con la zona infectada, dando lugar a la síntesis de proteínas como las PRs y compuestos como el capsidiol (Hammerschmidt, 2014; Yang *et al.*, 2015).

La inducción de respuesta de defensa sistémica se divide en dos formas principales, resistencia sistémica inducida (RSI) y resistencia sistémica adquirida (RSA) (Pieterse *et al.*, 2012). Donde la RSI es típicamente inducida por organismos benéficos, como bacterias y hongos promotores del crecimiento vegetal, los cuales se ha demostrado que proporcionan o inducen en la planta la producción de fitohormonas como auxinas y giberelinas, que están involucradas con proceso de crecimiento vegetal y en la regulación de forma negativa de fitohormonas como el ácido salicílico (Pieterse *et al.*, 2009; Pieterse *et al.*, 2012; Hammerschmidt, 2014).

Además, se ha demostrado que la resistencia sistémica inducida está asociada con la ruta del ácido jasmónico y etileno (JA-ET), se ha demostrado que estas hormonas participan en los mecanismos de defensa contra patógenos necrotróficos y herbívoros (Pieterse *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha mostrado que hormonas como el etileno y citoquininas contribuyen de forma positiva al establecimiento de la infección de especies de nematodos fitoparásitos como *Heterodera schachtii* (Wubben *et al.*, 2001; Shanks *et al.*, 2015).

La RSA es inducida por fitopatógenos, incrementado los niveles de defensa y la velocidad de respuesta de la planta contra ataques posteriores, dando lugar a la síntesis de proteínas de respuesta a patogénesis, en los tejidos distantes de la zona de infección, siendo los genes *PR1*, *PR2* y *PR5* de los principales marcadores

asociados a la RSA (Pieterse *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que esta repuesta de defensa no solo se extiende en el tejido de la planta infectada, sino a plantas vecinas a través de compuestos difusibles y compuestos volátiles producidos por la raíz de la planta hospedera (Cheol *et al.*, 2016). La RSA está asociada principalmente con los niveles de ácido salicílico presentes en la planta hospedera, ya que una reducción en los niveles de esta fitohormona, han demostrado comprometer la respuesta de defensa contra fitopatógenos como *Pseudomonas putida* y *M. incognita* (Branch *et al.*, 2004; Manosalva *et al.*, 2015; Cheol, 2017). Esto demuestra que esta fitohormona está involucrada en los mecanismos de defensa en la interacción planta-nematodo (Sijmons *et al.*, 1991; Kammerhofer *et al.*, 2015).

### **1.6 Ácido salicílico en la respuesta a patogénesis**

De forma sistemática se ha encontrado que diversos genes asociados a la ruta del ácido salicílico son altamente expresados durante la infección por nematodos en una interacción incompatible como parte de la RSA, en contraste con esto, los genes asociados a la ruta del ácido jasmónico que son reprimidos o mantienen niveles basales en plantas de *A. thaliana* infectas con *H. schachtii* (Caarls *et al.*, 2016), siendo el ácido salicílico el que juega un papel clave en los mecanismos de respuesta de defensa contra fitopatógenos biotróficos de forma local y sistemática (Zhang *et al.*, 2013; Lovelock *et al.*, 2016).

La cascada de señalización desencadenada por AS, tiene un papel clave en la activación de genes de defensa, entre los que se encuentran los que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs). Además, el AS participa en la activación de genes que intervienen con la respuesta de hipersensibilidad (RH) (Pieterse *et al.*, 2012). Este mecanismo que permite programar la muerte celular del tejido cercano a la zona de infección durante interacción planta patógeno, mediante la supresión de la actividad de la enzima catalasa. Lo que permite el incremento de especies reactivas oxígeno (ROS), causando la necrosis del tejido limitando el avance y desarrollo del patógeno, evitando de esta manera su propagación (Sánchez *et al.*,

2003; Pieterse *et al.*, 2009; Lu, 2016 (Caarls, Pieterse, & Van Wees, 2016)). Además de participar en la inducción de RNA de interferencia, como parte de los mecanismos de defensa contra RNA patógenos (Campos *et al.*, 2014).

El AS puede ser regulado a través de otras fitohormonas implicadas en los mecanismos de defensa, como la ruta del ácido jasmónico-etileno (AJ/ET), esto mediante una interacción antagónica entre ambas vías. Pues genes como el *WRK70* y *MPK4* que conectan ambas rutas de defensa de la planta, demuestran que existe un antagonismo (Sánchez *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que fitohormonas como las auxinas, citoquininas y ácido abscísico, regulan de forma negativa la ruta de defensa dependiente de ácido salicílico (Pieterse *et al.*, 2009; Solano y Gimenez-Ibanez, 2013; Yang *et al.*, 2015).

### **1.6.1 Síntesis del ácido salicílico**

La síntesis de ácido salicílico presenta dos vías de síntesis (Fig. 4), vía isocorismato sintetasa (ICS/SID2) y vía fenilalanina amonio liasa (PAL) (Pieterse *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2013). Ambas rutas de síntesis están altamente conservadas en diversas especies vegetales, lo que demuestra la importancia de estas dos rutas para la regulación de diversos procesos, entre los que se encuentra la respuesta de defensa durante la interacción planta-patógeno (Yang *et al.*, 2015; Seyfferth y Tsuda, 2016). Sin embargo, la ruta de síntesis del isocorismato está relacionada con más del 90 % de las repuestas de la planta a condiciones de estrés, indicando una mayor participación de esta ruta en los procesos de defensa durante la interacción planta-patógeno (Kumar, 2014; Shah *et al.*, 2014).



de *Oryzae sativa* con *M. graminicola*, se expresan genes asociados a ambas rutas (Kumari *et al.*, 2016).

### 1.6.2 Regulación de la biosíntesis del ácido salicílico

La biosíntesis de ácido salicílico está estrictamente regulada, pues a pesar de que éste es de vital importancia en las rutas de respuesta de defensa contra fitopatógenos, la acumulación de esta fitohormona en la planta tiene efectos negativos en el comportamiento de la planta, por lo cual, su biosíntesis debe estar altamente regulada (Kumar, 2014). Diversos estudios demuestran que el control transcripcional de la ICS1 esta mediado por el calcio, por lo cual este elemento juega un papel clave en la regulación de esta enzima. El aumento de concentración de  $Ca^{2+}$  en el interior de la célula, es decodificada por proteínas sensibles a  $Ca^{2+}$ , como las calmodulinas (CaM) y proteínas cinasas dependientes de  $Ca^{2+}$  (CDPKs) (Seyfferth y Tsuda, 2016). Sin embargo, se ha planteado que nematodos como *M. incognita* durante su fase migratoria J2, excretan efectores como la calreticulina (CRT) Mi-CRT, la cual puede actuar como quelante de  $Ca^{2+}$  bloqueando la ruta de síntesis del ácido salicílico vía ICS (Jaouannet *et al.*, 2013).

La unión de  $Ca^{2+}$  a CaM regula la actividad de este ión en las rutas de señalización, regulado la actividad corriente abajo (Kumar, 2014). Esto ha sido determinado en plantas de *Arabidopsis*, donde el factor de transcripción CBP60g (Calmodulin Binding Protein 60g) dependiente de la unión de CaM y su homólogo SARD1 (Systemic Acquired Resistance Deficient 1) controlan la transcripción de *ICS1* que codifica para la proteína isocorismato sintetasa (Kumar, 2014). No obstante, se ha demostrado CaM regula la función del factor CBP60g, mientras SARD1 es independiente de CaM (Seyfferth y Tsuda, 2016).

A pesar de que la regulación de CBP60g y SARD1 es diferencial, ambas proteínas participan en la expresión de *ICS1* y por lo tanto en la acumulación de ácido salicílico durante la repuesta de defensa en la interacción planta-patógeno (Kumar, 2014). Sin



embargo, la regulación dual de la transcripción de *ICS1* por *CBP60g* y *SARD1* mantiene una dinámica en la producción de ácido salicílico, lo cual ha sido demostrado durante la infección *P. syringae* donde CBP60 regula la biosíntesis del ácido salicílico en etapas tempranas de la infección, mientras que *SARD1* participa en etapas tardías, por lo que CBP60 puede estar involucrado en las primeras respuestas de defensa contra organismos biotróficos (Zhang *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014).

Por otro lado, algunos genes (como el *CBP60a*) regulan de forma negativa la expresión de *ICS1* a través de la unión de CaM, este mecanismo permite mantener controlados los niveles de ácido salicílico dentro de la célula a niveles que no sean tóxicos, además de mantener las rutas de síntesis apagadas. Durante la interacción planta-patógeno, *CBP60g* y *SARD1* activan de expresión *ISC1*, eliminando el regulador negativo *CBP60a* (Zhang *et al.*, 2013; Shah *et al.*, 2014; Seyfferth y Tsuda, 2016).

Además de la regulación de *ICS1* mediante *CBP60g* y *SARD1*, la señalización del calcio afecta los niveles de SA a través de la regulación transcripcional de *EDS1* (Enhanced Disease Susceptibility 1) (Sánchez *et al.*, 2013; Seyfferth y Tsuda, 2016). La expresión de *EDS1* está regulada por un factor de unión a CaM denominado CAMTA3/SR1 (Calmodulin binding Transcription Activator 3/Signal Responsive gene 1), el cual se une al promotor *EDS1* para reprimir su transcripción (Seyfferth y Tsuda, 2016).

### **1.6.3 Respuesta de defensa mediada por ácido salicílico**

El aumento de los niveles de ácido salicílico en el interior de la célula actúa corriente abajo sobre la expresión de genes como los *NPRs*, los cuales codifican para proteínas receptoras, los cuales funcionan como coactivadores de diferentes genes implicados en la respuesta de defensa, siendo *NPR1*, *NPR2* y *NPR4* los receptores más estudiados como receptores del ácido salicílico (Kumari *et al.*, 2014; Shah *et al.*, 2014; Kovacs *et al.*, 2015).

La proteína NPR1 es un regulador en la reprogramación e inmunidad transcripcional mediada por ácido salicílico, funcionando como un coactivador transcripcional. Las mutaciones en *npr1* llevan a una pérdida casi completa de la reprogramación transcripcional mediada por ácido salicílico y a una susceptibilidad contra patógenos biotróficos (Wu *et al.*, 2012). La unión del ácido salicílico a NPR1, desencadena cambios conformacionales, además se demostró que NPR1 funciona como un transductor de señales en la vía de señalización mediada por el ácido salicílico. La concentración de NPR1 es altamente regulada dentro de la célula, pues en ausencia de ácido salicílico NPR1 es degradado por la célula (Derksen *et al.*, 2013; Wu, *et al.*, 2014; Yan y Dong, 2014; Kammerhofer *et al.*, 2015).

NPR1 se encuentra localizado en el citosol y en el núcleo de la célula, no obstante, los niveles de NPR1 están altamente regulados, pues dentro del núcleo su nivel se mantiene por debajo de concentraciones que le impiden actuar como factor transcripcional y en el citosol se encuentra unido formando complejos oligoméricos, estos complejos durante el ataque de un fitopatógeno son disociados debido a los aumentos en los niveles de ácido salicílico, el cual interactúa con los complejos dando lugar a cambios redox que permiten su disociación, una vez disociados los monómeros de NPR1 migran hacia el núcleo (Wu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Yan y Dong, 2014).

Una vez dentro del núcleo los niveles de NPR1 aumentan de tal manera que esto permite, que los monómeros de NPR1 actúen como factores transcripcionales al interactuar con otros factores como TGAs (basic leucine zipper transcription factors), estos factores desencadenan la expresión de genes implicados con los mecanismos de defensa de la planta entre los que se encuentran los genes *PRs* los cuales son genes asociados con la respuesta a patogénesis (De Vleeschauwer *et al.*, 2014; Kumar, 2014).

Los monómeros de NPR1 unidos a los sitios promotores son fosforilados y posteriormente ubiquitanados, esta condición es indispensable para la activación de la

resistencia sistémica adquirida (SAR) y para los genes implicados en los mecanismos de defensa durante la interacción planta-patógeno (Wu *et al.*, 2012; Kumar, 2014). Donde NPR3 y NPR4 son fundamentales en el proceso de degradación de NPR1 y, por lo tanto, están involucrados en la regulación de los mecanismos de defensa asociados a la ruta del ácido salicílico (Solano *et al.*, 2013; Kammerhofer *et al.*, 2015; Kuai *et al.*, 2015).

Además, se ha demostrado que los factores TGA son indispensables para la regulación de genes *PRs* los cuales codifican para proteínas de respuesta a patogénesis. En *Arabidopsis thaliana* se han identificado 10 factores de transcripción TGA, de los cuales se ha determinado que TGA2, TGA5 y TGA6, los cuales regulan de forma negativa la transcripción de genes que codifican para las proteínas de respuesta a patogénesis como *PR1*, el cual es reprimido en ausencia de ácido salicílico (Kammerhofer *et al.*, 2015).

#### **1.6.4 Proteínas de respuesta a patogénesis asociadas a la ruta del ácido salicílico**

Las proteínas de respuesta a patogénesis están clasificadas dentro de 17 familias de acuerdo con su función, presentando propiedades antimicrobianas contra patógenos o participando como moléculas señalizadoras en los procesos de inmunidad de la planta, además se ha demostrado que estas proteínas se pueden acumular en tejidos y en etapas específicas del desarrollo (Edreva, 2005; Méndez, 2013; Golshani *et al.*, 2015). No obstante, se ha demostrado que las *PRs* son inducidas durante los procesos infección por patógenos o situaciones de estrés (Golshani *et al.*, 2017). Siendo *PR1*, *PR2* y *PR5* las asociadas con la respuesta de defensa dependiente de la ruta del ácido salicílico durante la interacción contra organismos biotróficos (Hamamouch *et al.*, 2011; Ding *et al.*, 2016).

En *A. thaliana* han sido identificadas un total de 22 genes que codifican para la familia de proteínas *PR1*, los cuales se expresan de forma diferencial y bajo determinadas

condiciones de estrés, medioambientales o como parte del desarrollo de la planta. Siendo *PR1* codificada en el locus At2g14610 la que se expresa en respuesta a patógenos, insectos y tratamientos químicos, y la que se ha determinado que presenta actividad antimicrobiana (Pečenková, Pleskot, & Žárský, 2017).

A la familia PR2 se le atribuye actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasa, la cual participa en la hidrólisis de enlaces  $\beta$ -1,3-glucosídicos de compuestos como el glucano. Se ha demostrado su participación en proceso de defensa contra hongos fitopatógenos y durante la degradación de las estructuras internas de la planta, como pared celular y calosa en los plasmodesmos, para la inducción de elicitores de la respuesta de defensa. Dentro de esta familia se encuentran 50 genes identificados, que se ha demostrado que están involucrados en los procesos de defensa de la planta bajo diversas condiciones de estrés y desarrollo de la planta, siendo el locus At3g57260 uno de los más estudiados en los procesos de interacción planta-patógeno (Evedra, 2005; Doxey *et al.*, 2007; Oide *et al.*, 2013).

La familia PR5 guarda homología con las taumatinas y hosmotinas, a las cuales se les atribuyen propiedades antimicrobianas, se encuentran principalmente en hojas jóvenes en plantas como tomate, maíz y arroz (Sudisha *et al.*, 2011); sin embargo, su actividad microbiana es específica para determinado grupo de microorganismos y bajo condiciones de estrés hídrico (Shatters *et al.*, 2006).

### **1.6.5 Participación de ácido salicílico y PRs en la interacción planta-nematodo**

El ácido salicílico ha demostrado ser una de las fitohormonas clave en los procesos de defensa de la planta, al participar en la modulación de expresión de genes de defensa como *Mi-1*. Esto ha sido demostrado en plantas resistentes de tomate transformadas con *NahG*, el cual codifica para una enzima salicilato hidrolasa que transforma el ácido salicílico a catecol, evitando la acumulación de ácido salicílico dentro de la planta, resultando en una pérdida de la resistencia contra la infección (Branch *et al.*, 2004).

Además, se ha demostrado la participación del ácido salicílico al evaluar los genes marcadores de resistencia sistémica asociados a la ruta de ácido salicílico *PR1*, *PR2* y *PR5*, los cuales fueron expresados diferencialmente en planta de *A. thaliana* durante la infección con el nematodo agallador *M. incognita* y el nematodo de quiste *H. schachtii*, donde las plantas infectadas con *H. schachtii* presentaron la expresión de estos genes de forma local y sistémica 9 días después de la inoculación del nematodo, sin embargo, las plantas infectadas con *M. incognita* solo presentaron expresión de forma local, indicando una represión de la respuesta sistémica (Hamamouch *et al.*, 2011). Sin embargo, la mayor expresión por parte de genes como *PR1* se da en los primeros días de la infección indicando su participación en la defensa de la planta en etapas iniciales del proceso de infección, no así para el caso de *PR2* y *PR5* las cuales se expresan principalmente en etapas tardías de la infección (Wubben *et al.*, 2008).

## 1.7 REFERENCIAS

- Abad, P., & Williamson, V. M. (2010). Plant nematode interaction a sophisticated dialogue. *In Advances in botanical research*, 53, 147-192.
- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J. M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G., Deleury, E., & Caillaud, M. C. (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature biotechnology*, 26(8), 909-915.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology Plant* (5 Edition ed.). Burlington, USA: Elsevier Academic Press.
- Al-Shehbaz, I. A., & O'Kane Jr, S. L. (2002). Taxonomy and phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). *The Arabidopsis Book*, e0001.
- b Pinheiro, J., Boiteux, L. S., Almeida, M. R., Pereira, R. B., Galhardo, L. C., & Carneiro, R. M. (2015). First report of *Meloidogyne enterolobii* in *Capsicum* rootstocks carrying the *Me1* and *Me3/Me7* genes in Central Brazil. *Nematropica*. *Nematropica*, 45(2), 184-188.
- Bandurska, H. (2013). Salicylic acid: An update on biosynthesis and action in plant response to water deficit and performance under drought. En H. Shamsul, *Salicylic Acid: Plant Growth and Development* (págs. 1-14). 2013: Springer Science.
- Bert, W., Karssen, G., & Helder, J. (2011). Phylogeny and evolution of nematodes. En G. Gheysen, & C. Fenoll, *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions* (págs. 45-59). Dordrecht : Springer Netherlands.
- Branch, C., Hwang, C. F., Navarre, D. A., & Williamson, V. M. (2004). Salicylic acid is part of the *Mi-1*-mediated defense response to root-knot nematode in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(4), 351-356.
- Caarls, L., Pieterse, C. M., & Van Wees, S. C. (2016). How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. En H. Lu, *Salicylic Acid Signaling Networks* (págs. 59-69). Baltimore: Lausanne: Frontiers Media.
- Cabrera, V. A., Dottori, N., & Doucet, M. E. (2017). Histopathology of roots of three tomato cultivars infected with two separate isolates of the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology*, 148(2), 393-403.

- Campos, L., Granell, P., Tárraga, S., López-Gresa, P., Conejero, V., Bellés, J. M., & Lisón, P. (2014). Salicylic acid and gentisic acid induce RNA silencing-related genes and plant resistance to RNA pathogens. *Plant physiology and biochemistry*, *77*, 35-43.
- Cheol, S. G., Sim, H. J., Kim, S. G., & Ryu, C. M. (2016). Root-mediated signal transmission of systemic acquired resistance against above-ground and below-ground pathogens. *Annals of botany*, *118*(4), 821-831.
- De Vleeschauwer, D., Xu, J., & Höfte, M. (2014). Making sense of hormone-mediated defense networking: from rice to *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science*, *5*, 611.
- Delaunoy, B., Jeandet, P., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S., & Cordelier, S. (2014). Uncovering plant-pathogen crosstalk through apoplastic proteomic studies. *Frontiers in plant science*, *5*(249), 249.
- Derksen, H., Rampitsch, C., & Daayf, F. (2013). Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant science*, *207*, 79-87.
- Ding, Y., Shaholli, D., & Mou, Z. (2016). A large-scale genetic screen for mutants with altered salicylic acid accumulation in *Arabidopsis*. En H. Lu, J. T. Greenberg, & L. Holuigue, *Salicylic acid signaling networks* (págs. 35-44). Lausanne: Frontiers Media.
- Doxey, A. C., Yaish, M. W., Moffatt, B. A., Griffith, M., & McConkey, B. J. (2007). Functional divergence in the *Arabidopsis*  $\beta$ -1, 3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Molecular biology and evolution*, *24*(4), 1045-1055.
- Edreva, A. (2005). Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen Appl Plant Physiol*, *31*(1-2), 105-24.
- Escobar, C., Barcala, M., Cabrera, J., & Fenoll, C. (2015). Overview of root-knot nematodes and giant Cells. En C. Escobar, *Advances in botanical research* (Vol. 73, págs. 1-32). London: Elsevier Ltd.
- Eves-van den Akker, S., Lilley, C. J., Danchin, E. G., Rancurel, C., Cock, P. J., Urwin, P. E., & Jones, J. T. (2014). The transcriptome of *Nacobbus aberrans* reveals insights into the evolution of sedentary endoparasitism in plant-parasitic nematodes. *Genome biology and evolution*, *6*(9), 2181–2194.

- Godinez-Vidal, D., M., R.-S., Sepulveda-Garcia, E. B., Lozoya-Gloria, E., Rojas-Martínez, R. I., Guevara-Olvera, L., & Zavaleta-Mejía, E. (2013). Transcript accumulation of the mevalonate pathway genes and enzymatic activity of HMGC<sub>o</sub>A-r and EAS in chilli CM-334 infected by the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. *Plant Soil*, 372(1-2), 339-348.
- Golshani, F., Fakheri, B. A., Behshad, E., & Vashvaei, R. M. (2015). PRs proteins and their mechanism in plants. In Biological forum. *In Biological Forum*, 7(1), 477-495.
- Goverse, A., & Smant, G. (2014). The activation and suppression of plant innate immunity by parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 243-265.
- Hamamouch, N. L., Hewezi, T., Baum, T. J., Mitchum, M. G., Hussey, R. S., & Davis, E. L. (2012). The interaction of the novel 30C02 cyst nematode effector protein with a plant  $\beta$ -1, 3-endoglucanase may suppress host defence to promote parasitism. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3683-3695.
- Hamamouch, N., Li, C., Seo, P. J., Park, C. M., & Davis, E. L. (2011). Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 355-364.
- Hammerschmidt, R. (2014). Introduction: definitions and some history. En D. Walters, A. C. Newton, & G. Lyon, *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection* (págs. 1-10). Oxford: John Wiley & Sons.
- Han, Y., Chaouch, S., Mhamdi, A., Queval, G., Zechmann, B., & Noctor, G. (2013). Functional analysis of *Arabidopsis* mutants points to Novel Roles for glutathione in coupling H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*, 00(00).
- Hwezi, T., & Baun, T. (2017). Communication of sedentary plant-parasitic nematodes with their host plants. *Advances in Botanical Research*, 82, 305-324.
- Hidalgo, A. C., Ponce, G. V., Aguilera, G. M., Alviter, A. R., & Mendoza, N. M. (2014). Occurrence of *Nacobbus aberrans* in horticultural crops in northwestern Michoacan, Mexico. *Nematropica*, 44(1), 107-117.



- Holbein, J., Grundler, F. M., & Siddique, S. (2016). Plant basal resistance to nematodes: an update. *Journal of experimental botany*, 67(7), 2049-2061.
- Jammes, F., Lecomte, P., Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M. L., Renou, J. P., & Favery, B. (2005). Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 44(3), 447-458.
- Ji, H., Gheysen, G., Denil, S., Lindsey, K., Topping, J. F., Nahar, K., & De Meyer, T. (2013). Transcriptional analysis through RNA sequencing of giant cells induced by *Meloidogyne graminicola* in rice roots. *Journal of experimental botany*, 64(12), 3885-3898.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444 (7117), 203.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946-961.
- Kammerhofer, N., Egger, B., Dobrev, P., Vankova, R., Hofmann, J., Schausberger, P., & Wieczorek, K. (2015). Systemic above and belowground cross talk: hormonebased responses triggered by *Heterodera schachtii* and shoot herbivores in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 66(22), 7005–7017.
- Kammerhofer, N., Radakovic, Z., Regis, J. M., Dobrev, P., Vankova, R., Grundler, F. M., & Wieczorek, K. (2015). Role of stress-related hormones in plant defence during early infection of the cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 207(3), 778–789.
- Kiewnick, S., Dessimoz, M., & Franck, L. (2009). Effects of the Mi-1 and the N root-knot nematode-resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. *Journal of Nematology*, 41(2), 134–139.
- Kovacs, I., Durner, J., & Lindermayr, C. (2015). Crosstalk between nitric oxide and glutathione is required for NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1 (NPR1)-dependent defense signaling in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 208(3), 860-872.

- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *Elife*, 4, e06100.
- Kuai, X., MacLeod, B. J., & Després, C. (2015). Integrating data on the *Arabidopsis* NPR1/NPR3/NPR4 salicylic acid receptors; a differentiating argument. *Frontiers in plant science*, 6, 235.
- Kumar, D. (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science*.
- Kyndt, T., Denil, S., Haegeman, A., Trooskens, G., Bauters, L., Crieckinge, W., & Gheysen, G. (2012). Transcriptional reprogramming by root knot and migratory nematode infection in rice. *New Phytologist*, 196(3), 887-900.
- Li, R., Rashotte, A. M., Weaver, D. B., Lawrence, K. S., & Locy, R. D. (2015). Integrated signaling networks in plant responses to sedentary endoparasitic nematodes: a perspective. *Plant cell reports*, 34(1), 5-22.
- Lovelock, D. A., Šola, I., Marschollek, S., Donald, C. E., Rusak, G., van Pée, K. H., & Cahill, D. M. (2016). Analysis of salicylic acid-dependent pathways in *Arabidopsis thaliana* following infection with *Plasmodiophora brassicae* and the influence of salicylic acid on disease. *Molecular plant pathology*, 17(8), 1237-1251.
- Lu, H. (2016). Editorial: Salicylic acid signaling networks. En S. a. networks, *Lu, Hua* (págs. 7-9). Baltimore: Frontiers Media.
- Manosalva, P., Manohar, M., Von Reuss, S. H., Chen, S., Koch, A., Kaplan, F., & Sternberg, P. W. (2015). Conserved nematode signalling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance. *Nature Communication*, 6(7795), 1-8.
- Manzanilla-López, J. R., C. M., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R. N., Lehman, P. S., & Evans, K. (2002). The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica*, 32(2), 149-228.
- Manzanilla-López, H. R. (2010). Speciation within *Nacobbus*: consilience or controversy? *Nematology*, 12(3), 321-334.
- Martínez-Gallardo, J. Á.-V., Allende-Molar, R., García-Estrada, R. S., & Carrillo-Fasio, J. A. (2016). Primer reporte de *Meloidogyne enterolobii* parasitando tomate en

- Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*(16), 2165-2168.
- Martínez-Medina, A., Fernandez, I., Lok, G. B., Pozo, M. J., Pieterse, C. M., & Van Wees, S. (2016). Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytologist*, 213(3), 1363–1377.
- Martinuz, A., Zewdu, G., Ludwig, N., Grundler, F., Sikora, R. A., & Schouten, A. (2014). The application of *Arabidopsis thaliana* in studying tripartite interactions among plants, beneficial fungal endophytes and biotrophic plant-parasitic nematodes. *Planta*, 241(4), 1015-1025.
- Meinke, D., Cherry, J., Dean, C., Rounsley, S., & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389), 662-682.
- Méndez, C. (2013). *Arabidopsis thaliana* un modelo en el estudio de expresión de los genes *Col1*, *PDF1. 2* y *PR2* en la interacción compatible e incompatible con *Nacobbus aberrans*. Tesis para como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias. México: Colegio de Posgraduados.
- Molinari, S., Fanelli, E., & Leonetti, P. (2014). 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(3), 255-264.
- Oide, S., Bejai, S., Staal, J., Guan, N., Kaliff, M., & Dixelius, C. (2013). A novel role of *PR2* in abscisic acid (ABA) mediated, pathogen-induced callose deposition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 200(4), 1187-1199.
- Pečenková, T., Pleskot, R., & Žárský, V. (2017). Subcellular localization of *Arabidopsis* pathogenesis-related 1 (PR1) protein. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 825.
- Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5(5), 308-316.
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., & Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, 28.1–28.3.

- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Does, D. V., & Van Wees, S. (2014). Signalling networks involved in induced resistance. En D. Walters, A. C. Newton, & G. Lyon, *Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection* (págs. 58-80). Oxford: John Wiley & Sons.
- Ramírez-Suárez, A., Rosas-Hernández, L., Alcasio-Rangel, S., Pérez Valenzuela, G., & Powers, T. O. (2014). First Report of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne enterolobii* Parasitizing Watermelon from Veracruz, Mexico. *The American Phytopathological Society*, 98(3), 428.
- Sánchez, G. R., Mercado, E. C., de la Cruz, H. R., & Pineda, E. G. (2013). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, 12(2), 90-95.
- Seyfferth, C., & Tsuda, K. (2016). Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. En H. Lu, *Salicylic Acid Signaling Networks* (págs. 10-19). Baltimore: Lausanne: Frontiers Media.
- Shah, J., Chaturvedi, R., Chowdhury, Z., Venables, B., & Petros, R. A. (2014). Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. *The Plant Journal*, 79(4), 645-658.
- Shanks, C. M., Rice, J. H., Zubo, Y., Schaller, G. E., Hewezi, T., & Kieber, J. J. (2015). The role of cytokinin during infection of *Arabidopsis thaliana* by the cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(1), 57-68.
- Shatters, R. G., Boykin, L. M., Lapointe, S. L., Hunter, W. B., & Weathersbee, A. A. (2006). Phylogenetic and structural relationships of the *PR5* gene family reveal an ancient multigene family conserved in plants and select animal taxa. *Journal of molecular evolution*, 63(1), 12-29.
- Sijmons, P., Grundler, F., Mende, N., Burrows, P., & Wyss, U. (1991). *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant-parasitic nematodes. *The Plant Journal*, 1(2), 245-254.
- Solano, R., & Gimenez-Ibanez, S. (2013). Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Frontiers in plant science*(4), 72.

- Sosa, A. L., Rosso, L. C., Salusso, F. A., Etcheverry, M. G., & Passone, M. A. (2018). Screening and identification of horticultural soil fungi for their evaluation against the plant parasitic nematode *Nacobbus aberrans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(5), 63.
- Sudisha, J., Sharathchandra, R. G., Amruthesh, K. N., Kumar, A., & Shetty, H. S. (2011). Pathogenesis related proteins in plant defense response. En J. M. Mérillon, & K. G. Ramawat, *Plant defence: biological control* (págs. 379-403). London-New York: Springer Science & Business Media.
- Teillet, A., Dybal, K., Kerry, B. R., Miller, A. J., Curtis, R. H., & Hedden, P. (2013). Transcriptional changes of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in response to *Arabidopsis thaliana* root signals. *PLoS One*, 8(4), e61259.
- Teixeira, M. A., Wei, L., & Kaloshian, I. (2016). Root-knot nematodes induce pattern-triggered immunity in *Arabidopsis thaliana* roots. *New Phytologist*, 211(1), 276–287.
- Truong, N. M., Nguyen, C. N., Abad, P., Quentin, M., & Favery, B. (2015). Function of root-knot nematode effectors and their targets in plant parasitism. En C. Escobar, & C. Fenoll, *Plant nematode interactions: a view on compatible interrelationships* (Vol. 73, págs. 293-324.). London: Academic Press.
- Villar-Luna, E., Gómez-Rodríguez, O., Rojas-Martínez, R. I., & Zavaleta-Mejía, E. (2016). Presence of *Meloidogyne enterolobii* on Jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sinaloa , Mexico. *Helminthologia*, 53(3), 155-160.
- Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R. I., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A. M., & Zavaleta-Mejía, E. (2009). Respuesta hipersensitiva en el follaje de chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematofica*, 39(1), 143-155.
- Villar-Luna, E., Rojas-Martínez, R. I., Reyes-Trejo, B., Gómez-Rodríguez, O., & Zavaleta-Mejía, E. (2017). Mevalonate pathway genes expressed in chilli CM334 inoculated with *Phytophthora capsici* and infected by *Nacobbus aberrans* and *Meloidogyne enterolobii*. *European Journal of Plant Pathology*, 1-15.

- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J. Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I. D., & Després, C. (2012). The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell reports*, 6(1), 639-647.
- Wubben, M. J., Jin, J., & Baum, T. J. (2008). Cyst Nematode Parasitism of *Arabidopsis thaliana* Is Inhibited by Salicylic Acid (SA) and Elicits Uncoupled SA-Independent Pathogenesis-Related Gene Expression in Roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(4), 424-432.
- Wubben, M. J., Su, H., Rodermeil, S. R., & Baum, T. J. (2001). Susceptibility to the sugar beet cyst nematode is modulated by ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(10), 1206-1212.
- Yan, S., & Dong, X. (2014). Perception of the plant immune signal salicylic acid. *Current opinion in plant biology*, 20, 64-68.
- Yang, Y. X., J Ahammed, G., Wu, C., Fan, S. Y., & Zhou, Y. H. (2015). Crosstalk among jasmonate, salicylate and ethylene signaling pathways in plant disease and immune responses. *Current Protein and Peptide Science*, 16(5), 450-461.
- Yang, Y. X., Wang, M. M., Ren, Y., Onac, E., Zhou, G., Peng, S., & Yu, J. Q. (2015). Light-induced systemic resistance in tomato plants against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant growth regulation*, 76(2), 167-175.
- Ye, W. M., Koenning, S. R., Zhuo, K., & Liao, J. L. (2015). First report of *Meloidogyne enterolobii* on cotton and soybean in North Carolina, United States. *Phytopathology*, 105(9), 1245-1249.
- Zhang, P. J., Li, W. D., Huang, F., Zhang, J. M., Xu, F. C., & Lu, Y. B. (2013). Feeding by whiteflies suppresses downstream jasmonic acid signaling by eliciting salicylic acid signaling. *Journal of chemical ecology*, 39(5), 612–619.
- Zhang, Y., Lubbersted, T., & Xu, M. (2013). The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *Journal of genetics and genomics*, 40(1), 23-35.
- Zhuo, K., Chen, J., Lin, B., Wang, J., Sun, F., Hu, L., & Liao, J. (2017). A novel *Meloidogyne enterolobii* effector MeTCTP promotes parasitism by suppressing programmed cell death in host plants. *Molecular plant pathology*, 18(1), 45-54.

## **CAPÍTULO 2. Cambios transcripcionales de genes de defensa dependientes de ácido salicílico inducidos en *A. thaliana* durante la infección por nematodos agalladores**

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

Los nematodos agalladores son uno de los principales problemas dentro de la agricultura, debido a las diversas pérdidas que éstos ocasionan en cultivos de interés económico (Agrios, 2005; Jones *et al.*, 2013). Estos fitoparásitos pueden dividirse en dos grandes grupos en ecto y endoparásitos, así mismo, éstos pueden mostrar un comportamiento migratorio o sedentario. Los nematodos fitopatógenos endoparásitos sedentarios son los de mayor importancia, debido al daño que éstos provocan en la planta hospedera, como resultado de las modificaciones y síntomas que éstos inducen, reduciendo su rendimiento (Jones *et al.*, 2013; Holbein *et al.*, 2016). Dentro de este grupo encontramos a las especies pertenecientes al género *Meloidogyne*, el cual cuenta con un aproximado de 1,700 especies hospederas, siendo las especies de *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. hapla* y *M. javanica*, las especies más estudiadas dentro de este género, debido a su distribución y cantidad de hospederos (Jones *et al.*, 2013). Sin embargo, en los últimos años la especie de *M. enterolobii* ha adquirido gran importancia, debido a su alta agresividad, ya que posee la capacidad de infectar plantas que presentan genes de resistencia contra las principales especies del género *Meloidogyne* (Ye *et al.*, 2015; Villar-Luna *et al.*, 2016).

Otra especie que ha adquirido gran interés es *N. aberrans*, conocido como falso nematodo agallador, induce síntomas similares a los mostrados por las especies del género *Meloidogyne*, afectando a un total de 84 especies vegetales (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Durante el proceso de infección las especies de *Meloidogyne* y *N. aberrans* inducen cambios morfológicos, fisiológicos y transcripcionales, afectando diferentes procesos biológicos, entre los cuales se encuentran los mecanismos de defensa de la planta, los cuales son modificados a través de diversos efectores, permitiendo que la infección prospere, además de facilitar la entrada de otros

patógenos en la planta hospedera (Wubben *et al.*, 2008; Villar-Luna *et al.*, 2009; Cabrera *et al.*, 2017).

Los mecanismos de defensa de las plantas son regulados por diferentes fitohormonas, entre las que se encuentra el ácido jasmónico, el etileno y el ácido salicílico (Pieterse *et al.*, 2009; Goverse *et al.*, 2014). El ácido salicílico resalta su importancia al participar en la defensa contra organismos biotróficos, el cual es necesario para accionar mecanismos de defensa vegetal como la respuesta hipersensible y la resistencia sistémica adquirida, mecanismos involucrados en la defensa contra nematodos fitoparásitos sedentarios (Solano y Gimenez-Ibanez, 2013; Martínez-Medina *et al.*, 2017). Siendo *PR1*, *PR2* y *PR5* los principales genes marcadores de resistencia sistémica adquirida asociados a la ruta del ácido salicílico, los cuales se ha demostrado que se expresan durante etapas tempranas de la infección y son reprimidos en etapas tardías en raíces de plantas infectadas con especies como *M. incognita* y *H. schachtii*, sin embargo, la respuesta de la parte aérea de la planta está en función del patógeno (Hamamouch *et al.*, 2011; Hamamouch *et al.*, 2012; Molinari *et al.*, 2014; Kammerhofer *et al.*, 2015). No obstante, la activación de los mecanismos de defensa están condicionados por el tipo de interacción que la planta hospedera presente con el fitopatógeno (Jones y Dangl, 2006; Pieterse *et al.*, 2009). Se ha demostrado que en una interacción compatible los genes asociados a la ruta del ácido salicílico son reprimidos en alguna de las etapas de la infección, permitiendo que el nematodo complete su ciclo de vida, en contraste con una interacción incompatible donde los genes asociados a la ruta del ácido salicílico son sobre-expresados, limitando el desarrollo del nematodo (Branch *et al.*, 2004; Kyndt *et al.*, 2012). En este sentido, se planteó el objetivo de evaluar como los genes dependientes del ácido salicílico son modulados por los nematodos agalladores, resultando en una activación o represión de los mecanismos de defensa de *A. thaliana* durante la interacción planta-nematodo, analizando los cambios transcripcionales de los genes marcadores *PR1*, *PR2* y *PR5* de manera local y sistémica, los cuales codifican para proteínas con actividad antimicrobiana (Wubben *et al.*, 2008; Hamamouch *et al.*, 2011).



## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Material vegetal

Como material vegetal se usaron plántulas de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0, las semillas fueron proporcionadas por la Dra. R. I. Rojas-Martínez (Colegio de Postgraduados Campus Montecillo). Para su uso las semillas fueron desinfectadas superficialmente colocándolas en un tubo eppendorf de 1.5 mL, donde se agregó 1 mL de alcohol absoluto, se agitaron y se dejaron reposar durante 5 min, después se retiró el alcohol y se les agregó una solución de hipoclorito de sodio al 5% y dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1 %, se agitaron por inmersión y se dejó actuar por 5 min, se retiró la solución y se les realizaron 5 lavados con agua destilada estéril para eliminar los residuos de soluciones. Las semillas fueron suspendidas en 1 mL de agua destilada y sometidas a un periodo de estratificación de 72 horas a 4 °C (Chávez-Avilés *et al.*, 2013). Después las semillas fueron transferidas a cajas Petri de 9 cm de diámetro que contenían medio Murashige y Skoog (MS) 0.25X suplementados con sacarosa al 1 % y agar Daichin ® al 0.6 %. Las cajas Petri con 50 semillas/caja fueron mantenidas en cuarto de crecimiento a 25°C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Las plántulas de 8 días después de la germinación fueron transferidas a macetas de 25 cm<sup>3</sup> de sustrato Peat Moss-arena (1:10 v/v) y fertilizadas con una solución de triple 18 (Ultrasol) a una concentración 400 mg/L.

### 2.2.2 Inóculo de *M. incognita*, *M. enterolobii* y *N. aberrans*

El inóculo de las diferentes especies de nematodos fue obtenido a partir de cultivos monoxénicos en plantas de jitomate cv. Río Grande®. Para la obtención de huevecillos de los nemátodos, se tomaron raíces de las plantas de jitomate con agallas, se les eliminó el exceso de suelo con ayuda de agua de la llave y se extrajeron los huevecillos de acuerdo con la metodología de Vrain (1977). La cual consistió en el uso de tamices metálicos anidados de 20 cm de diámetro y con tamaño de poro de 420 µm (40 mallas), 53 µm (270 mallas) y 26 µm (500 mallas), los huevecillos fueron retenidos en el tamiz de 500 mallas. Para la colecta de huevecillos se usó agua de la llave sobre los tamices,

para recuperar los huevecillos se empleó agua de la llave estéril, la solución se colocó en un frasco para su posterior eclosión.

La eclosión de los huevecillos de cada nematodo se llevó a cabo por el método de charola de Baerman, para lo cual se utilizó una malla metálica con un pañuelo desechable como nicho y colocada dentro de una caja Petri. La suspensión de cada nematodo fue vertida sobre el nicho de las cajas Petri y mantenidas a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  y con un volumen constante de 10 mL de agua de la llave estéril. La colecta se llevó a cabo cada 24 horas, el inóculo colectado fue mantenido a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El número de larvas en estadio J2 para cada especie de nematodo fue determinado por conteo directo en un volumen conocido, con ayuda de un estereoscopio.

### **2.2.3 Infección de plantas de *A. thaliana* por los nematodos agalladores**

Para el análisis de infección y determinar el tipo de interacción, plántulas de *A. thaliana* mantenidas en sustrato Peat-Moss y arena (1:10) de 21 días de edad fueron inoculadas con 500 J2. Se establecieron tres tratamientos (Tabla 2) con un total de 36 plantas, con 12 plantas por tiempo de muestreo tomadas como muestras independientes. Los tiempos de muestreo se realizaron a los 2, 7, 14 y 30 días después de la inoculación (ddi), el ensayo fue realizado por triplicado.

Las raíces de cada tratamiento fueron teñidas con fucsina ácida, primero fueron colocadas en tubos Falcon con NaClO al 0.53 % y se agitaron por 4 min. Se transfirió la raíz a un tamiz de 100 mallas y se eliminó el exceso de cloro con agua de la llave, cada muestra fue transferida a un tubo Falcon y se cubrió con una solución de fucsina ácida previamente preparada con 30 mL de agua destilada y 2 mL de una solución stock de fucsina ácida (3.5 g de fucsina ácida, 250 ml de ácido acético y 750 de agua destilada). Cada muestra se calentó en horno de microondas a ebullición por 5 a 6 s, las muestras se dejaron reposar por 24 horas (Bybd Jr. *et al.*, 1983).

Tabla 1. Ensayo de infectividad de nematodos agalladores sobre plántulas de *A. thaliana* infectadas.

Tratamiento	Tiempo de muestreo (ddi)	No. de plantas por tiempo de muestreo
<b>At + Me</b>	<b>2, 7 y 14</b>	<b>12 plantas</b>
<b>At + Mi</b>	<b>2, 7 y 14</b>	<b>12 plantas</b>
<b>At + Na</b>	<b>2, 7 y 14</b>	<b>12 plantas</b>

Nota: At (*A. thaliana*), Me (*M. enterolobii*), Mi (*M. incognita*), Na (*N. aberrans*) y ddi (días después de la inoculación).

Después de reposar, a las raíces se les eliminó el exceso de colorante con agua de la llave y se depositaron en tubo Falcon con glicerina al 80 % hasta cubrir totalmente la raíz, las muestras se dejaron reposar de 24 a 72 horas. Posteriormente. las raíces fueron cortadas en fragmentos y colocados en portaobjetos, con ayuda de pinzas y bisturí (Bybd Jr. *et al.*, 1983). Las muestras fueron observadas bajo microscopio óptico para determinar el número de nematodos en las raíces infectadas, así como los estadios presentes en los diferentes tiempos muestreo.

#### **2.2.4 Crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* infectada por nematodos agalladores**

Para evaluar el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* durante el proceso de infección, plántulas de *A. thaliana* mantenidas en sustrato Peat-Moss y arena (1:10) de 21 días de edad fueron inoculadas con 500 J2. Se estableció un experimento completamente al azar con cuatro tratamientos (Tabla 3), con un total de 48 plantas por tratamiento, con 12 plantas por tiempo de muestreo para cada tratamiento, tomadas como muestras independientes, con tiempos de muestreo 2, 7, 14 y 30 ddi.

Tabla 2. Ensayo de desarrollo de plántulas de *A. thaliana* infectadas con nematodos agalladores.

Tratamiento	Tiempo de muestreo (ddi)	No. de plantas por tiempo de muestreo
At + Me	2, 7, 14 y 30	12 plantas
At + Mi	2, 7 y 14	12 plantas
At + Na	2, 7 y 14	12 plantas
At (Control)	2, 7 y 14	12 plantas

Nota: At (*A. thaliana*), Me (*M. enterolobii*), Mi (*M. incognita*), Na (*N. aberrans*) y ddi (días después de la inoculación, se utilizaron plantas sin inóculo como control.

Las plántulas colectadas fueron lavadas con agua de la llave para retirar en exceso de sustrato del tejido radical. Cada plántula se pesó completa y posteriormente de forma individual el tejido radical y aéreo fueron pesados, además, se contó el número de agallas por raíz de los tratamientos inoculados. Las muestras fueron transferidas a sobres de papel y mantenidas en una estufa a 60 °C hasta obtener su peso constante. Se determinó el peso de la planta completa, así como de la raíz y el follaje.

### 2.2.5 Expresión de PRs en plántulas de *A. thaliana* inducidos por nematodos agalladores

Plántulas de *A. thaliana* de 21 días de edad, cultivadas en sustrato Peat-Moss:arena (1:10 v/v), fueron inoculadas con 500 J2 de *M. incognita*, *M. enterolobii* y *N. aberrans*. El experimento se repitió 4 veces en un diseño completamente al azar, con 4 tratamientos tres inoculados con cada nematodo y un control sin inóculo (Tabla 2). Además, se incluyeron cinco plantas por tratamiento para confirmar la infección y el estadio de desarrollo de cada nematodo (Bybd Jr. *et al.*, 1983). El muestreo se realizó a los 2, 7 y 14 ddi, tomando 5 plantas por tratamiento y colectando por separado raíz y follaje, cada muestra se congeló con nitrógeno líquido y almacenó en ultra congelación hasta su uso.

**Tabla 3. Tratamientos para los análisis de expresión en plántulas de *A. thaliana* infectadas con nematodos agalladores.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Tiempo de muestreo (ddi)</b>	<b>No. de plantas por tiempo de muestreo</b>
<b>At + Me</b>	<b>2, 7 y 14</b>	<b>20 plantas</b>
<b>At + Mi</b>	<b>2, 7 y 14</b>	<b>20 plantas</b>
<b>At + Na</b>	<b>2, 7 y 14</b>	<b>20 plantas</b>
<b>At (control)</b>	<b>2, 7 y 14</b>	<b>20 plantas</b>

Nota: *At* (*A. thaliana*), *Me* (*M. enterolobii*), *Mi* (*M. incognita*), *Na* (*N. aberrans*) y ddi (días después de la inoculación), se utilizaron plantas sin inóculo como control.

### **2.2.6 Extracción de RNA, síntesis de cADN y PCR en tiempo real**

A cada muestra de raíz y follaje se le realizó una extracción de ARN total con el kit RNeasy plant mini kit™, siguiendo las instrucciones de fabricante. La pureza e integridad del ARN obtenido fue verificada por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa al 1%, respectivamente. El cADN se sintetizó con el kit M-MLV (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con dNTPs (Fermentas) y agua libre de nucleasas.

Los niveles de expresión génica se determinaron por PCR tiempo real. La mezcla de reacción consistió de 5 µL de tampón de 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µL de cada primer, sentido y antisentido (Tabla 4), 2 µL de SYBR™ Green I (1:75000), 3 µL ADNc y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 µL. Las condiciones de amplificación fueron una desnaturalización inicial en 95 °C durante 4 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C durante 15 s, un alineamiento a 65 °C durante 35 s y una extensión a 72 °C por 35 s utilizando el equipo CFX 96 de BIO-RAD. Se utilizó el gen 18S como referencia para normalizar la expresión relativa que fue calculada mediante el método 2<sup>-ΔΔCt</sup> (Livak y Schmittgen, 2001).

**Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para en análisis de expresión de los genes *PR1*, *PR2*, *PR5* y *18S* en plántulas *A. thaliana*.**

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Referencia</b>
<i>PR1</i>	Forward: TTC TTC CCT CGA AAG CTC AA Reverse: TTG CAA CTG ATT ATG GTT CCA C	(Hamamouch <i>et al.</i> , 2011)
<i>PR2</i>	Forward: GCA ATG CAG AAC ATC GAG AA Reverse: TCA TCC CTG AAC CTT CCT TG	(Hamamouch <i>et al.</i> , 2011)
<i>PR5</i>	Forward: CGT ACA GGC TGC AAC TTT GA Reverse: AGT GAA GGT GCT CGT TTC GT	(Hamamouch <i>et al.</i> , 2011)
<i>18S</i>	Forward: GGT GGT AAC GGG TGA CGG AGA AT Reverse: CGC CGA CCG AAG GGA CAA GCC GA	(Hofmann y Grundler, 2007)

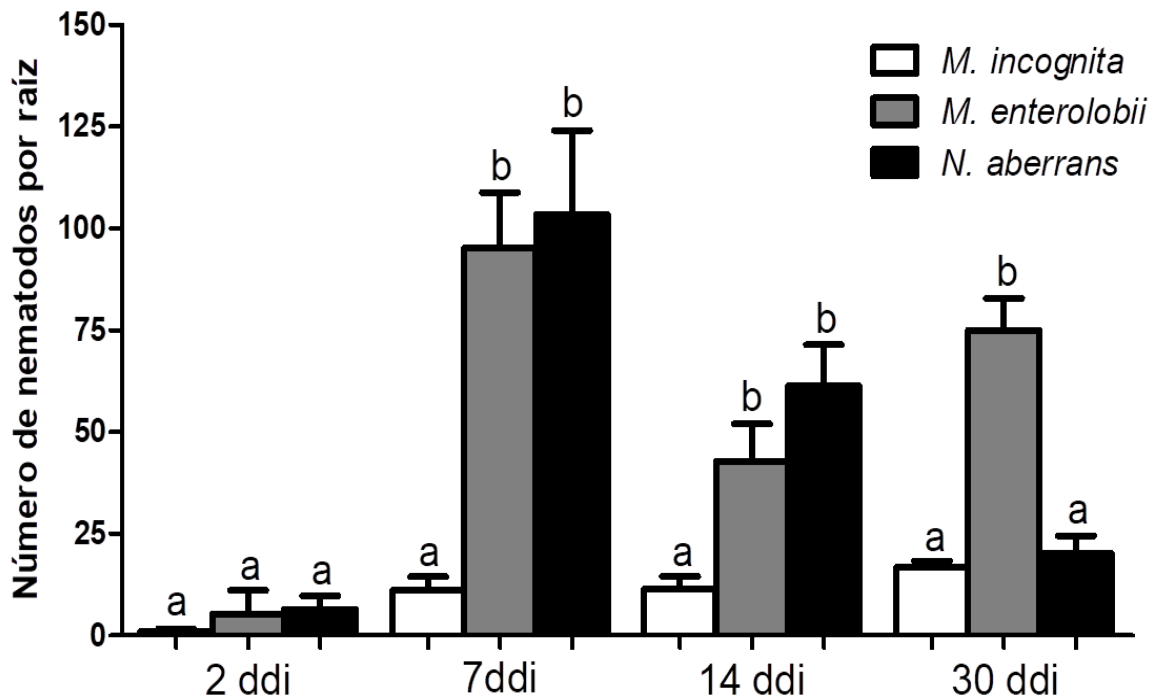
### 2.2.7 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los diferentes experimentos del proceso de infección y los análisis de expresión de los genes evaluados, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y a una comparación de medias de Tukey con  $p \leq 0.001$ ; y t- student con  $p \leq 0.001$  para índice de agallamiento, utilizando el programa GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Infectividad y desarrollo de nematodos agalladores

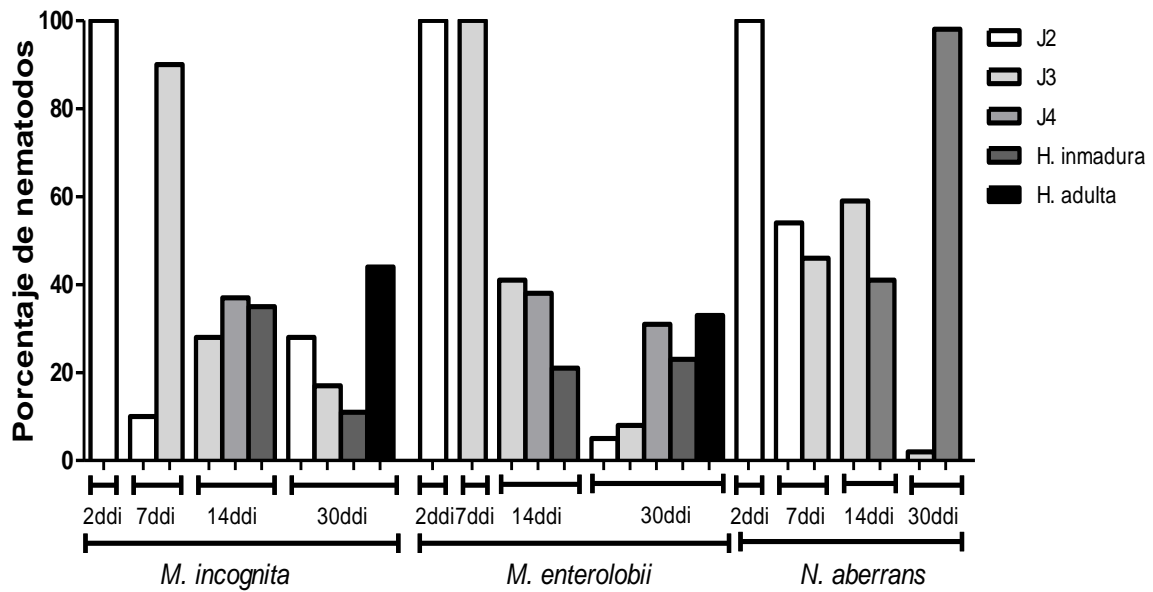
En la evaluación de infección de raíz de *A. thaliana* Col-0 por los nematodos *M. incognita*, *M. enterolobii* y *N. aberrans*, permitió monitorear el desarrollo de cada nematodo (Fig. 5). Del conteo total de nematodos presentes en las raíces de *A. thaliana*; a los 2 ddi se registró un promedio de  $1 \pm 0.707$  J2 de *M. incognita*, para el caso de *M. enterolobii* y *N. aberrans* presentaron 522.22 y 644.44 %, respectivamente; más ingresos que las plantas infectadas con *M. incognita*. Esta misma tendencia se observó a los 7 ddi, donde el número de nematodos presentes para *M. incognita* fue  $11 \pm 3.4641$ , mientras que las especies de *M. enterolobii* y *N. aberrans* mostraron 864.773 y 940.909 %, respectivamente; más ingresos en comparación con el control *M. incognita*; *M. enterolobii* y *N. aberrans* fueron estadísticamente iguales. A los 14 días se observó la disminución de la población del 54.928 y 40.741 % de *M. enterolobii* y *N. aberrans*, respectivamente, en comparación con el conteo de individuos presentes en raíces a los 7 ddi en el conteo de nematodos dentro de la raíz, esto como resultado del proceso de diferenciación y el comportamiento de los estadios juveniles de estas especies. Además, a los 14 ddi ambas especies (*M. enterolobii* y *N. aberrans*) mostraron 374.636 y 535.922 % más individuos con respecto al control *M. incognita* al mismo tiempo de evaluación. Sin embargo, a los 30 ddi al final de la evaluación, únicamente las plantas infectadas con *M. enterolobii* con 450 % más individuos, presentaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) con el control *M. incognita*, demostrando la alta agresividad de *M. enterolobii* con la planta hospedera. A los 30 ddi también se observó un incremento en el número de individuos de las especies de *M. incognita* y *M. enterolobii* con respecto al conteo de los 14 ddi con un aumento del 45.631 y 174.927 %, respectivamente. Durante la evaluación fue notoria la mayor agresividad de *N. aberrans* y *M. enterolobii* en comparación con *M. incognita*; y el descenso de los nematodos de *N. aberrans* dentro de la raíz en comparación con *M. enterolobii*, indicando un comportamiento migratorio por parte de los estadios J4 de *N. aberrans*.



**Figura 5. Infectividad de nematodos agalladores sobre las raíces de plántulas de *A. thaliana*.** Plántulas de *A. thaliana* de 21 días de edad se inocularon con 500 J2 de *N. aberrans* o *M. enterolobii*, los tiempos de muestreo se realizaron a los 2, 7, 14 y 30 días después de la inoculación (ddi). Las barras representan el promedio de una  $n=12 \pm$  la desviación estándar, las barras con letras diferentes indican grupos con diferencias significativas,  $p \leq 0.001$ .

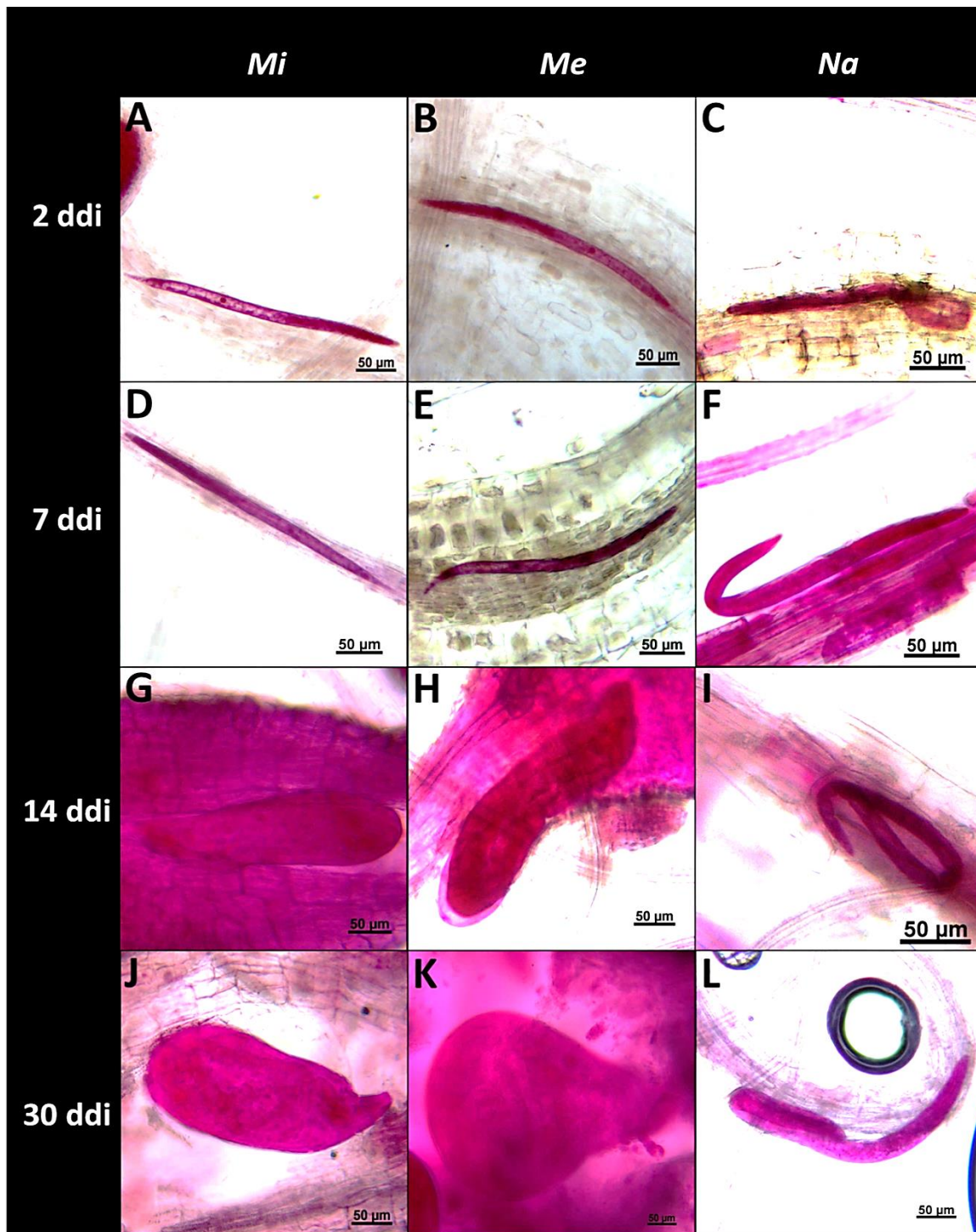
Con base en los conteos totales de nematodos en raíz, se determinó la cantidad de nematodos por estadios presentes a los 2, 7 y 30 ddi (Fig. 6). Se observó que a los 2 ddi el 100% de los nematodos dentro de raíz fueron del estadio J2 para las tres especies evaluadas. A los 7 ddi las especies de *Meloidogyne* presentaron el estadio J3 con un 90 % para la especie de *M. incognita* y un 100 % para *M. enterolobii*, indicando el establecimiento en los sitios especializados de alimentación. En el caso de *N. aberrans* a los 7 ddi se observaron los estadios J2 y J3 con un 54 y 46 %, respectivamente; ambos estadios presentaron un comportamiento migratorio (Fig. 6).





**Figura 6. Porcentaje de estadios presentes en raíces de plántulas de *A. thaliana* a diferentes tiempos post-inoculación con nematodos agalladores.** Los porcentajes fueron obtenidos a partir del promedio de conteo total de raíces infectadas con *M. incognita*, *M. enterolobii* y *N. aberrans*. Días después de la inoculación (ddi) y estadios juveniles (J2, J3 y J4).

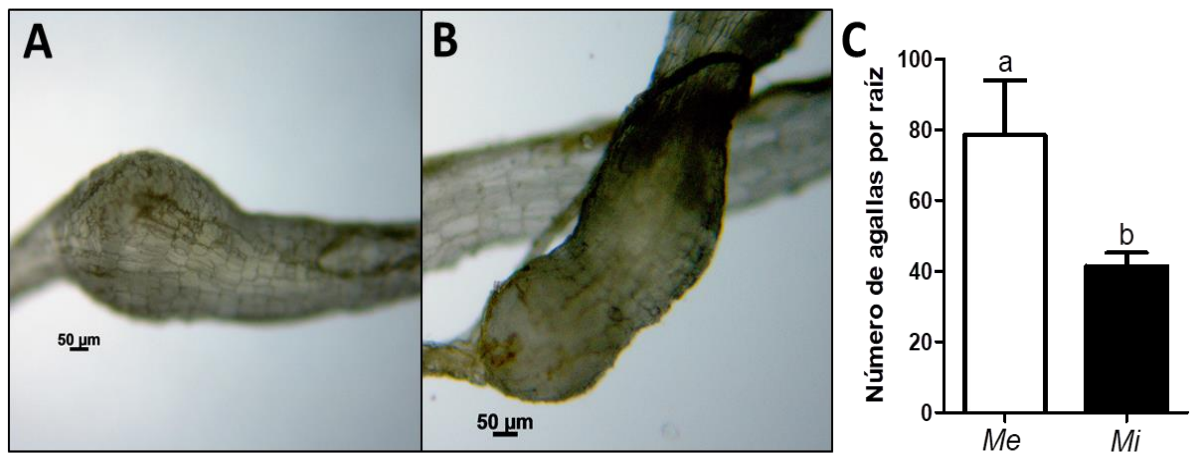
Las observaciones realizadas a los 14 ddi para *M. incognita* y *M. enterolobii* mostraron la presencia de los estadios J3, J4 y hembras inmaduras (Hi), con 28, 37 y 35 %, respectivamente para *M. incognita* y un 41, 38 y 21 % para *M. enterolobii*; donde a los 14 ddi las raíces con *N. aberrans* presentaron los estadios J3 y J4, con un 59 y 41 %, respectivamente; los cuales son estadios de comportamiento migratorio. Las observaciones realizadas a los 30 ddi mostraron los estadios J2, J3 y J4, así como hembras maduras (Hm) para las especies de *Meloidogyne*, con un 28, 17, 11 y 44 %, respetivamente para la especie *M. incognita*, y 8, 5, 31, 23 y 33 % para *M. enterolobii*, nótese que Hm predominó en ambas especies y que el conteo de J2 fueron reflejo de una nueva generación infectiva, indicativo de una interacción compatible con *A. thaliana* (Fig. 6 y 7). A los 30 ddi con la especie *N. aberrans* solo se observaron los estadios J3 y J4 con un 2 y 94 %, respectivamente; mostrando con estos resultados que con *Arabidopsis* no hubo una interacción compatible (Fig. 6 y 7).



**Figura 7.** Imágenes representativas de estadios observados de nematodos agalladores en raíces de plántulas de *A. thaliana*. Plántulas de *A. thaliana* de 21 días de edad infectadas con 500 J2, los tiempos de muestreo se realizaron a los 2, 7, 14 y 30. **A), D), G) y J)** estadios J2, J3, J4, Hi y Hm respectivamente de *M. incognita* (*Mi*), **B), E), H) y K)** estadios J2, J3, J4, Hi y Hm respectivamente de *M. enterolobii* (*Me*) y **C), F), I) y L)** estadios J2 y J4 de *Nacobbus aberrans* (*Na*).

### 2.3.2 Agallamiento de nematodos agalladores sobre plántulas de *A. thaliana*

En la evaluación de la virulencia de las especies de *M. incognita*, *M. enterolobii* y *N. aberrans* con el número de agallas por raíz, se observó que a los 30 ddi las plántulas infectadas con *M. incognita* presentaron 41.1 % menos agallas que las plantas infectadas con *M. enterolobii* (Fig. 8). En el caso del tratamiento de *A. thaliana* con *N. aberrans* no se observaron agallas en las raíces infectadas, esto coincide con el resultado del estadio predominante a los 30 ddi (J4), el cual no es capaz de inducir el sitio especializado de alimentación, necesario para el desarrollo de agallas.

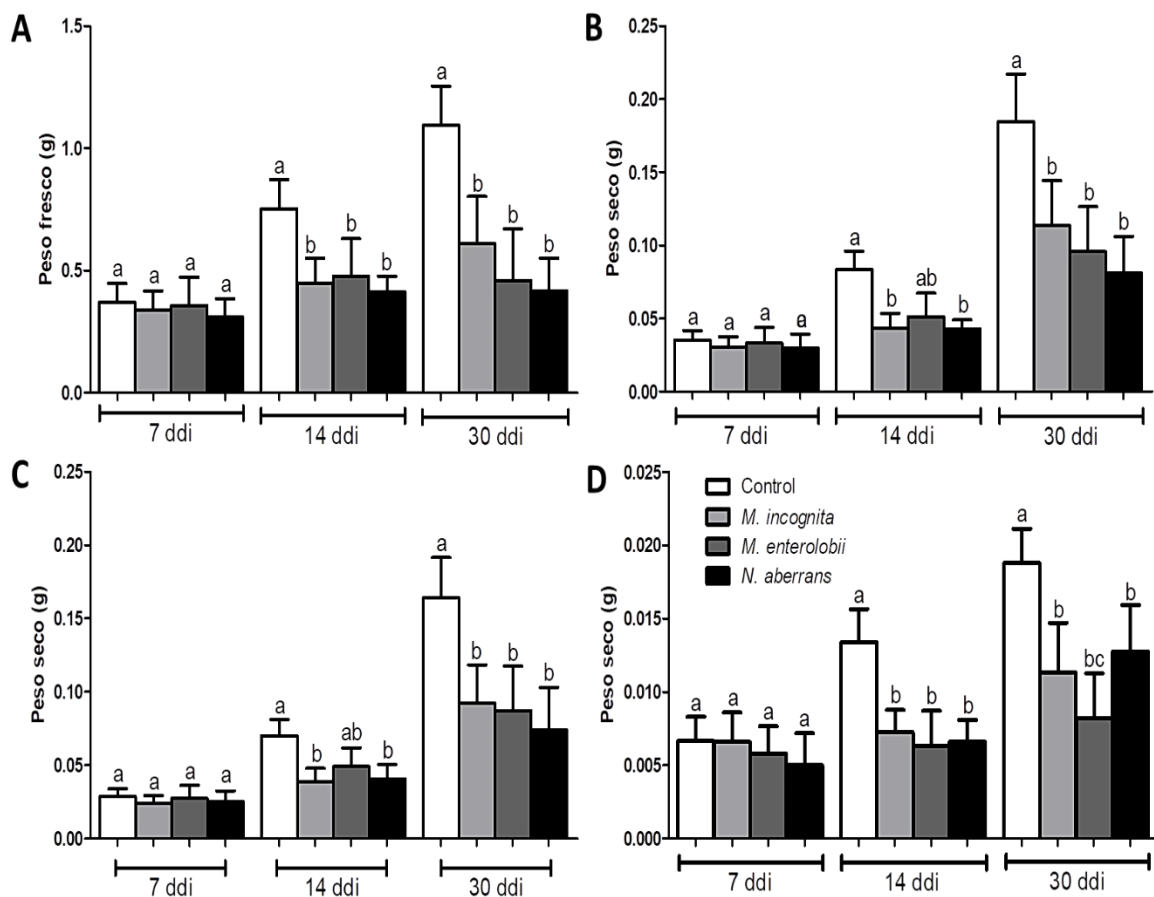


**Figura 8. Agallamiento inducido por nematodos agalladores en plántulas de *A. thaliana* infectada con nematodos agalladores.** Plántulas de *A. thaliana* de 21 días de edad inoculadas con 500 J2 de *M. enterolobii* (Me) y *M. incognita* (Mi), los tiempos de muestreo se realizaron a los 2, 7, 14 y 30 días después de la inoculación (ddi), **A)** Agalla inducida por *M. enterolobii* en raíz de *A. thaliana*, **B)** Agalla inducida por *M. enterolobii* en raíz de *A. thaliana* y **C)** Número de agallas inducidas por *M. enterolobii* (Me) y *M. incognita* (Mi) a los 30 ddi. Las barras representan el promedio de una  $n= 12 \pm$  la desviación estándar, las barras con letras diferentes indican grupos con diferencias significativas, Prueba de *t*-student  $p \leq 0.001$ .

### 2.3.3 Crecimiento vegetal de plántulas de *A. thaliana* infectadas por nematodos agalladores

Además de evaluar el número de nematodos y el estadio prevaleciente dentro de raíz, se determinó el efecto de la infección del nematodo sobre el crecimiento y desarrollo

de la plántula hospedera, para lo cual se determinó la biomasa fresca y seca a diferentes tiempos post-inoculación (Fig. 9). Se observó que a los 7 ddi la plántula no presentó diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, a 14 ddi todas las plántulas infectadas con nematodos presentaron una menor biomasa fresca con respecto al control, con una disminución mayor del 40 % para todos los tratamientos. *N. aberrans* fue la especie que mostró un mayor efecto sobre el crecimiento con una reducción del 45.22 % a los 14 ddi y del 61.87 % a los 30 ddi con respecto al control; aunque no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos *M. incognita*, *M. enterolobii* y *N. aberrans* (Fig. 9A).



**Figura 9. Efecto sobre crecimiento de plántulas de *A. thaliana* en respuesta a infección por nematodos agalladores.** Plántulas de *A. thaliana* de 21 días de edad inoculadas con 500 J2 de *N. aberrans* y *M. enterolobii*, los tiempos de muestreo se realizaron a los 2, 7, 14 y 30 días después de la inoculación (ddi). **A)** Peso fresco total, **B)** Peso seco total, **C)** Peso seco de follaje y **D)** Peso seco de raíz. Las barras representan el promedio de una  $n = 12 \pm$  la desviación estándar, las barras con letras diferentes indican grupos con diferencias significativas,  $p \leq 0.001$ .

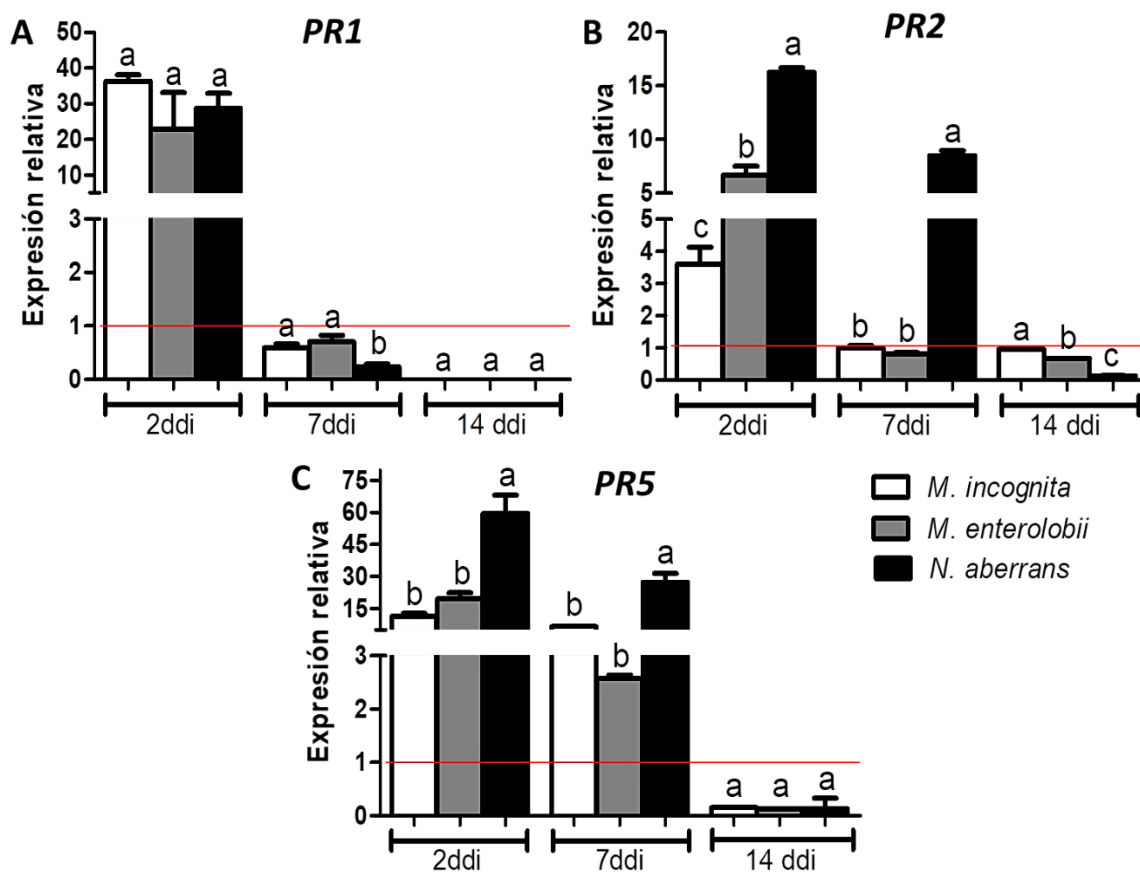
El análisis de biomasa seca total mostró la misma tendencia a la observada en biomasa fresca (Fig. 9 B, C y D). Al comparar la biomasa seca de la parte aérea se observó que a los 7 ddi los diferentes tratamientos no mostraron diferencias estadísticas significativas en comparación con el control. A los 14 ddi las plantas infectadas *M. enterolobii*, *M. incognita* y *N. aberrans* mostraron una reducción del 45 % en desarrollo de la planta con respecto del control sin inóculo. A los 30 ddi en los tratamientos con *M. enterolobii*, *M. incognita* y *N. aberrans* se presentó una reducción de la biomasa seca mayor al 47 % con respecto a las plantas control, sin encontrarse diferencias significativas entre las plántulas infectadas (Fig. 9 C). Al analizar los datos de biomasa seca de raíz, las plántulas infectadas con *M. enterolobii* presentaron una disminución del 56 % en comparación con las plántulas control (Fig. 9 D). De acuerdo con los datos de biomasa fresca y seca, las especies de nemátodos *M. enterolobii*, *M. incognita* y *N. aberrans* evaluados afectan de manera negativa crecimiento de *A. thaliana*.

#### **2.3.4 Expresión de PRs asociados a la ruta del ácido salicílico en raíz de plántulas de *A. thaliana* infectadas con nematodos agalladores**

Con el objetivo de evaluar la participación del ácido salicílico durante la interacción planta-nematodo agallador, se realizó el análisis de expresión de genes marcadores de resistencia asociados a la ruta de ácido salicílico (*PR1*, *PR2* y *PR5*) en plántulas de *A. thaliana* infectadas con nematodos agalladores. Los análisis de expresión de los genes *PRs* en el tejido radical mostraron una mayor expresión en la etapa inicial de la infección (2 ddi) para posteriormente disminuir sus niveles y llegar a una represión en la etapa tardía (7 y 14 ddi) (Fig. 10). A los 2 ddi la expresión de *PR1* fue estadísticamente similar entre tratamientos inoculados con *M. incognita*, *M. enterolobii* y *N. aberrans*. A los 7 ddi *PR1* fue reprimido por todos los nematodos, con respecto a las plantas sin inóculo, donde *N. aberrans* indujo una mayor represión con respecto a los tratamientos de *M. enterolobii* y *M. incognita*. A los 14 ddi se observó una represión del gen *PR1* en todos los tratamientos infectados con nematodos agalladores en comparación con las plantas no inoculadas (Fig. 10 A).

Al analizar los resultados de expresión en raíz de *A. thaliana* de *PR2*, a los 2 ddi con los nematodos, fue expresado en todos los tratamientos con respecto del control sin inocular, con diferencias estadísticas entre los tres tratamientos (Fig. 10 B). También a los 2 ddi *N. aberrans* indujo el mayor nivel de expresión, al presentar una expresión del 348.98 % en comparación con el tratamiento *M. incognita*; donde el tratamiento *M. enterolobii* presentó 84.43 % mayor expresión con respecto al tratamiento de *M. incognita*. A los 7 ddi se observó la disminución en los niveles de expresión de *PR2* con *M. enterolobii* y mayor expresión en *N. aberrans*, mientras el tratamiento *M. incognita* presentó el nivel basal, donde los tratamientos de *M. incognita* y *M. enterolobii* no presentaron diferencias estadísticas entre sí. A 14 ddi la expresión de *PR2* en el tratamiento *M. incognita* presentó un nivel basal, mientras que en los tratamientos *M. enterolobii* y *N. aberrans* fue reprimido con un nivel de expresión menor del 28.79 y 85.86 %, respectivamente con respecto del tratamiento sin inocular.

Los transcritos de *PR5* en raíz de plántulas de *A. thaliana*, mostraron una mayor expresión al inicio de la infección (2ddi y 7ddi), para disminuir y ser reprimido a los 14 ddi (Fig. 10 C). La expresión de *PR5* en los tratamientos de *M. incognita* y *M. enterolobii* fueron estadísticamente iguales a los diferentes tiempos evaluados. El tratamiento *N. aberrans* indujo una mayor expresión de *PR5* a los 2 ddi con 424.97% y a los 7 ddi con 318.7% mayor nivel de expresión que el tratamiento control sin inóculo, siendo estadísticamente diferente a los niveles inducidos por *M. incognita* y *M. enterolobii*. Para los 14 ddi todos los tratamientos mostraron un nivel de expresión menor al basal, sin diferencias estadísticas entre los tratamientos. Observándose que la expresión de *PR5* mostró la misma tendencia en los tratamientos de *M. incognita* y *M. enterolobii*.



**Figura 10. Expresión relativa de genes marcadores de resistencia local asociados a la ruta del ácido salicílico en raíz de plántulas de *A. thaliana*.** Plántulas de *A. thaliana* de 21 días de edad inoculadas con 500 J2. **A)** Expresión relativa de *PR1*, **B)** Expresión relativa de *PR2* y **C)** Expresión relativa de *PR5*. Las barras representan el promedio de una  $n=4 \pm$  la desviación estándar de los cambios transcripcionales de plantas infectadas con respecto a plantas no infectadas (Línea roja). Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos.

### 2.3.5 Expresión de PRs asociados a la ruta del ácido salicílico en follaje de plántulas de *A. thaliana* infectada con nematodos agalladores

Así mismo se llevaron a cabo análisis de expresión de *PR1*, *PR2* y *PR5* en follaje de *A. thaliana* para evaluar la SAR inducida por la infección de nematodos agalladores, donde al analizar la expresión de genes *PR* asociados a la ruta del ácido salicílico en *A. thaliana*, se encontraron diferencias estadísticas en la expresión de los genes evaluados en follaje, en etapas tempranas de la infección (2ddi), la mayor expresión

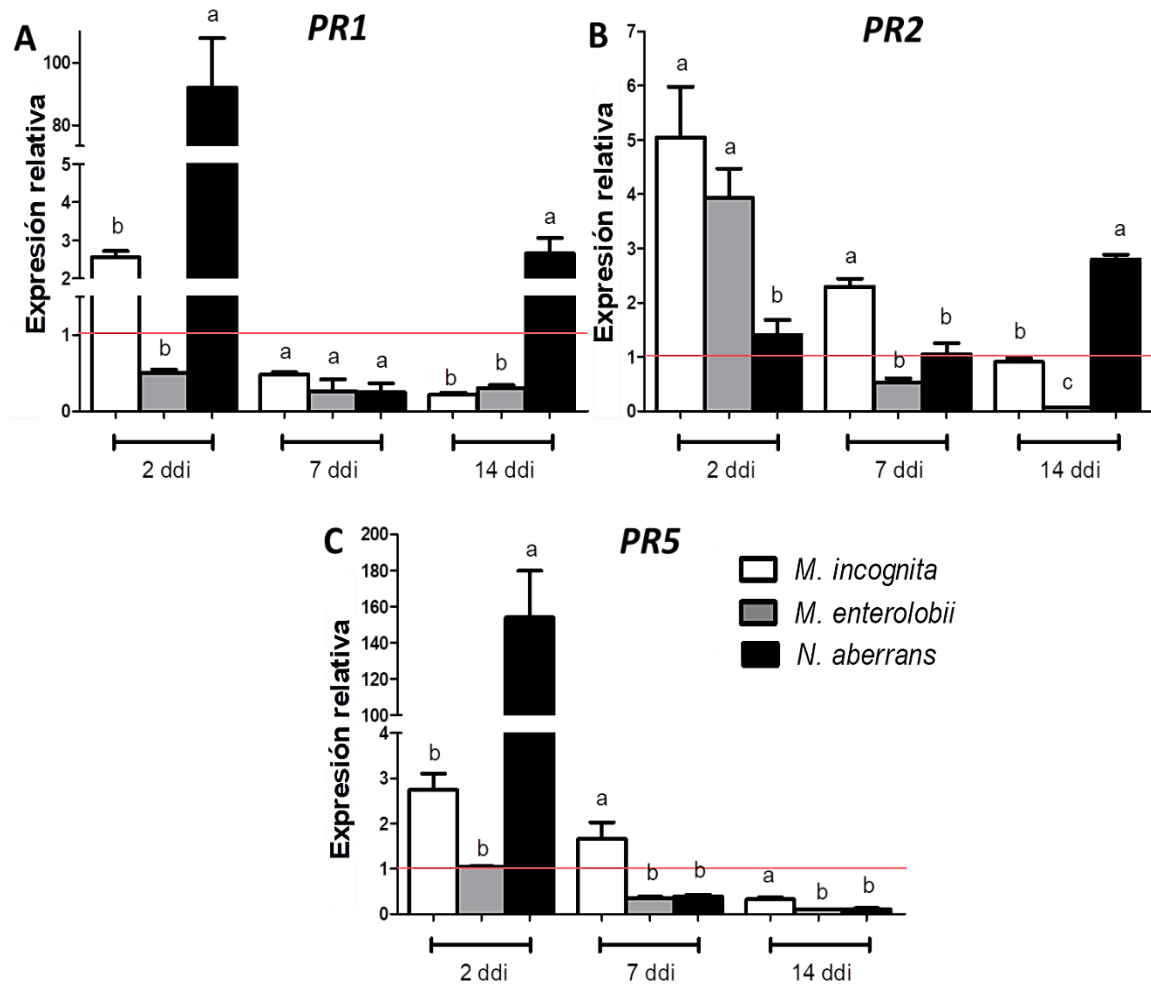
de *PR1* fue presentada por las plantas infectadas con *N. aberrans*, las cuales mostraron una expresión de 894.7 % con respecto a los niveles de expresión observados en las plántulas infectadas con *M. incognita* (interacción compatible conocida), las plántulas infectadas con *M. enterolobii* a los 2 ddi presentaron una expresión de *PR1* siendo 2.04 veces menor con respecto a las plantas control sin inóculo. Sin embargo, con las dos especies de *Meloidogyne* la expresión de *PR1* en *A. thaliana* fue reprimida a los 7 y 14 ddi. Para el caso del tratamiento con *N. aberrans*, *PR1* fue reprimido a los 7 ddi y expresado a los 14 ddi con una expresión de 244 % con respecto al control no inoculado (Fig. 10 A).

Al analizar la expresión de *PR2* en follaje con los diferentes nemátodos, a los 2 ddi, las plantas infectas con las dos especies de *Meloidogyne* presentaron una sobreexpresión, sin diferencias significativas entre sí, en el caso de las plántulas infectadas con *N. aberrans* no mostraron alteración en la expresión de este gen. A los 7 ddi las plántulas infectadas con *M. incognita* presentaron sobreexpresión de *PR2*, donde las plántulas infectadas con *M. enterolobii* y *N. aberrans*, presentaron diferencias de 177 y 125 % menos con respecto a las plantas infectas con *M. incognita*. A los 14 ddi las plantas infectadas con *M. incognita* presentaron expresión basal de *PR2*, mientras que el tratamiento con *M. enterolobii* presentó una expresión, con una expresión del 84 % menos que el tratamiento con *M. incognita*, a este tiempo de evaluación solo el tratamiento con *N. aberrans* presentó 189 % mayor con respecto al tratamiento control no inoculado (Fig. 10 B).

En la evaluación de la expresión de *PR5* en follaje de *A. thaliana*, a los 2 ddi el gen fue expresado en los tratamientos con *M. incognita* y *N. aberrans*, donde la mayor expresión de este gen fue presentada por el tratamiento con *N. aberrans* a los 2 ddi, con un nivel 1,512.4 % mayor con respecto a las plantas tratadas con *M. incognita*. Mientras que el tratamiento con *M. enterolobii* mostró un nivel basal y no presentó diferencia significativa con respecto al tratamiento con *M. incognita*. A los 7 ddi todos los tratamientos presentaron una disminución en la expresión de *PR5*, que fue reprimido en las plantas inoculadas con *M. enterolobii* y *N. aberrans*, con una expresión



menor de 132 y 127 % con respecto al tratamiento *M. incognita*. A los 14 ddi todos los tratamientos presentaron la represión de *PR5* (Fig. 10 C).



**Figura 11. Expresión relativa de genes marcadores de RSA asociados a la ruta del ácido salicílico en el follaje de plántulas de *A. thaliana*.** Plántulas de *A. thaliana* de 21 días de edad inoculadas con 500 J2. **A)** Expresión relativa de *PR1*, **B)** Expresión relativa de *PR2* y **C)** Expresión relativa de *PR5*. Las barras representan el promedio de una  $n= 4 \pm$  la desviación estándar de los cambios transcripcionales de plantas infectadas con respecto a plantas no infectadas (Línea roja). Las letras indican diferencias significativas entre tratamientos.

## 2.4 DISCUSIÓN

Los nematodos agalladores, tienen la capacidad de inducir cambios fisiológicos, morfológicos y transcripcionales en la planta hospedera, esto se ha confirmado con el uso de diferentes plantas modelo (Jones *et al.*, 2013; Goverse y Smant, 2014). En el presente trabajo se evaluó el mecanismo de interacción entre diferentes especies de nematodos agalladores con *A. thaliana*. Se confirmó que *M. incognita* presenta una interacción compatible, al encontrarse a los 30 ddi hembras maduras en la raíz y una nueva generación infectiva (J2) (Fig. 6 y 7) lo cual coincide con lo reportado por Sijmons *et al.*, (1991), quien reportó que *A. thaliana* era un buen modelo para el estudio de la interacción compatible planta-nematodo, al interactuar con especies del género *Meloidogyne* y *Heterodera*. Además, el número de ingresos totales (Fig. 5) concuerda con lo reportado por Teillet *et al.*, (2013), quien reportó un promedio de 8 individuos por planta de *M. incognita*, a los 2, 3 y 4 ddi, además se comprobó una interacción compatible de *M. incognita* con *A. thaliana*, lo cual fue demostrado por la presencia de hembras maduras y una segunda generación infectiva (J2) a los 30 ddi en la raíz (Fig. 6 y 7). Un comportamiento similar en la duración del ciclo de vida de este nematodo fue reportado a los 20 ddi por Sousa *et al.*, (2017). En el caso de *N. aberrans*, éste solo alcanzó el estadio J4 en *A. thaliana* a los 30 ddi, sugiriendo una interacción incompatible, esto de acuerdo con evaluaciones llevadas a cabo en plántulas de *A. thaliana* en las cuales se observó que a los 65 ddi sólo se encontró la presencia del estadio J4 en las raíces confirmándose la interacción incompatible, ya que *N. aberrans* no logra alcanzar los estadios adultos, ni producción de huevecillos Sijmons *et al.*, 1991; Méndez 2013).

El desarrollo de la infección mostró un número reducido de los estadios juveniles J2 a los 2 ddi para todas las especies (Fig. 5), indicando que el proceso de migración está en sus etapas iniciales, pues se ha encontrado que el proceso de migración puede darse a los 5 ddi en especies como *M. enterolobii* (Sousa *et al.*, 2017). A los 7 ddi las especies mostraron el mayor número de individuos para posteriormente disminuir su población a los 14 ddi (Fig. 5), en el caso de *N. aberrans* este suceso se puede atribuir al comportamiento migratorio que presentan los estadios J2, J3 y J4, inclusive las

hembras en estado inmaduro (Fig. 6 y 7), el mismo comportamiento fue observado de los 14 a los 30 ddi, además se ha determinado que el estadio J2 es el más activo (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Manzanilla-López, 2010). Por su parte, en especies como *M. enterolobii*, al alcanzar su estado adulto los machos migran al exterior de la raíz, reduciendo la población inicial (Fig. 5), esto de acuerdo con lo reportado por Abad *et al.*, (2008) y por Abad y Williamson (2010), quienes afirman una vez que se da el proceso de diferenciación sexual únicamente las hembras permanecen en el interior de la raíz de la planta hospedera.

No obstante, se ha determinado que las especies de *Meloidogyne* pueden completar su ciclo de vida en un periodo de 20 a 40 ddi, dependiendo de las condiciones ambientales y el tipo de hospedero, en este estudio se observó un incremento de las poblaciones de *M. incognita* y *M. enterolobii* a los 30 ddi con respecto a los 14 ddi, lo cual indicó la presencia de una nueva generación infectiva al completar su ciclo en *A. thaliana* (Fig. 5, 6 y 7), demostrando que las especies de *Meloidogyne* completan su ciclo de vida tres semanas después de la inoculación (Escobar *et al.*, 2015). Manteniéndose constante la población de *M. incognita* (Fig. 5), como resultado de una baja competencia por las fuentes de alimento, favoreciendo la diferenciación sexual en hembras, por lo cual, su población no varía durante el periodo de 7 y 14 ddi, observándose un incremento a los 30 ddi la cual es generada por la nueva generación estadios J2 en la raíz (Goverse y Smant, 2014). Con respecto a *M. enterolobii*, ésta mostró mayor agresividad y virulencia al presentar un mayor número de individuos y agallas en las raíces de *A. thaliana*, en comparación con *M. incognita* (Fig. 5 y 8), lo cual se puede asociar con la capacidad de *M. enterolobii* para infectar plantas que presentan genes de resistencia contra especies del género *Meloidogyne* como *M. incognita*, al modificar la defensa del hospedero, dando lugar a una mayor virulencia y agresividad (Branch *et al.*, 2004; Kiewnick *et al.*, 2009; Chitambo *et al.*, 2016). Por su parte, *N. aberrans* no indujo desarrollo de agallas en *A. thaliana*, como resultado de una interacción incompatible (Fig. 5 y 6), pues no se encontró la presencia de hembras inmaduras, estadio responsable de inducir los sitios especializados de alimentación, durante una interacción compatible de *N. aberrans* con especies vegetales como

*Solanum tuberosum*, donde *N. aberrans* logra desarrollar nuevas generaciones infectivas (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Villar-Luna *et al.*, 2009; Manzanilla-López, 2010; Eves-van den Akker *et al.*, 2014; Villar-Luna *et al.*, 2017).

Durante el desarrollo de la infección, la inducción de los sitios especializados de alimentación por parte de las especies de *Meloidogyne* y el necrosamiento del tejido radical de la planta hospedera debido al comportamiento migratorio de los estadios de *N. aberrans*, se ve comprometido el transporte de nutrientes en la planta afectando su crecimiento (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Jammes *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2013; Kyndt *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2015). Por lo cual se evaluó la biomasa fresca y seca de *A. thaliana*, donde se observó que todas las especies evaluadas afectaron el crecimiento y desarrollo de la planta hospedera (Fig. 9 y 10).

Los nematodos agalladores, inducen cambios fisiológicos en distintos procesos de la planta hospedera, como el transporte celular, síntesis de proteínas, metabolismo central, ciclo celular, defensa, entre algunos otros; esto como resultado de la liberación de diferentes efectores, los cuales son inoculados en la planta hospedera, permitiendo que la infección prospere (Branch *et al.*, 2004; Jammes *et al.*, 2005; Abad *et al.*, 2008; Teillet *et al.*, 2013). Los efectores liberados por los nematodos logran manipular los mecanismos de defensa, modificando la respuesta a las diferentes fitohormonas involucradas en la defensa de la planta, siendo el ácido salicílico una de las principales fitohormonas asociadas a la defensa contra especies como *M. incognita*, *M. graminícola* y *H. schachtii* (Branch *et al.*, 2004; Abad y Williamson, 2010; Hewezi y Baun, 2017). Al evaluar la expresión de genes marcadores de resistencia local y sistémica de la ruta del ácido salicílico (*PR1*, *PR2* y *PR5*) en *A. thaliana* infectada con *M. incognita*, *M. enterolobii* y *N. aberrans*. En el análisis de la respuesta local en el tejido radical, mostró que los genes evaluados tienen una mayor expresión en etapas tempranas de la infección, para posteriormente disminuir a niveles inferiores a los basales (Fig. 10). El comportamiento mostrado por *PR1* en las tres especies es congruente con lo reportado por otros estudios realizados, donde se ha demostrado que, en la interacción compatible, *PR1* se sobre-expresa al inicio de la infección. Se

ha demostrado que en la interacción incompatible nematodo-planta, los niveles de transcritos de *PR1* son superiores a los mostrados en una interacción compatible, se ha reportado que genes de resistencia (como *Hero A*, *Mi-1*), están directamente relacionados con el nivel de expresión de *PR1* y por tanto con los niveles de ácido salicílico (Sobczak *et al.*, 2005; Molinari *et al.* 2014). Esto indica que la respuesta dependiente de salicílico a través de *PR1* juega un papel clave en la respuesta de defensa de la planta en etapas tempranas de la infección con nematodos agalladores, como parte de los mecanismos de defensa de la planta para evitar la instalación de nematodos a través de la actividad antimicrobiana de *PR1*, donde el nivel de expresión puede determinar la susceptibilidad de la planta hospedera (Branch *et al.*, 2004; Sobczak *et al.*, 2005; Molinari *et al.*, 2014). Sin embargo, otros autores reportan que la mayor expresión de *PR1* fue a los 8 y 9 ddi en interacciones compatibles planta-nematodo (*M. incognita*-*A. thaliana* y *H. schachtii*-*A. thaliana*), pues el desarrollo del nematodo afecta el comportamiento de la expresión génica de la planta hospedera (Hamamouch *et al.*, 2011; Escobar *et al.*, 2015). Es importante señalar que el tiempo de análisis de la expresión, es afectado por la dinámica de señalización entre la ruta del ácido salicílico y el antagonismo con la ruta del ácido jasmónico (Solano y Gimenez-Ibanez, 2013). Esta respuesta puede cambiar no solo en días de la interacción, sino en horas, para favorecer el desarrollo e inducción del sitio de alimentación del nematodo en una interacción compatible, o impedir el desarrollo en una interacción incompatible (Jones y Dangl, 2006).

De esta manera como parte de la respuesta de defensa mediada por el ácido salicílico se da la expresión de genes como *PR2*, que codifica para  $\beta$ -1,3-glucanasa, la cual participa en los procesos de defensa de las plantas mediada por ácido salicílico, se reporta su expresión durante el proceso de migración de los J2, para posteriormente ser reprimido en etapas tardías de la infección, durante una interacción compatible planta-nematodo, lo cual concuerda con lo observado en los tratamientos de *M. incognita* y *M. enterolobii* (Fig. 12 B), esto ha sido reportado durante la interacción de *A.thaliana*-*H. schachtii* donde *PR2* es expresado 5 ddi, encontrado en estado basal a los 9 ddi y reprimido 14 ddi (Hamamouch *et al.*, 2012). Esto debido a que los

nematodos agalladores como *M. enterolobii* y *M. incognita* producen efectores como el Mi-CRT con capacidad de suprimir la respuesta de defensa asociada a la ruta del ácido salicílico vía PAD4, la cual está asociada con la respuesta de defensa dependiente de ácido salicílico, por lo que su supresión favorece el proceso de infección al disminuir los niveles de ácido salicílico, esto durante la inducción y desarrollo de los sitios especializados de alimentación (Jaouannet *et al.*, 2013). Las plantas de *A. thaliana* en interacción con *N. aberrans* mostraron expresión de *PR1* y *PR5* en la raíz a los 2 y 7 ddi, con tendencias similares a las observadas con *M. incognita* y *M. enterolobii*, solo fue diferente en la expresión de *PR2*, donde la expresión fue más alta, la cual podría estar limitando el establecimiento del nematodo generando así la interacción incompatible, pues se ha determinado que durante la inducción del sitio especializado de alimentación en la interacción de *A. thaliana*-*H. schachtii*, hay una deposición de la calosa alrededor del estilete, estructura que sirve como filtro para la toma de nutrientes de la célula por parte del nematodo, sin embargo la  $\beta$ -1,3-glucanasa puede degradar la calosa impidiendo el establecimiento del nematodo al limitar la toma de nutrientes (Hamamouch *et al.*, 2012).

La expresión local en la raíz de *A. thaliana* de *PR5*, el cual codifica para proteínas similares a la taumatina, a la cual se le atribuyen propiedades microbianas, se ha reportado que ocurre durante las primeras horas de la infección con nematodos y que posteriormente disminuye a niveles basales (Sobczak *et al.*, 2005), lo cual concuerda con el comportamiento mostrado en todos los experimentos evaluados. Este mismo comportamiento fue observado durante la interacción de *A. thaliana* con *H. schachtii*, donde *PR5* se expresa en etapas tempranas de la infección (Kammerhofer y Radakovic, 2015). En contraste con lo reportado por Wubben *et al.*, (2008) y Hamamouch *et al.*, (2011) quienes reportan que la mayor expresión de *PR5* a los 8 y 9 ddi en la interacción compatible de *M. incognita*-*A. thaliana* y *H. schachtii*-*A. thaliana*. Sin embargo, se ha reportado que *PR5* no muestra diferencia significativa en su expresión al comparar una interacción compatible y una incompatible, lo cual sugiere que podría no estar involucrada en los procesos de defensa contra nematodos agalladores (Sobczak *et al.*, 2005).

Los resultados en conjunto de los diferentes genes evaluados en la raíz de *A. thaliana*, no presentaron diferencias significativas entre tratamientos, principalmente al comparar el tratamiento de *M. enterolobii* con el de *M. incognita*, por lo cual, la alta agresividad presentada por *M. enterolobii* al mostrar un mayor número de individuos en raíces de plántulas de *A. thaliana* en comparación con la población de *M. incognita*, lo cual podría atribuirse a una mayor capacidad para suprimir los mecanismos de defensa a nivel post-transcripcional (Gheysen y Mitchum, 2011; Hamamouch *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015). Esto puede estar asociado con lo reportado por Hamamouch *et al.*, (2012) quienes demostraron que *H. schachtii* es capaz de suprimir la actividad de enzimas como  $\beta$ -1,3-glucanasa a través de la excreción del efector 30CO2, el cual interactúa directamente con la  $\beta$ -1,3-glucanasa inhibiendo su actividad.

Por otro parte, durante los procesos de interacción planta-patógeno, se ha demostrado que la respuesta de defensa no se da únicamente de forma local, sino que ésta se trasmite a tejidos de la planta aun no infectados, de este modo durante los procesos de infección por organismos biotróficos como los nematodos, la planta es capaz de desarrollar resistencia sistémica adquirida, la cual está asociada con la ruta del ácido salicílico. En este sentido se analizaron los genes marcadores de resistencia sistémica adquirida *PR1*, *PR2* y *PR5* en plántulas de *A. thaliana* infectadas con *M. incognita*, *M. enterolobii* y *N. aberrans*. Los resultados mostraron que estos genes se expresaron diferencialmente al inicio de la evaluación dependiendo de la especie de nematodo evaluada, en etapas tempranas de la infección (2 ddi) y se reprimen en etapas tardías (14 ddi) en el follaje de *A. thaliana* (Fig. 11). El tratamiento con *M. incognita* mostró que *PR1* tiene una mayor expresión a los 2 ddi, el cual es posteriormente reprimido a los 7 y a los 14 ddi (Fig. 11 A). Lo anteriormente descrito concuerda con otros estudios realizados, donde se ha demostrado que el gen *PR1* se expresa en etapas tempranas de la infección durante la interacción compatible de *H. schachtii*-*A. thaliana* y *M. incognita*-*S. lycopersicum*; y en etapas tardías este gen es reprimido (Wubben *et al.*, 2008; Hewezi *et al.*, 2010; Molinari *et al.*, 2014). Sin embargo, Hamamouch *et al.*, (2011), reportaron que durante la interacción de *M. incognita*-*A. thaliana*, la expresión

de este gen permanece reprimida desde etapas tempranas de la infección, dichas diferencias que pueden estar asociadas con el sistema de evaluación *in vitro* empleado, esto debido a que la composición del medio puede afectar en comportamiento del nematodo, pues el medio empleado en esta evaluación fue medio MS mientras que en nuestra evaluación utilizamos un sustrato arena-Peat moss y fertilizante triple 18 (Escobar *et al.*, 2015). Los resultados encontrados, en las plántulas infectadas con *M. incognita* y *N. aberrans* presentaron mayor expresión de *PR1* en etapas tempranas de la infección (2 ddi); sin embargo, las plantas infectadas con *M. enterolobii* presentaron represión de *PR1* desde etapas tempranas de la infección (Fig. 11 A), lo que indica una mayor capacidad de este nematodo para suprimir de forma sistémica los mecanismos de defensa de la planta hospedera, lo cual puede estar asociado con la capacidad de *M. enterolobii* para suprimir los mecanismos de plantas resistentes contra las principales especies del género *Meloidogyne* (Jones *et al.*, 2013; Goverse y Smant, 2014; Hewezi y Baun; 2017)

En la interacción *A. thaliana*-*M. incognita*, los transcritos de *PR2* y *PR5* presentaron una mayor expresión al inicio de la infección y se reprimieron en etapas tardías (Fig. 11 B y C). Esto puede ser asociado con la capacidad de especies de *Meloidogyne* para suprimir los mecanismos de defensa asociados a la ruta de ácido salicílico, al afectar genes asociados a la síntesis y señalización del ácido salicílico como *ISC*, *PAL* y *NPR1*, que se expresan en etapas tempranas de la infección y se reprimen en etapas posteriores en una interacción compatible; mientras que en una interacción incompatible estos genes son expresados (Kyndt *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2016). En contraste con lo reportado por Hamamouch *et al.* (2011), donde se encontró que los genes *PR2* y *PR5*, se encuentran por debajo de los niveles basales en el follaje de *A. thaliana* durante el desarrollo de la infección de *M. incognita*, estas diferencias pueden ser resultados del sistema *in vitro* anteriormente mencionado (Escobar *et al.*, 2015). Por su parte los resultados muestran que *M. enterolobii* presenta una mayor capacidad para suprimir la defensa sistémica dependiente de salicílico de *A. thaliana*, en comparación con los niveles de expresión inducidos por *M. incognita* (Fig. 11 B y C), lo que podría explicar su alta agresividad y virulencia, pues se ha demostrado que *M.*



*enterolobii* presenta la capacidad de infectar plantas que presentan resistencia contra *M. incognita*, como especies del género *Solanum* y *Capcicum*, pues su análisis transcripcional demuestra una mayor diversidad de genes expresados durante los procesos de infección, asociados con la producción de enzimas hidrolasas, producción de sideróforos y enzimas que participan en la degradación de compuestos fenólicos y esteroides, ente algunos otros (Kiewnick *et al.*, 2009).

La supresión de los genes evaluados de forma local y sistémica a partir de los 7 ddi, además de la supresión de la defensa a través de efectores como Mi-CRT, Mi-CM-3 y 30CO2, podría ser resultado de la inducción de los mecanismos de defensa asociados a la ruta del ácido jasmónico o a la expresión de genes asociados con la producción de auxinas, inducidos por el nematodo durante la formación del sitio de alimentación, favoreciendo el desarrollo de la infección (Solano y Gimenez-Ibanez, 2013; Li *et al.*, 2015; Kyndt *et al.*, 2016). Pues se ha demostrado, que en los procesos de interacción compatible es necesario que se mantenga intacta la ruta del ácido jasmónico, mientras que el ácido salicílico es necesario para la activación de los mecanismos de defensa en plantas resistentes que presentan genes de resistencia como *Mi-1* (Bhattarai *et al.*, 2008; Gutjahr y Paszkowski, 2009). Sin embargo, también se ha demostrado que genes asociados a la ruta de ácido jasmónico intervienen en los procesos de defensa contra nematodos agalladores durante la inducción de los sitios especializados de alimentación, por lo que la defensa puede estar mediada a través de pulsos entre estas dos fitohormonas, donde el ácido salicílico, pueda estar implicado con en los procesos de defensa durante la etapa de migración, mientras que el ácido jasmónico podría estar implicado durante la inducción de los sitios especializados de alimentación (Pieterse *et al.*, 2009, Kumar, 2014; Fan *et al.*, 2015).

Por lo cual, es necesario llevar a cabo un análisis de forma conjunta del ácido salicílico y jasmónico en procesos de interacción compatible e incompatible, así como de los principales genes marcadores. Para evaluar cómo es modulada la defensa por estas dos fitohormonas de forma conjunta durante una interacción incompatible y cómo

manipula el nematodo la asociación entre estas dos fitohormonas en una interacción compatible.

## 2.5 CONCLUSIÓN

Los nematodos *M. incognita* y *M. enterolobii* presentan una interacción compatible con *A. thaliana*, donde *M. enterolobii* presenta alta agresividad y virulencia en comparación con *M. incognita*, lo cual puede estar asociado con su capacidad para reprimir la expresión de los genes *PR1*, *PR2* y *PR5* de forma sistémica y de *PR5* de forma local. En contraste con *N. aberrans*, donde la respuesta de defensa de *A. thaliana* mediada por ácido salicílico podría estar condicionando la resistencia a través de la expresión de *PR2*.

## 2.6 REFERENCIAS

- Abad, P., & Williamson, V. M. (2010). Plant nematode interaction a sophisticated dialogue. *In Advances in botanical research*, 53, 147-192.
- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J. M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G., Deleury, E., & Caillaud, M. C. (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature biotechnology*, 26(8), 909-915.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology Plant* (5 Edition ed.). Burlington, USA: Elsevier Academic Press.
- Bhattarai, K. K., Mantelin, S., Bishnoi, U., Girke, T., Navarre, D. A., & Kaloshian, I. (2008). Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(9), 1205-1214.
- Branch, C., Hwang, C. F., Navarre, D. A., & Williamson, V. M. (2004). Salicylic acid is part of the *Mi-1*-mediated defense response to root-knot nematode in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(4), 351-356.
- Branch, C., Hwang, C. F., Navarre, D. A., & Williamson, V. M. (2004). Salicylic acid is part of the *Mi-1*-mediated defense response to root-knot nematode in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(4), 351-356.
- Bybd Jr, D. W., Kirkpatrick, T., & Barker, K. R. (1983). An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, 15(1), 142-143.
- Cabrera, V. A., Dottori, N., & Doucet, M. E. (2017). Histopathology of roots of three tomato cultivars infected with two separate isolates of the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology*, 148(2), 393-403.
- Chávez-Avilés, M. N., Andrade-Pérez, C. L., & de la Cruz, H. R. (2013). PP2A mediates lateral root development under NaCl-induced osmotic stress throughout auxin redistribution in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil*, 368, 591–602.
- Chitambo, O., Haukeland, S., Fiaboe, K. K., Kariuki, G. M., & Grundler, F. M. (2016). First Report of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne enterolobii* Parasitizing African Nightshades in Kenya. *Plant Disease*, 100(9), 1954-1954.

- Escobar, C., Barcala, M., Cabrera, J., & Fenoll, C. (2015). Overview of root-knot nematodes and giant Cells. En C. Escobar, *Advances in botanical research* (Vol. 73, págs. 1-32). London: Elsevier Ltd.
- Eves-van den Akker, S., Lilley, C. J., Danchin, E. G., Rancurel, C., Cock, P. J., Urwin, P. E., & Jones, J. T. (2014). The transcriptome of *Nacobbus aberrans* reveals insights into the evolution of sedentary endoparasitism in plant-parasitic nematodes. *Genome biology and evolution*, 6(9), 2181–2194.
- Fan, J. W., Hu, C. L., Zhang, L. N., Li, Z. L., Zhao, F. K., & Wang, S. H. (2015). Jasmonic acid mediates tomato's response to root knot nematodes. *Journal of plant growth regulation*, 34(1), 196-205.
- Gheysen, G., & Mitchum, M. G. (2011). How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Current opinion in plant biology*, 14(4), 415-421.
- Goverse, A., & Smant, G. (2014). The activation and suppression of plant innate immunity by parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, 52, 243-265.
- Gutjahr, C., & Paszkowski, U. (2009). Weights in the balance: jasmonic acid and salicylic acid signaling in root-biotroph interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(7), 763-772.
- Hamamouch, N. L., Hwezi, T., Baum, T. J., Mitchum, M. G., Hussey, R. S., & Davis, E. L. (2012). The interaction of the novel 30C02 cyst nematode effector protein with a plant  $\beta$ -1, 3-endoglucanase may suppress host defence to promote parasitism. *Journal of experimental botany*, 63(10), 3683-3695.
- Hamamouch, N., Li, C., Seo, P. J., Park, C. M., & Davis, E. L. (2011). Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 355-364.
- Hwezi, T., & Baun, T. (2017). Communication of sedentary plant-parasitic nematodes with their host plants. *Advances in Botanical Research*, 82, 305-324.
- Hwezi, T., Howe, P. J., Maier, T. R., Hussey, R. S., Mitchum, M. G., Davis, E. L., & Baum, T. J. (2010). *Arabidopsis* spermidine synthase is targeted by an effector protein of the cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Plant physiology*, 152(2), 968-984.

- Hofmann, J., & Grundler, F. M. (2007). Identification of reference genes for qRT-PCR studies of gene expression in giant cells and syncytia induced in *Arabidopsis thaliana* by *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Nematology*, 9(3), 317-323.
- Holbein, J., Grundler, F. M., & Siddique, S. (2016). Plant basal resistance to nematodes: an update. *Journal of experimental botany*, 67(7), 2049-2061.
- Jammes, F., Lecomte, P., Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M. L., Renou, J. P., & Favery, B. (2005). Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 44(3), 447-458.
- Jaouannet, M., Magliano, M., Arguel, M. J., Gourgues, M., Evangelisti, E., Abad, P., & Rosso, M. N. (2013). The root-knot nematode calreticulin Mi-CRT is a key effector in plant defense suppression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(1), 97-105.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 203.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G., & Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946-961.
- Kammerhofer, N., & Radakovic, Z. (2015). Role of stress-related hormones in plant defence during early infection of the cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 207(3), 778-789.
- Kammerhofer, N., Egger, B., Dobrev, P., Vankova, R., Hofmann, J., Schausberger, P., & Wiczorek, K. (2015). Systemic above and belowground cross talk: hormonebased responses triggered by *Heterodera schachtii* and shoot herbivores in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 66(22), 7005–7017.
- Kammerhofer, N., Radakovic, Z., Regis, J. M., Dobrev, P., Vankova, R., Grundler, F. M., & Wiczorek, K. (2015). Role of stress-related hormones in plant defence during early infection of the cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 207(3), 778–789.

- Kiewnick, S., Dessimoz, M., & Franck, L. (2009). Effects of the Mi-1 and the N root-knot nematode-resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. *Journal of nematology*, 41(2), 134–139.
- Kumar, D. (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. *Plant Science*.
- Kumari, C., Dutta, T. K., Banakar, P., & Rao, U. (2016). Comparing the defence-related gene expression changes upon root-knot nematode attack in susceptible versus resistant cultivars of rice. *Scientific reports*, 6, 22846.
- Kyndt, T., Denil, S., Haegeman, A., Trooskens, G., Bauters, L., Crieckinge, W., & Gheysen, G. (2012). Transcriptional reprogramming by root knot and migratory nematode infection in rice. *New Phytologist*, 196(3), 887-900.
- Kyndt, T., Goverse, A., Haegeman, A., Warmerdam, S., Wanjau, C., Jahani, M., & Gheysen, G. (2016). Redirection of auxin flow in *Arabidopsis thaliana* roots after infection by root-knot nematodes. *Journal of experimental botany*, 65(15), 4559-4570.
- Kyndt, T., Vieira, P., Gheysen, G., & de Almeida-Engler, J. (2013). Nematode feeding sites: unique organs in plant roots. *Planta*, 238(5), 807-818.
- Li, R., Rashotte, A. M., Singh, N. K., Weaver, D. B., Lawrence, K. S., & Locy, R. D. (2015). Integrated signaling networks in plant responses to sedentary endoparasitic nematodes: a perspective. *Plant cell reports*, 34(1), 5-22.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Manzanilla-López, & H., R. (2010). Speciation within *Nacobbus*: consilience or controversy? *Nematology*, 12(3), 321-334.
- Manzanilla-López, ., R., C. M., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R. N., Lehman, P. S., & Evans, K. (2002). The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica*, 32(2), 149-228.
- Manzanilla-López, R. H., C. M., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R. N., Lehman, P. S., & Evans, K. (2002). The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda:

- Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica*, 32(2), 149-228.
- Martínez-Medina, A., Fernández, I., Lok, G. B., Pozo, M. J., Pieterse, C. M., & Van Wees, S. (2017). Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytologist*, 213(3), 1363–1377.
- Méndez, C. (2013). *Arabidopsis thaliana* un modelo en el estudio de expresión de los genes *Col1*, *PDF1. 2* y *PR2* en la interacción compatible e incompatible con *Nacobbus aberrans*. Tesis para como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias. México: Colegio de Posgraduados.
- Molinari, S., Fanelli, E., & Leonetti, P. (2014). 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(3), 255-264.
- Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5(5), 308-316.
- Sijmons, P., Grundler, F., Mende, N., Burrows, P., & Wyss, U. (1991). *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant-parasitic nematodes. *The Plant Journal*, 1(2), 245-254.
- Sobczak, M., Avrova, A., Jupowicz, J., Phillips, M. S., Ernst, K., & Kumar, A. (2005). Characterization of susceptibility and resistance responses to potato cyst nematode (*Globodera* spp.) infection of tomato lines in the absence and presence of the broad-spectrum nematode resistance *Hero* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(2), 158-168.
- Solano, R., & Gimenez-Ibanez, S. (2013). Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. *Frontiers in plant science*, 4, 72.
- Sousa, A. D., Pedrosa, E., Régis, M., Silva, C. U., Castro, J., & Ribeiro, J. (2017). Penetration, development, and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on *Psidium* species and induced cellular responses in the roots. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39(2), 1-10.



- Teillet, A., Dybal, K., Kerry, B. R., Miller, A. J., Curtis, R. H., & Hedden, P. (2013). Transcriptional changes of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in response to *Arabidopsis thaliana* root signals. *PLoS One*, 8(4), e61259.
- Villar-Luna, E., Gómez-Rodríguez, O., Rojas-Martínez, R. I., & Zavaleta-Mejía, E. (2016). Presence of *Meloidogyne enterolobii* on Jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sinaloa, Mexico. *Helminthologia*, 53(3), 155-160.
- Villar-Luna, E., Reyes-Trejo, B., Rojas-Martínez, R. I., Gómez-Rodríguez, O., Hernández-Anguiano, A. M., & Zavaleta-Mejía, E. (2009). Respuesta hipersensitiva en el follaje de chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* infectado con *Nacobbus aberrans*. *Nematofica*, 39(1), 143-155.
- Villar-Luna, E., Rojas-Martínez, R. I., Reyes-Trejo, B., Gómez-Rodríguez, O., & Zavaleta-Mejía, E. (2017). Mevalonate pathway genes expressed in chilli CM334 inoculated with *Phytophthora capsici* and infected by *Nacobbus aberrans* and *Meloidogyne enterolobii*. *European Journal of Plant Pathology*, 1-15.
- 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(3), 49-51.
- Wubben, M. J., Jin, J., & Baum, T. J. (2008). Cyst Nematode Parasitism of *Arabidopsis thaliana* Is Inhibited by Salicylic Acid (SA) and Elicits Uncoupled SA-Independent Pathogenesis-Related Gene Expression in Roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(4), 424-432.
- Ye, W. M., Koenning, S. R., Zhuo, K., & Liao, J. L. (2015). First report of *Meloidogyne enterolobii* on cotton and soybean in North Carolina, United States. *Phytopathology*, 105(9), 1245-1249.