



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional
CIIDIR IPN Unidad Michoacán

**EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE RESISTENCIA SISTÉMICA
INDUCIDA EN *Arabidopsis thaliana* INFECTADA POR NEMATODOS
AGALLADORES**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Presenta:

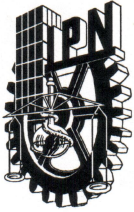
Paula Itzel Bautista Ortega

Directores:

Dr. Edgar Villar Luna

M. en C. Ignacio García Ruíz

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:

Expresión de genes marcadores de resistencia sistémica inducida en *Arabidopsis thaliana* infectada por nematodos agalladores

Presentada por el alumno:

Bautista

Ortega

Paula Itzel

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre

Con registro:

B	1	6	1	2	6	0
---	---	---	---	---	---	---

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

M. en C. Ignacio García Ruíz

Dr. Edgar Villar Luna

Dr. Carlos Méndez Inocencio

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

Dra. María Valentina Angoa Pérez

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



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
Instituto Politécnico Nacional
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR - IPN - U. MICH.



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 Paula Itzel Bautista Ortega alumno (a) del Programa de **Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable** con número de registro B161260, 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. Edgar Villar Luna y el Mtro. Ignacio García Ruíz y cede los derechos del trabajo intitulado **“EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE RESISTENCIA SISTÉMICA INDUCIDA EN *Arabidopsis thaliana* INFECTADA 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: edgar_villarled@yahoo.com, garinacho@gmail.com, o paula_baor26@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Paula Itzel Bautista Ortega

Agradecimientos

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral del Estado de Michoacán (CIIDIR) y al Instituto Politécnico Nacional (IPN), por permitirme continuar con mis estudios al formar parte de su comunidad estudiantil y por otorgarme la beca BEIFI que fue de gran ayuda para la culminación de los mismos.

A mis asesores el Dr. Edgar Villar Luna, Dr. Carlos Méndez Inocencio y al M. en C. Ignacio García Ruíz, por darme la oportunidad de participar en este proyecto, del cual aprendí mucho, así como por brindarme todo su apoyo y su conocimiento durante todo este tiempo.

A los integrantes de mi comité tutorial por hacer tan enriquecedoras las horas que pasamos durante las reuniones de evaluación.

A Irving Hernández Hernández por su apoyo durante el tiempo que duró la maestría, y por ser parte de mi vida.

A mis compañeros por los buenos momentos que pasamos, disfrutando de las diferentes clases durante estos dos años, también a mis maestros pues gracias a ellos adquirí nuevos conocimientos que tuvieron a bien compartirme.

Y al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca durante estos dos años, con la cual pude continuar con mis estudios de posgrado y culminarlos de forma satisfactoria, además por el apoyo para el desarrollo de este trabajo de tesis como parte de proyecto “Respuesta transcripcional inducida en *Arabidopsis thaliana* durante la infección por nematodos agalladores” (Proyecto No. 251671).

A todos ellos gracias

Dedicatoria

A mi familia mi mayor apoyo
A Irving mi compañero y motivación

Contenido

CAPITULO 1: REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1. Nematodos fitoparásitos.....	1
1.1.1. <i>Meloidogyne</i> spp.....	1
1.1.2. Taxonomía.....	3
1.1.3. Ciclo de vida y sintomatología	4
1.1.4. <i>Nacobbus aberrans</i>	6
1.1.5. Taxonomía.....	7
1.1.6. Ciclo de vida y sintomatología	8
1.2. Modificaciones transcripcionales inducidas por nematodos agalladores	10
1.3. Resistencia sistémica adquirida e inducida.....	12
1.3.1. Proteínas relacionadas con patogénesis.....	15
1.4. <i>A. thaliana</i> como modelo en el estudio de la interacción planta-nematodo	16
1.5. Literatura citada.....	18
CAPÍTULO 2. EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE RESISTENCIA SISTÉMICA INDUCIDA EN <i>Arabidopsis thaliana</i> INFECTADA POR NEMATODOS AGALLADORES	25
Resumen	25
Abstrac.....	27
2.1. Introducción.....	29
2.2. Materiales y métodos.....	31
2.2.1. Material vegetal	31
2.2.2. Preparación del sustrato y trasplante	31
2.2.3. Obtención de inóculo e inoculación con nematodos agalladores	32
2.2.4. Experimentos	32

2.2.4.1. Desarrollo de nematodos agalladores en raíces de <i>A. thaliana</i>	32
2.2.4.2. Expresión génica.....	33
2.2.4.2. Extracción de RNA, síntesis de cDNA, y PCR en tiempo real	33
2.2.6. Análisis estadístico	34
2.3. Resultados.....	35
2.3.1. Desarrollo de nematodos agalladores (NAGs) en raíces de <i>A. thaliana</i>	35
2.3.2. Expresión relativa de genes <i>PRs</i> en raíces de <i>A. thaliana</i> inoculadas con NAGs	39
2.3.3. Expresión relativa de genes <i>PRs</i> en follaje de <i>A. thaliana</i> inoculada con NAGs.....	41
2.4. Discusión	43
2.5. Conclusiones.....	48
2.6. Literatura citada.....	49

Lista de figuras

Figura 1. Distribución geográfica de <i>Meloidogyne incognita</i>	2
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Meloidogyne enterolobii</i>	3
Figura 3. Ciclo de vida del nematodo endoparásito <i>Meloidogyne</i> spp.....	5
Figura 4. Distribución geográfica de <i>Nacobbus aberrans</i>	6
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Nacobbus</i> en papa.....	9
Figura 6. Modelo que representa la red de señalización coordinada, conduce la inducción sistémica en respuesta a la invasión de <i>Meloidogyne</i>	14
Figura 7. Ciclo de vida de <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
Figura 8. Plantas de <i>A. thaliana</i> crecidas en diferentes proporciones de sustrato.....	35
Figura 9. Desarrollo de <i>Mi</i> , <i>Me</i> y <i>Na</i> en raíces de <i>A. thaliana</i> a diferentes dpi.....	36
Figura 10. Numero de nematodos (<i>M. incognita</i> , <i>M. enterolobii</i> , y <i>N. aberrans</i>) en raíces de <i>A. thaliana</i>	37
Figura 11. Proporción de estadios presentes en raíces de <i>A. thaliana</i> a diferentes tiempos post-inoculación con los diferentes NAGs.....	38
Figura 12. Numero de agallas en raíces de <i>A. thaliana</i> infectadas con <i>Mi</i> y <i>Me</i> a 30 dpi.....	39
Figura 13. Niveles de expresión de genes marcadores de RSI y de ácido jasmónico en raíces de <i>A. thaliana</i> a diferentes tiempos post-inoculación con NAGs.....	40
Figura 14. Niveles de expresión de genes marcadores de RSI y de ácido jasmónico en el follaje de <i>A. thaliana</i> a diferentes tiempos post-inoculación con NAGs.....	42

Lista de cuadros

Cuadro 1. Clasificación de proteínas relacionadas con la patogénesis.....	15
Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados en el análisis por PCR en tiempo real.....	34

CAPITULO 1: REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Nematodos fitoparásitos

Los nematodos fitoparásitos (NFP) son organismos multicelulares, la mayoría son vermiformes, pero las hembras adultas de algunas especies son fusiformes o periformes (Abad y McCarter, 2011). Se caracterizan principalmente por presentar un estilete. Se han descrito cerca de 4100 especies diferentes de NFP, los cuales provocan diversos daños a plantas cultivables y silvestres. Los NFP se dividen en ectoparásitos migratorios y sedentarios, y en endoparásitos migratorios y sedentarios (Eves-van den Akker *et al.*, 2014). Los endoparásitos sedentarios comprenden a los nematodos que se enquistan (ej. *Globodera* y *Heterodera*) y a los agalladores (*Meloidogyne* spp. y *Nacobbus aberrans*) (Williamson y Gleason, 2003; Eves-van den Akker *et al.*, 2014). Los agalladores inducen hipertrofia e hiperplasia de las células que se constituyen en un sitio especializado de alimentación (células gigantes y sincitios) (Gheysen y Mitchum, 2008).

1.1.1. *Meloidogyne* spp.

Los nematodos agalladores (NAGs) constituyen el grupo de mayor relevancia económica (por los daños que ocasionan) y científica (por su marcada especialización parasítica) (Tirumalaraju *et al.*, 2011). *Meloidogyne* spp. pueden ocasionar pérdidas económicas devastadoras superiores a los 125 000 millones de dólares en todo el mundo. este género es el más importante por su distribución, rango de hospedantes y los daños que ocasiona en las plantas cultivadas (Chitwood, 2003). En las hortalizas frecuentemente muestra altas poblaciones y predomina sobre otros nematodos fitoparásitos (Ornat *et al.*, 2001). *Meloidogyne* induce células gigantes multinucleadas (CGM), las cuales le proveen los nutrimentos necesarios para su crecimiento y reproducción (Jammes *et al.*, 2005; Kyndt *et al.*, 2014). Se han reportado aproximadamente 60 especies de *Meloidogyne*, siendo las más relevantes en la horticultura *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, y *M. hapla* (Martínez *et al.*, 2014).

M. incognita es capaz de infectar la raíz de un gran número de plantas de interés agrícola, este es posiblemente el nematodo que provoca más daños en la mayoría de los cultivos, es un parásito sedentario obligado, que guarda una íntima relación con su hospedante (Abad *et al.*, 2008). Se ha reportado en áreas de agricultura protegida alrededor del mundo, incluso en áreas con nevadas suaves (Fig. 1) (CABI¹, 2017).

Otra especie de nematodos que ocasiona pérdidas en los cultivos, y que sin embargo hasta ahora no se le ha dado la importancia necesaria es *M. enterolobii*. Actualmente, la distribución de *M. enterolobii* se ha incrementado, detectándose en diferentes áreas geográficas (Fig. 2) y atacando a una amplia gama de hospedantes (Carneiro *et al.*, 2011). Se reportan pérdidas económicas devastadoras en algunas partes del mundo, tal es el caso de Brasil, en cultivos de guayaba ocasionando pérdidas de cerca de 61 millones de dólares (Carneiro *et al.*, 2011). Recientemente fue detectado en México en cultivos de sandía, jitomate y chile (Martínez *et al.*, 2015; Villar-Luna *et al.*, 2016). *M. enterolobii* es altamente agresivo y tiene la habilidad parasítica para establecerse exitosamente en plantas portadoras de genes de resistencia a *M. incognita*, *M. arenaria* y *M. javanica*, (especies comunes de agalladores) (Kiewnick, *et al.*, 2009). Su presencia se considera de gran importancia debido a su distribución geográfica creciente y al amplio rango de hospedantes, así como a una alta patogenicidad en las plantas resistentes, superando el efecto de los genes *Mil* en jitomate y genes *N* en chile (Brito *et al.*, 2007).

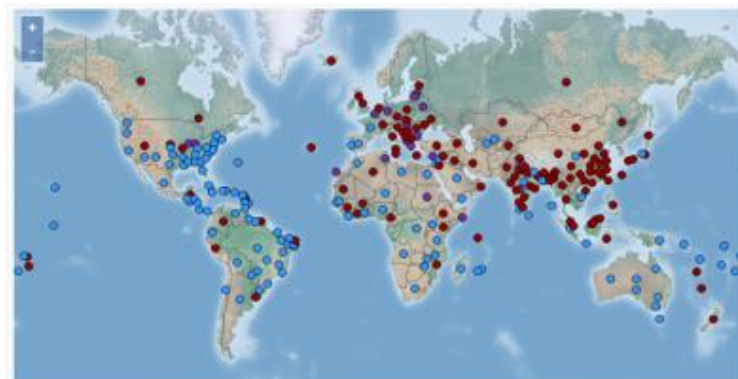


Figura 1. Distribución geográfica de *M. incognita*; ● Presente (sin documentar), ● Extendido, ● Localizado (Cabi, 2017).

¹ Centre for Agriculture and Biosciences International

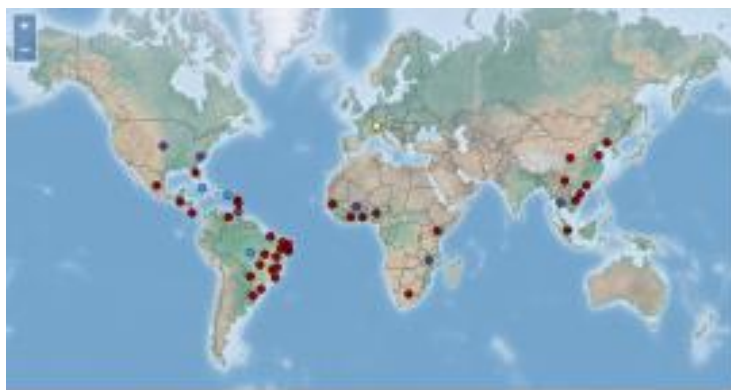


Figura 2. Distribución geográfica de *M. enterolobii*; ● Informes ocasionales o pocos ● Presente (sin documentar), ● Extendido, ● Localizado (Cabi, 2017).

Meloidogyne spp. es cosmopolita, por tanto, es el grupo de mayor importancia económica por su distribución, así como por el daño que ocasiona a sus hospedantes. En México se han presentado reducciones en la producción de algunos cultivos de un 30 a 100 % por la presencia de este nematodo (Abad *et al.*, 2008). Algunos de los cultivos de interés económico más afectados por *Meloidogyne* spp. son jitomate (*Solanum lycopersicum*), calabacita (*Cucurbita pepo*), pepino (*Cucumis sativus*), chile (*Capsicum annum*), maíz (*Zea mays*), papa (*Solanum tuberosum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), entre otros (Cardona *et al.*, 2016).

1.1.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica de *Meloidogyne* se simplifica de la forma siguiente (Escobar *et al.*, 2015):

Dominio: Eucariota

Reino: Metazoa

Phylum: Nematoda

Clase: Chromadorea

Subclase: Chromadoria

Orden: Rhabditida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Heteroderidae

Subfamilia: Meloidogyninae

Género: *Meloidogyne*

Especie: - *enterolobii*= *mayaguensis*

- *incognita*

1.1.3. Ciclo de vida y sintomatología

El ciclo de vida de *Meloidogyne* puede durar entre 3 y 6 semanas, dependiendo de las condiciones ambientales como la temperatura, y en menor grado de la humedad del suelo y del tipo de hospedante (Jaouannet *et al.*, 2012; Escobar *et al.*, 2015). El ciclo comienza con el huevecillo, posteriormente pasa por cuatro etapas larvarias antes de convertirse en adulto (Bridge y Starr, 2007). Los huevecillos son depositados por las hembras en una masa gelatinosa en la corteza de la raíz, la masa puede contener hasta 1000 huevecillos, el primer estadio larval (J1) se desarrolla dentro del huevo, emerge de este como segundo estadio (J2) por un orificio que hace con su estilete, cuando el J2 detecta las condiciones ambientales favorables abandona el huevo y la masa gelatinosa (Bridg y Starr, 2007; Caillaud *et al.*, 2008).

Una interacción compatible comienza cuando el J2 (única fase infectiva de este nematodo) penetra la raíz por las células meristemáticas y migra intercelularmente a las células del cilindro vascular, cada J2 selecciona de entre 5 y 8 células parenquimatosas de la raíz para formar la (Célula Gigante de *Meloidogyne*) CGM (Abad *et al.*, 2008). El nematodo inyecta distintos efectores y provoca diversos cambios transcripcionales en la célula lo que la vuelve hiperactivamente metabólica, provocando que pase por muchos procesos de endorreduplicación por lo que dan como resultado a la CGM (Fawole, 1988; Abad *et al.*, 2008; Caillaud *et al.*, 2008). Después de la inducción de la CGM, el J2 comienza a alimentarse y a desarrollarse, aquí sufre la segunda muda y pasa al tercer estadio (J3), al término de esta etapa pasa al cuarto estadio (J4) donde comienza el proceso de diferenciación sexual (Bridge y Starr, 2007; Caillaud *et al.*, 2008). Los machos son escasos presentando solo una gónada, sin embargo, cuando tienen dos es debido a que se desarrolló a partir de una larva hembra producto de algún efecto medioambiental lo que incrementa su número (Papadopoulou y Traintaphyllou, 1982). Los machos migran fuera de la raíz y no cumplen una función dentro del proceso de reproducción pues para el género *Meloidogyne* spp. la reproducción se da por

partenogénesis (Caillaud *et al.*, 2008). Por otro lado, las hembras permanecen incrustadas en la raíz donde terminan su desarrollo alimentándose de la CGM, su cuerpo crece y se vuelve esférico. Por último comienza con la ovoposición de los huevecillos en la corteza de la raíz en una masa gelatinosa (Fig. 3) (Davis *et al.*, 2008; Gheysen y Mitchum., 2011).

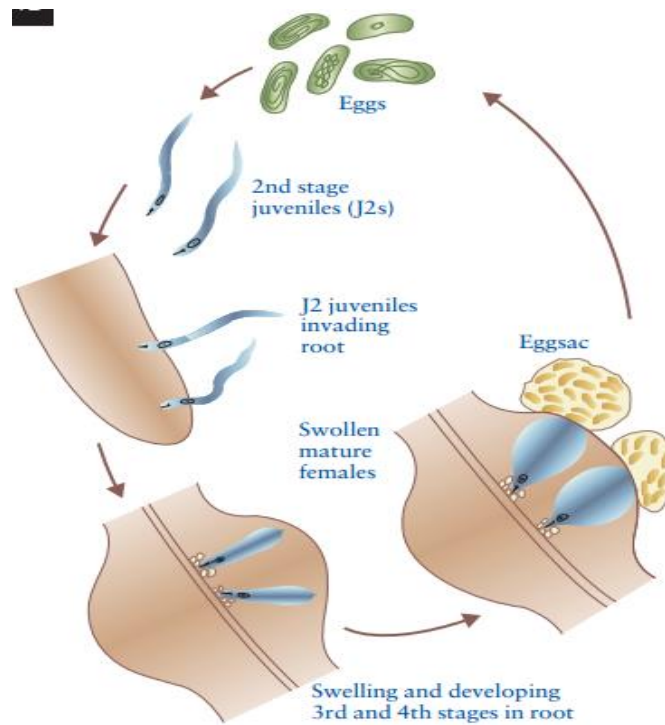


Figura 3. Ciclo de vida de *Meloidogyne* spp. (Bridge y Starr, 2007).

Los síntomas del ataque por *Meloidogyne* spp. se pueden dividir en subterráneos y en observables en la parte aérea, los primeros son efecto directo del ataque por el nematodo y se presentan como hinchazones en las raíces conocidas como agallas, estas agallas poseen un diámetro de dos a tres veces mayor que el de las raíces sanas, también presentan lesiones, manchas necróticas y zonas en pudrición, debido a la instalación de los nematodos en los cilindros vasculares, de igual manera, se producen síntomas indirectos en la parte aérea, como marchitez, clorosis, deficiencia en el crecimiento, bajo rendimiento y estos se pueden confundir con enfermedades inducidas por hongos, bacterias, virus o por deficiencias nutricionales (Cardona-Piedrahíta *et al.*, 2016).

1.1.4 *Nacobbus aberrans*

A diferencia de *Meloidogyne*, *N. aberrans* combina estrategias migratorias y sedentarias (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Este nematodo es considerado como uno de los mayores obstáculos para la producción de papa en la región andina, por los daños cualitativos y cuantitativos que ocasiona (Castiblanco *et al.*, 2016). Este nematodo está adaptado a un amplio rango de condiciones climáticas y su ciclo de vida está altamente influenciado por la temperatura (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2013). Se encuentra distribuido desde el nivel del mar, hasta los 4000 msnm (Fig. 4), se considera endémico de América y se reporta en ambientes secos y semiáridos (Lax *et al.*, 2013). En América del norte se encuentra en Estados Unidos y México, en América del sur en Argentina, Bolivia, Ecuador, Perú y Chile (Eves-van den Akker *et al.*, 2014). En México se ha localizado en estados como Oaxaca, Coahuila, Estado de México, Hidalgo, Morelos, San Luis Potosí, Guanajuato, Zacatecas y Tlaxcala, afectando principalmente cultivos de jitomate (*Solanum lycopersicum*), Frijol (*Phaseolus vulgaris*) y chile (*Capsicum annuum*) (Cid del prado, 1993; Jones *et al.*, 2013).

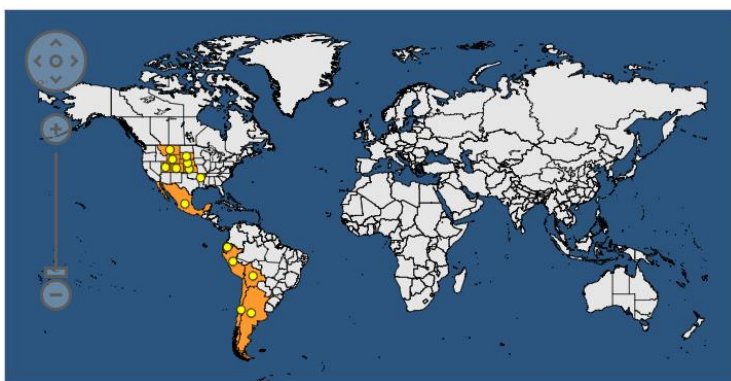


Figura 4. Distribución geográfica de *N. aberrans* (EPPO², 2017).

La importancia de *N. aberrans* deriva de su alta capacidad reproductiva, así como su amplio rango de hospedantes, el daño inducido en las raíces es localmente denominado como “jicamilla” en varios de los cultivos más importantes, como son chile, jitomate, remolacha azucarera y frijol (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Eves-van den Ekker *et al.*, 2014). Las

²European and Mediterranean Plant Protection Organization

mayores pérdidas ocasionadas por este nematodo se reportan en la zona andina con un rendimiento de 36 % y 55 % en frijol y jitomate respectivamente (Lax *et al.*, 2011).

Los daños que provoca son cuantitativos, como la disminución o pérdida del rendimiento, así como cualitativos ya que afectan la calidad de los tubérculos para el caso de la papa, el efecto negativo varía de acuerdo a la densidad de los nematodos en el suelo, a la variedad del cultivo, las condiciones climáticas y del mismo suelo y los daños se incrementan anualmente debido a la infestación en el campo, la cual es cada vez mayor (Eves-van den Akker *et al.*, 2014). El nematodo se puede diseminar al quedar adherido a las herramientas de trabajo, animales, vehículos, así como con el agua y viento, el principal medio de diseminación de *Nacobbus* en el suelo es por el uso de tubérculos infectados (Eves-van den Akker *et al.*, 2014; Franco *et al.*, 2016) y su control se considera insatisfactorio, debido a la falta de información relacionada con este nematodo. Además, se ha demostrado que puede permanecer en el suelo en un estado de reposo, pues al establecer siembras en campo se determinó que los estadios J3 y J4 pudieron sobrevivir durante 12 meses conservando su capacidad para infectar (Martínez *et al.*, 2010; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2011).

1.1.5. Taxonomía

La clasificación taxonómica de *N. aberrans* es según Escobar *et al.* (2015):

Dominio: Eucariota

Reino: Metazoa

Phylum: Nematoda

Clase: Chromadorea

Subclase: Chromadoria

Orden: Rhabditida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Pratylenchidae

Subfamilia: Nacobbinae

Género: *Nacobbus*

Especie: - *aberrans*

1.1.6. Ciclo de vida y sintomatología

El ciclo de vida comprende las etapas de huevecillo, cuatro juveniles (J1, J2, J3 y J4), y una etapa adulta (hembra y macho) (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Eves-van den Akker *et al.*, 2014). El ciclo comienza cuando las hembras depositan los huevos sobre una masa gelatinosa, el J1 muda dentro del huevo una semana después de la primera división celular a una temperatura óptima de 20 °C, el J1 eclosiona como J2, este penetra la raíz causando necrosis, y puede permanecer ahí o salir y volver a ingresar, la migración está condicionada por la temperatura a temperaturas bajas se reduce el movimiento del nematodo (Eves-van den Akker *et al.*, 2014; Castiblanco *et al.*, 2016).

El J2 puede mudar dentro o fuera de la raíz y pasar al J3, este es menos activo y puede permanecer en la corteza de la raíz, en un principio es similar al J2 pero tiende a tomar forma de C conforme se alimenta, la muda al J4 también puede ocurrir en la corteza o dentro de la raíz y tanto J3 como J4 son muy similares, lo que los diferencia es el desarrollo gonádico ya que en el J4 este se podrá observar más desarrollado; posteriormente las hembras inmaduras migran a través de la raíz, provocando necrosis inicial y se establecen en el cilindro vascular, donde inician la formación del (Sitio Especializado de Alimentación) SEA conocido como sincitio, e inicia la última muda a hembra adulta, la hembra adulta es la que produce los huevos y los deposita en la superficie de la raíz (Fig. 5) (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Eves-van den Akker *et al.*, 2014; Castiblanco *et al.*, 2016). Los machos migran en la raíz con el fin de localizar a las hembras y fertilizarlas.

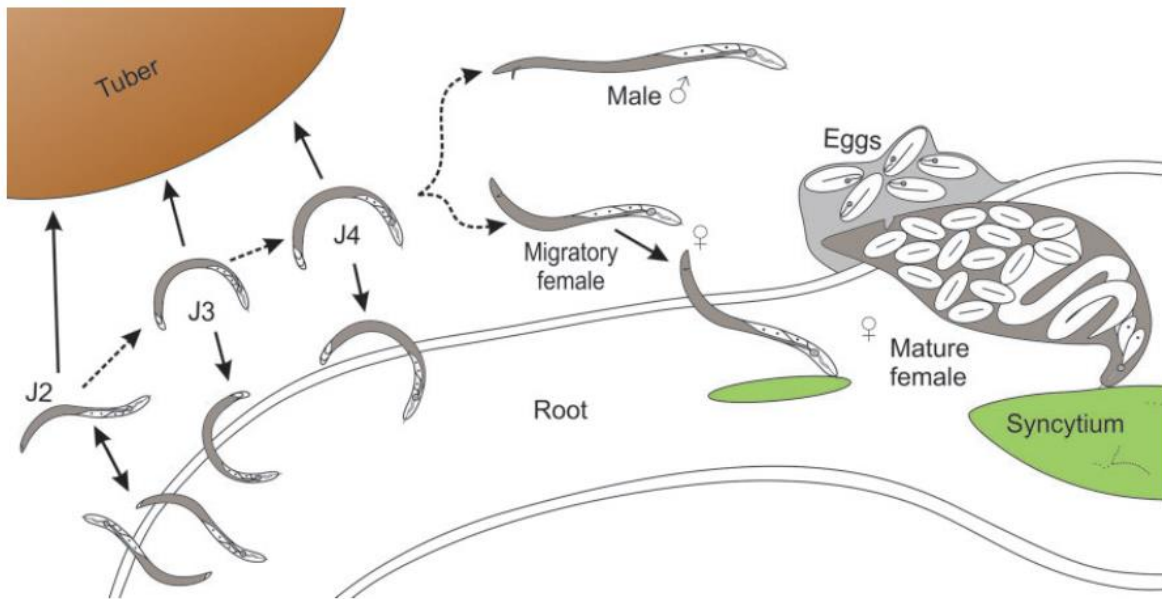


Figura 5. Ciclo de vida de *N. aberrans*. Las flechas discontinuas representan las transiciones a través del ciclo de vida, mientras que las flechas sólidas representan el movimiento del nematodo. (Eves-van den Akker *et al.*, 2014).

El ciclo de vida en tubérculos es un poco diferente comparado con el de plantas no tuberosas, debido a que los tubérculos se cosechan y se almacenan para una posterior siembra. Se ha reportado que *N. aberrans* tiene la capacidad de sobrevivir por lapsos largos de tiempo al incrustarse en las lenticelas de los tubérculos cultivables o silvestres y reanudar su etapa infectiva una vez se encuentre en las condiciones favorables para su desarrollo (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Se ha observado que una vez que las hembras inmaduras se forman, pueden salir de la raíz en la que se encuentran y atacar raíces adyacentes o de plantas vecinas con el fin de asegurar su desarrollo y la supervivencia de la nueva generación de nematodos (Eves-van den Akker, *et al.*, 2014). Los síntomas característicos del ataque por *N. aberrans* se pueden dividir en 2: síntomas subterráneos y aquellos que se observan por encima del suelo, Los síntomas subterráneos son: la formación de las agallas, la disminución del número de raíces y de pelos radiculares, así como el acortamiento de las raíces, lo que dificulta el trasloque de nutrientes y de agua, esto da como resultado los síntomas observables por encima del suelo, que son reducción del crecimiento apical, clorosis, marchitez y reducción significativa en el rendimiento (Valle, 2001; Manzanilla-López *et al.*, 2002).

1.2. Modificaciones transcripcionales inducidas por nematodos agalladores

Los NAGs establecen una relación íntima con sus hospedantes, estos inducen una rediferenciación en las células de la raíz para formar el SEA, la formación de este sitio es esencial para su alimentación, crecimiento y reproducción (Caillaud *et al.*, 2008). Por ejemplo, *Meloidogyne* spp. han desarrollado diversas estrategias que les permite inducir la formación de las CGM en miles de especies diferentes de plantas, manipulando los elementos fundamentales del desarrollo de las células vegetales (Hussey y Grundler, 1998). La hipertrofia e hiperplasia de las células que se constituyen en el SEA produce la formación de la agalla en la raíz, provocando además diversos cambios en la expresión génica del hospedante (Caillaud *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2011).

Una de las principales señales de la inducción de la CGM es la activación del ciclo celular, las células se vuelven multinucleadas y se agrandan, estas células se expanden por crecimiento isotrópico y pueden alcanzar un tamaño de aproximadamente 400 veces el de las células vasculares normales (Back *et al.*, 2002; Caillaud *et al.*, 2008). Las CGM contienen un citoplasma muy denso que contiene grandes cantidades de mitocondrias, plastos, ribosomas, un aparato de Golgi muy desarrollado y un retículo endoplasmático liso plegado (Tirumalaraju *et al.*, 2011). La vacuola desaparece para dar lugar a numerosas vacuolas pequeñas que tendrán la función de almacenar solutos desde el xilema (Back *et al.*, 2002). Así las CGM maduras son metabólicamente hiperactivas y actúan como transferencia para la alimentación del nematodo (Back *et al.*, 2002; Tirumalaraju *et al.*, 2011). Cuando se da el inicio de la formación del SEA se originan diversas señales moleculares producto de las secreciones inyectadas por los nematodos con ayuda de su estilete, las cuales juegan un rol crucial en el parasitismo (Jammes *et al.*, 2005). Para la formación del SEA es un prerrequisito que ocurran cambios transcripcionales dramáticos en el hospedante, esto usualmente involucra la sobre-expresión de genes cuyos productos favorecen al parásito y la represión de aquellos (*i. e.* genes de defensa) cuyos productos pueden comprometer su ciclo de vida (Gheysen y Mitchum, 2008).

Se ha reportado que los principales genes que se regulan durante la inducción de la CGM son los relacionados con los mecanismos de defensa de la planta, estos son principalmente reprimidos con el fin de llevar a término el desarrollo del nematodo dentro de la raíz; otros genes que son altamente regulados son los relacionados con el metabolismo primario pues algunos genes se sobre-expresan en plantas infectadas comparadas con plantas sanas, genes que codifican para acuaporinas también son regulados (aquellos relacionados con el control del crecimiento de la planta, el transporte de agua y la osmorregulación celular), se llevan a cabo cambios en la pared celular, enzimas como la endo-b-1,4-glucanasa y la pectin acetilsterasa se expresan durante la formación de la CGM (Jammes *et al.*, 2005).

Esto ha sido demostrado en diversos estudios como el realizado por Tirumalaraju y colaboradores (2011), que evaluaron la expresión diferencial de genes en variedades resistentes y susceptibles de cacahuate (*Arachis hypogaea*) infectadas con el nematodo agallador *Meloidogyne arenaria* y encontraron que en una interacción incompatible los genes *PRs* (codificantes para proteínas relacionadas con patogénesis) se sobre-expresan en plantas resistentes mientras que en susceptibles son reprimidos en los diferentes días evaluados al igual que los genes relacionados con el transporte transmembranal y las expansinas B1; los autores concluyen que las plantas conservan componentes relacionados con la respuesta de defensa asociadas con las cascadas de señalización de AJ (ácido jasmónico), AS (ácido salicílico) y ET (etileno), y que probablemente la reprogramación de la arquitectura celular y la comunicación inter e intracelular es uno de los requisitos para el establecimiento de los sitios de alimentación en plantas susceptibles (Tirumalaraju *et al.*, 2011).

De manera similar Kumari y *et al.* (2016), evaluaron el efecto de *M. graminicola* en dos variedades de arroz (*Oryza sativa* L.), para conocer el rol de la regulación hormonal en la defensa de la planta en una interacción compatible e incompatible con nematodos agalladores (NAGs); determinaron la expresión de genes marcadores para AS, AJ y ET, y encontraron que en la variedad resistente los marcadores para AJ se sobre-expresan en todos los días muestreados mientras que en la susceptible solo en etapas tempranas se sobre-expresa para posteriormente reprimirse, en ambas variedades a nivel local y sistémico, lo que indica que los genes *PRs* tienen un efecto positivo sobre la respuesta de defensa de la planta. Sus resultados

demonstraron que la defensa basal se activa en plantas resistentes y susceptibles, para posteriormente suprimirse durante la etapa tardía de infección en plantas susceptibles, específicamente los genes relacionados con la biosíntesis de AS, AJ y ET y los genes *PRs* que tienen un efecto en la respuesta de resistencia en las plantas de arroz (Kumari *et al.*, 2016).

Por otro lado Gleason *et al.* (2016), evaluaron la expresión del precursor de AJ, OPDA (cis-(C)-12-oxo-phytodienoic acid) en plantas de *A. thaliana* susceptibles inoculadas con *M. hapla* y encontraron que las plantas deficientes en la biosíntesis de AJ y OPDA son hipersensibles a *M. hapla* por lo que se sugiere que el precursor de AJ OPDA juega un rol importante en la regulación de la defensa de la planta contra NAGs (Gleason *et al.*, 2016). Como parte de una interacción incompatible se lleva a cabo la sobre-expresión de genes relacionados con la defensa como los genes *PRs* tanto en etapas tempranas como en las posteriores al proceso de infección afectando así el desarrollo de los NAGs o disminuyendo su población (Tirumalaraju *et al.*, 2011; Kumari *et al.*, 2016), esto debido a la biosíntesis de diversas fitohormonas que participan como señalizadores en la respuesta de resistencia sistémica de las plantas (Fujimoto *et al.*, 2011).

1.3. Resistencia sistémica adquirida e inducida

Las plantas poseen mecanismos de defensa basales e inducibles contra el ataque de diferentes patógenos. Los inducibles pueden incluir la formación de polímeros en la pared celular, metabolitos secundarios, así como proteínas con actividad antimicrobiana. La respuesta de defensa se activa con el reconocimiento de diferentes elicitores que se derivan de la invasión de los patógenos (Hamamouch *et al.*, 2011). Una vez que se activan las respuestas de defensa de la planta a nivel local, generalmente también se desencadena una respuesta de defensa sistémica, esta resistencia prolongada de amplio espectro se conoce como resistencia sistémica adquirida (RSA) (Molinari, 2016). La RSA se caracteriza por la activación coordinada de un conjunto específico de genes *PRs*, esta es dependiente del AS y su inducción implica aumentos locales y sistémicos de la fitohormona (Stahl *et al.*, 2016). Lo anterior conduce a la activación de proteínas NPR1 y posteriormente se expresan genes dependientes que codifican para *PRs* (Pieterse *et al.*, 2009). Se reporta que el AS participa en la regulación de la defensa

de las plantas y se asocia con la resistencia hacia patógenos biotróficos y hemibiotróficos (ej. nematodos fitoparásitos) (Pieterse *et al.*, 2009). En *A. thaliana* y otras plantas, los genes marcadores y cuya expresión es dependiente de la RSA son *PR-1*, *PR-2* y *PR-5* (Cheol-Song *et al.*, 2016).

Por otra parte, la resistencia sistémica inducida (RSI) está regulada por la vía de señalización dependiente del AJ/ET y es usualmente efectiva contra patógenos necrotróficos (Yang *et al.*, 2015). Las vías de señalización se influyen mutuamente a través de una compleja red de interacciones sinérgicas y antagónicas, permitiendo a la planta adaptar de una manera más eficiente su respuesta de defensa, esto dependiendo del tipo de estrés (Saubeau *et al.*, 2016). En plantas dicotiledóneas se ha descrito que AJ y ET son necesarios para la activación de genes relacionados con la defensa, y a su vez se encontró que las vías de defensa de AS y AJ/ET son mutuamente antagónicas (Pieterse *et al.*, 2012; Saubeau *et al.*, 2016). La regulación hormonal modula la resistencia a enfermedades y se consigue a través de los efectos de la transcripción de genes de defensa (Caarls *et al.*, 2015). La activación o represión de genes se logra por la interacción física entre las proteínas *trans* que actúan como factores de transcripción y proteínas *cis* que actúan como elementos del ADN (Caarls *et al.*, 2015). Mucho conocimiento acerca de las vías de señalización de las hormonas se deriva de trabajos realizados con la planta modelo *A. thaliana*, sin embargo, en otros hospedantes la regulación puede ocurrir de forma diferente (Gatz, 2013). En *A. thaliana* se han encontrado diferentes factores TGAs que han demostrado interactuar con NPR1. Los factores de transcripción TGA tienen un papel importante en varias respuestas transcripcionales reguladas por hormonas, por lo general pueden activar la expresión génica dependiente de AS, pero también se ha encontrado que tienen efectos positivos y negativos sobre las respuestas dependientes de AJ/ET (Gatz, 2013).

En *A. thaliana* y otras plantas, los genes marcadores de RSI, son *PR-3*, *PR-4* y *PR-12* (Hamamouch *et al.*, 2011). En este sentido, cuando los efectores del patógeno interactúan con los genes *R* del hospedante, se desencadena la síntesis y señalización de AJ/ET, provocando la sobre-expresión de genes que codifican para factores de transcripción WRKY (Dong-Dong *et al.*, 2011; Hamamouch *et al.*, 2011). La sobre-expresión de genes WRKY incrementa la

cantidad del factor en el citosol, al haber un incremento se transporta la señal al núcleo de la célula donde se activan otros factores transcripcionales, se da la expresión de genes *PRs*, y en consecuencia la defensa contra patógenos como nematodos (Fig. 6), (Dong-Dong *et al.*, 2011; Hamamouch *et al.*, 2011).

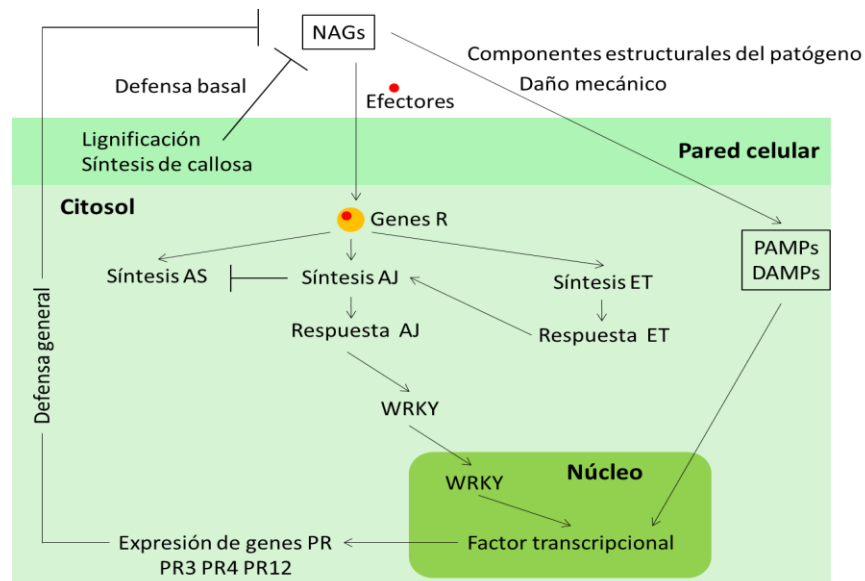


Figura 6. Modelo que representa la red de señalización coordinada de la RSI. La formación de una barrera estructural contra la penetración de nematodos se atribuye a la deposición de lignina y callosa en las paredes celulares de las plantas, mientras que la defensa sistémica mediada por fitohormonas se inicia tras el reconocimiento de receptores y PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) por receptores transmembranales y proteínas R (derivados del hospedante). Las líneas que terminan con flechas indican la activación, y aquellas que terminan con una línea corta perpendicular indican la supresión o la interacción antagónica, modificado de Kumari *et al.*, (2016).

Adicional a los genes *PRs*, se han dilucidado otros genes marcadores de señalización por AJ, por ejemplo aquellos que codifican para proteínas de reserva vegetativa (VSP). Las VSP se sintetizan y se acumulan transitoriamente en vacuolas celulares en los tejidos vegetales provistos de carbono y nitrógeno y son utilizadas para el crecimiento de las plantas y el desarrollo de nuevos órganos (Utsugi *et al.*, 1998). Los genes codificantes para VPS son inducibles en hojas en condiciones de estrés como en deficiencia de agua, heridas, adición de metil jasmonato, sacarosa y coronatina. Se ha propuesto que las VSP pueden ser necesarias como fuente de nitrógeno para sintetizar diversas sustancias para la defensa contra plagas o patógenos o para la regeneración de tejidos (Utsugi *et al.*, 1998; Rossato *et al.*, 2002).

1.3.1. Proteínas relacionadas con patogénesis

En plantas, la respuesta inducida por fitopatógenos está relacionada con una mayor síntesis y acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) y su producción no es específica. Los genes que codifican para estas proteínas se regulan en diferentes condiciones de estrés ocasionado por el ataque de patógenos; en contraste, se ha demostrado que en condiciones normales estos genes están en un estado basal o se expresan a niveles muy bajos (Mohamed y Sehgal, 2018). Las PRs son de bajo peso molecular, y aun cuando su acumulación se incrementa en respuesta a patógenos, también pueden ser inducidas por daños mecánicos. En la actualidad se conocen 17 familias de PRs (Cuadro 1), las cuales consisten de una larga variedad de miembros con diferente aparición, expresión y actividad biológica (Sels *et al.*, 2008). La inducción o acumulación de PRs en respuesta a condiciones adversas es muy importante ya que son un componente indispensable en la respuesta inmune, las proteínas PRs protegen a las plantas de las infecciones, no solo acumulándose localmente en los tejidos infectados, sino también a nivel sistémico (Jain y Khurana, 2018).

Cuadro 1. Familias de proteínas relacionadas con patogénesis (Sels *et al.*, 2008).

Familia	Miembro tipo	Peso típico (kDa)	Propiedades
PR-1	Tabaco PR-1a	15	Antifúngica
PR-2	Tabaco PR-2	30	β -1, 3 glucanasa
PR-3	Tabaco P, Q	25-30	Quitinasa (clase I-VI)
PR-4	Tabaco R	15-20	Quitinasa (clase I-II)
PR-5	Tabaco S	25	Tipo taumatina
PR-6	Jitomate Inhibidor I	8	Inhibidor de proteinasa
PR-7	Jitomate P69	75	Endoproteinasa
PR-8	Pepino quitinasa	28	Quitinasa clase III
PR-9	Tabaco “peroxidasa formadora de lignina”	35	Peroxidasa
PR-10	Perejil “PR1”	17	Tipo ribonucleasa
PR-11	Tabaco quitinasa “clase V”	40	Quitinasa clase I
PR-12	Rábano Rs-AFP3	5	Defensina
PR-13	Arabidopsis THI2.1	5	Tionina
PR-14	Cebada LTP4	9	Proteína de transferencia de lípidos
PR-15	Cebada OxOa (germin)	20	Oxalato oxidasa
PR-16	Cebada OxOLP	20	Tipo oxalato oxidasa
PR-17	Tabaco PRp27	27	Desconocida

1.4. *A. thaliana* como modelo en el estudio de la interacción planta-nematodo

A. thaliana es una planta usada ampliamente como un organismo modelo en biología vegetal (Jammes *et al.*, 2005). Es miembro de la familia Brassicaceae, la cual incluye las especies cultivadas como la col y el rábano, no es de gran importancia agronómica, pero ofrece ventajas importantes para la investigación básica en genética y biología molecular (TAIR³, 2000). Las ventajas son un ciclo de vida corto, un pequeño genoma, porte pequeño y su susceptibilidad a un amplio número de fitopatógenos, como bacterias, hongos y nematodos (Hofmann y Grundle, 2007). Con 30 cm de altura aproximadamente, *A. thaliana* presenta ciclo de vida característico de las plantas dicotiledóneas (Fig. 7); aunque en la naturaleza es una planta anual, puede rendir ocho generaciones al año en condiciones de laboratorio, por lo que es la más utilizada para condiciones *in vitro* (Lukowitz *et al.*, 1996; Hofmann y Grundle, 2007). Su clasificación taxonómica es (ITIS⁴, 2017):

Reino: Plantae

Subkingdom: Viridiplantae

Infrakingdom: Streptophyta

Superdivision: Embryophyta

División: Tracheophyta

Subdivisión: Spermatophytina

Clase: Magnoliopsida

Superorden: Rosanae

Orden: Brassicales

Familia: Brassicaceae

Género: *Arabidopsis*

Especie: *thaliana*

³ The Arabidopsis Information Resource

⁴ Integrated Taxonomic Information System

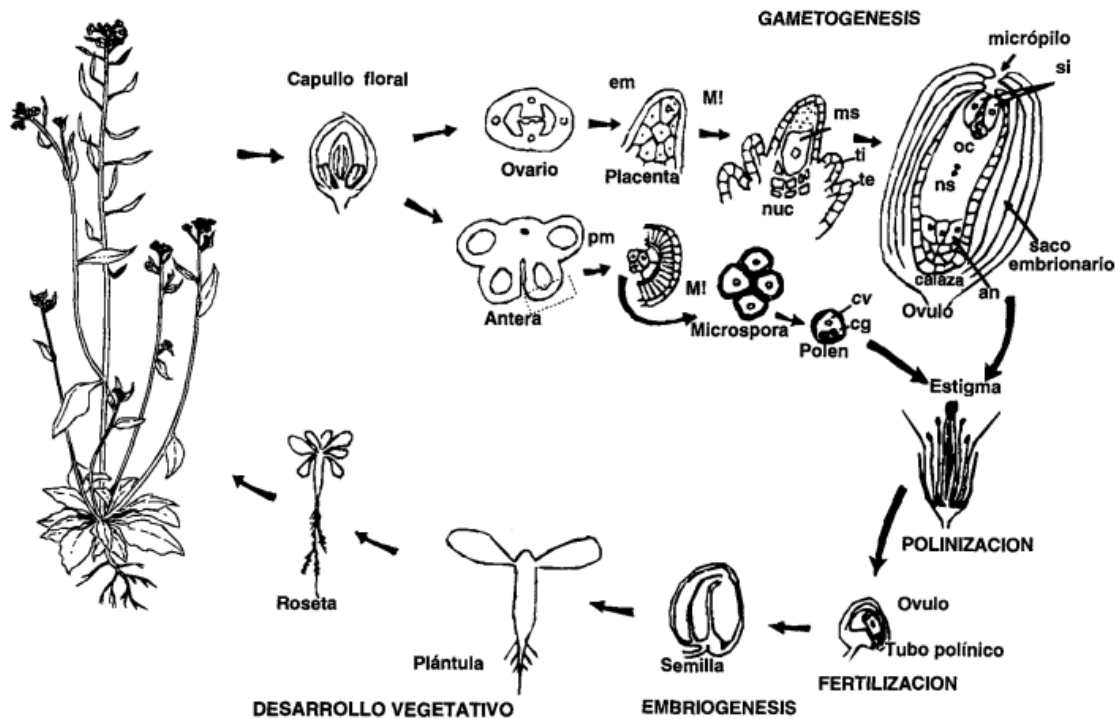


Figura 7. Ciclo de vida de *A. thaliana*. Se muestra la gametogénesis, embriogénesis y el desarrollo vegetativo. El significado de las abreviaturas es el siguiente: em, célula madre del saco embrionario; pm, célula madre del polen; ms, saco embrionario; ti, tegumento interno del saco embrionario; te, tegumento externo del saco embrionario; nuc, nucela; si, células sinérgidas; oc, ovocélula; ns, núcleo secundario; an, células antípodas; cv, célula vegetativa del polen; cg, célula generativa del polen; M!, meiosis (Berná, 1997).

A. thaliana es muy utilizada para dilucidar información acerca de la respuesta de las plantas al ser atacadas por patógenos, debido a su gran susceptibilidad, y su ciclo de vida corto (Jammes *et al.*, 2005). Por tal motivo se ha reportado en diversos estudios la interacción *A. thaliana*-nematodo como el realizado por Jammes y colaboradores en 2005 quienes investigaron la respuesta de la planta de *A. thaliana* al ataque por *Meloidogyne* spp. realizando un análisis de expresión de genes durante la formación de la agalla, utilizando tejido de la raíz con agallas. Otro trabajo de interés es el realizado por Hofmann y Grundler (2007), quienes evaluaron los genes *UBQ10*, *ACT2*, *EF1a*, *UBP22* y *18S rRNA* como genes constitutivos y determinaron que solo *UBP22* y *18S rRNA* son candidatos viables. Por otro lado, Abad y colaboradores (2008), revisaron el genoma total del nematodo agallador *M. incognita* en *A. thaliana*, sus resultados sugieren que las regiones alélicas antiguas de *M. incognita* están evolucionando hacia la haploidía efectiva, lo que permite nuevos mecanismos de adaptación. Otro trabajo es el de Hamamouch y colaboradores (2011), quienes evaluaron la expresión de los genes

relacionados con la patogénesis *PR-1* a *PR-5* en las raíces y follaje de las plantas de *A. thaliana* infectada con *Heterodera schachtii* y *M. incognita*. Además, Fujimoto y colaboradores (2011), investigaron la interacción entre *M. incognita* y la activación de la vía de señalización del ácido jasmónico en *A. thaliana*.

1.5 Literatura citada

1. Abad P. y J. McCarter. 2011. Genome Analysis of Plant Parasitic Nematodes. *In* Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. Jones, Gheysen, Godelieve, y C. Fenoll (eds). Netherlands. 2011. Springer (ed). 103-117.
2. Abad P., J. Gouzy, J-M. Aury, P. Castagnone-Sereno, E. G. Danchin, E. Deleury. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nat. Biotechnol.* 28(6):909-915.
3. Back M. A., P. P. J. Haydock, P. Jenkinson. 2002. Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. *Plant Pathol. J.* 51:683–697.
4. Berná G. 1997. Disección genética del desarrollo de la hoja de *Arabidopsis thaliana*: aislamiento y caracterización de mutantes inducidos mediante metanosulfonato de etilo. San Juan de Alicante, Valencia, España.
5. Bridge J. y J. L. Starr. 2007. Plant Nematode Biology and parasitism. *In* Plant nematodes of agricultural importance. J. Bridge, & J. L. Starr (eds). London. 2007. Manson Publishing Ltd (ed). págs. 5-18.
6. Brito J. A., J. D. Stanley, R. Kaur, R. Cetintas, M. Di Vito, J. A. Thies, D. W Dickson. 2007. Effects of the *Mi-1*, *N* and Tabasco genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. *J Nematol*, 39(4):327.
7. Caarls L., C. M. Pieterse, S. Van Wees. 2015. How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. *Front Plant Sci*, 6:170.

-
8. Caillaud M. C., G. Dubreuil, M. Quentin, L. Perfus-Barbeoch, P. Lecomte, J. d. A. Engler, P. Abad, M. N. Rosso, B. favery. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *J. Plant Physiol.* 165(1):104-113.
 9. Cardona-Piedrahíta L. F., J. Castaño-Zapata, N. C. Aguirre. 2016. Respuesta de quince introducciones de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* L.) al nemátodo Nodulador (*Meloidogyne* spp. GOELDI) e identificación de las especies. *Revista Acad. Colomb. Ci. Exact.* 40(156):450-460.
 10. Carneiro R. M. D. G., L. Hidalgo-Díaz, I. Martins, K. F. Ayres de Souza Silva, M. Guimaraes de Sousa, M. S. Tigano. 2011. Effect of nematophagous fungi on reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on guava (*Psidium guajava*) plants. *J. Nematol.* 13(6):721-728.
 11. Castiblanco O., J. Franco, R. Montecinos. 2016. Razas y gama de hospedantes en diferentes poblaciones del nematodo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935), Thorne & Allen 1944. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 11(1):85-96.
 12. Cheol Song G., H.-J. Sim, S.-G. Kim, C.-M. Ryu. 2016. Root-mediated signal transmission of systemic acquired resistance against above-ground and below-ground pathogens. *Ann. Bot.* 118(4):821-831.
 13. Chitwood D.J. 2003. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service. *Pest Manag Sci* 2003. 59:748–53
 14. Cid del Prado, V. I. 1993. Morphological variation and host test for Mexican populations of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. *Nematropica*, 23;113.
 15. Davis E. L., R. S. Hussey, M. G. Mitchum, T. J. Baum. 2008. Parasitism proteins in nematode–plant interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11(4):360-366.
 16. Niu D. D., H. X. Liu, C. H. Jiang, Y. P. Wang, Q. Y. Wang, H. L. Jin, J. H. Guo. 2011. The plant growth–promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate-and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Mol Plant Microbe Interact.* 24(5):533-542.

-
17. Escobar C., M. Barcalaa, J. Cabrera, C. Fenoll. 2015. Overview of Root-Knot Nematodes and Giant Cells. *In Plant Nematode Interactions: A View on Compatible Interrelationships*. C. Escobar, y C. Fenoll (eds). España. 2015. Academic Press (ed).731-32.
 18. Eves-van den Akker S., C. J. Lilley, E. G. J. Danchin, C. Rancurel, P. A. J. Cock, P. E. Urwin, J. T. Jones. 2014. The transcriptome of *Nacobbus aberrans* reveals insights into the evolution of sedentary endoparasitism in plant-parasitic nematodes. *Genome Biol. Evol.* 6(9):2181-2194.
 19. Fawole B. 1988. Histopathology of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infection on white yam (*Dioscorea rotundata*) tubers. *J Nematol.* 20(1):23–28.
 20. Franco J., J. Ramos, R. Oros, G. Maín, N. Ortuño. 2016. Pérdidas Económicas Causadas por *Nacobbus aberrans* y *Globodera* spp. en el Cultivo de la Papa en Bolivia. *Revista Latinoamericana de la papa*, 11(1):40-66.
 21. Fujimoto T., Y. Tomitaka, H. Abe, S. Tsuda, K. Futai, T. Mizukubo. 2011. Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. *J. Plant Physiol.* 168:1084–1097.
 22. Gatz C. 2013. From pioneers to team players: TGA transcription factors provide a molecular link between different stress pathways. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(2):151-159.
 23. Gheysen G., M. G. Mitchum. 2008. Molecular insights in the susceptible plant response to nematode infection. *In Plant Cell Monographs*. D. G. Nick (ed). Berlin. Springer (ed).45-81.
 24. Gheysen G., M. G. Mitchum. 2011. How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14(4):415-421.
 25. Gleason C., N. Leelarasamee, D. Meldau, I. Feussner. 2016. OPDA Has Key Role in Regulating Plant Susceptibility to the Root-Knot Nematode *Meloidogyne hapla* in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 7:1-15.
 26. Hamamouch N., C. Li, P. J. Seo, C. M. Park, E. L. Davis. 2011. Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 12(4):355-364.

-
27. Hofmann J. y F. M. Grundler. 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*. *J. Nematol.* 9(3):317-323.
 28. Hussey R. S., F. M. Grundler. 1998. Nematode parasitism of plants. The physiology and biochemistry of free-living and plant-parasitic nematodes, 213-243.
 29. Jain D. y J. P. Khurana. 2018. Role of Pathogenesis-Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. *In Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction.* Singh A., Singh I. (eds). Singapore. Springer (ed). 265-281.
 30. Jammes F., P. Lecomte, J. de Almeida- Engler, F. Bitton, M.-L. Martin-Magniette, J. P. Renou, P. Abad y B. Favery. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 44:447–458.
 31. Jaouannet M., L. Perfus-Barbeoch, E. Deleury, M. Magliano, G. Engler, P. Vieira, M. N. Rosso. 2012. A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei. *New Phytologist*, 194(4):924-931.
 32. Jones J. T., A. Haegeman, E. G. J. Danchin, H. S. Gaur, J. Helder, M. G. K. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-López, J. E. Palomares-Rius, W. M. L. Wesemael R. N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 14(9):946-961.
 33. Kiewnick S., M. Dessimoz, L. Franck. 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. *J. nematol.* 41(2):134.
 34. Kumari C., T. K. Dutta, P. Banakar, U. Rao, 2016. Comparing the defence-related gene expression changes upon root-knot nematode attack in susceptible versus resistant cultivars of rice. *Scientific RepoRts.* 6:1-13.
 35. Kyndt T., D. Fernandez, G. Gheysen. 2014. Plant-parasitic nematode infections in rice: molecular and cellular insights. *Annu Rev Phytopathol.* 52:135-153
 36. Lax P., J. C. Dueñas, N. B. Coronel, C. N. Gardenal, P. Bima, M. E. Doucet. 2011. Host range study of Argentine *Nacobbus aberrans* sensu Sher populations and comments on the differential host test. *Crop Prot.* 30(11):1414-1420.

-
37. Lax P., N. Marro, B. Agaras, C. Valverde, M. E. Doucet, A. Becerra. 2013. Biological control of the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* by *Pseudomonas protegens* under controlled conditions. *Crop Prot*, 52:97-102.
 38. Lukowitz W., U. Mayer, G. Jürgens. 1996. Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related KNOLLE gene product. *Cell*, 84(1):61-71.
 39. Manzanilla-López R. H., M. A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R. N. Inserra, P. S. Lehman, K. Evans. 2002. the genus *nacobbus* thorne & allen, 1944 (nematode: *pratylenchidae*): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica*. 32(2):149-227.
 40. Martínez-Gallardo J. Á., T. Díaz-Valdés, R. Allende-Molar, R. S. García-Estrada, J. A. Carrillo-Fasio. 2015. Primer reporte de *Meloidogyne enterolobii* parasitando tomate en Culiacán, Sinaloa, México. *Rev Mex De Cienc Agric*.
 41. Martínez-Gallardo J. Á., T. Díaz-Valdés, R. Allende-Molar, J. A. Ortiz-Meza, R. S. García-Estrada, J. A. Carrillo-Fasio. 2014. Nematodos fitoparásitos asociados al cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) en Colima, México. *Rev Mex De Cienc Agric*. 5(2):317-323
 42. Martínez-Fuentes R., A. Tovar-Soto, R. Torres-Coronel. 2010. Penetración y Establecimiento de *Nacobbus aberrans* [(Thorne 1933) Thorne y Allen), 1944] Población Chapingo en Cultivares de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) *Rev. Mex. Fitopatol*. 28(1):61-63.
 43. Mohamed F. y O. P. Sehgal. 2018. Pathogenesis-Related Proteins. *In Plant Viruses* CRC Press. 65-83.
 44. Molinari S. 2016. Systemic acquired resistance activation in *solanaceous* crops as a management strategy against root-knot nematodes. *Pest Manag. Sci.*. 72(5), 888-896.
 45. Moore J. W., G. J. Loake, S. H. Spoel. 2011. Transcription dynamics in plant immunity. *Plant Cell*. 23:2809–2820.
 46. Ornat C., S. Verdejo-Lucas, F. J. Sorribas. 2001. A population of *Meloidogyne javanica* in Spain virulent to the Mi resistance gene in tomato. *Plant Dis*. 85(3):271-276.
 47. Papadopoulou J. y A. C. Traintaphyllou. 1982. Sex differentiation in *Meloidogyne incognita* and anatomical evidence of sex reversal. *J. nematol*. 14(4):549.

-
48. Pérez-Rodríguez I., F. Franco-Navarro, I. C. del Prado-Vera, E. Zavaleta-Mejia. 2011. Control of *Nacobbus aberrans* in chili pepper (*Capsicum annuum* L.) by the combination of organic amendments, nematophagous fungi and nematicides. *Nematropica*. 41(1):122-129.
 49. Pieterse C. M., D. Van der Does, C. Zamioudis, A. Leon-Reyes, S. C. Van Wees. 2012. Hormonal modulation of plant immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 28.
 50. Pieterse C. M., A. Leon-Reyes, S. Van der Ent, S. C. Van Wees. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol*. 5(5):308-316.
 51. Rossato L., J. H. MacDuff, P. Laine, E. Le Deunff, A. Ourry. 2002. Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle: effects of methyl jasmonate on nitrate uptake, senescence, growth, and VSP accumulation. *J. Exp. Bot*. 53(371):1131-1141.
 52. Rosso M. N. 2012. 13 Nematode Effector Proteins: Targets and Functions in Plant Parasitism. *In* *Effectors in Plant-Microbe Interactions*. F. Martin (ed). India. Wiley-Blackwell. 327-354.
 53. Saubeau G., F. Perrin, N. Marnet, D. Andrivon, F. Val. 2016. Hormone signalling pathways are differentially involved in quantitative resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol*. 65(2):342-352.
 54. Sels J., J. Mathys, B. M. De Coninck, B. P. Cammue, M. F. De Bolle. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem*. 46(11):941-950.
 55. Stahl E., P. Bellwon, S. Huber, K. Schlaeppi, F. Bernsdorff, A. Vallat-Michel, J. Zeier. 2016. Regulatory and functional aspects of indolic metabolism in plant systemic acquired resistance. *Mol Plant*. 9(5):662-681.
 56. Tirumalaraju S., M. Jain, M. Gallo. 2011. Differential gene expression in roots of nematode-resistant and-susceptible peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars in response to early stages of peanut root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*) parasitization. *J Plant Physiol*. 168(5):481-492.
 57. Utsugi S., W. Sakamoto, M. Murata, F. Motoyoshi. 1998. *Arabidopsis thaliana* vegetative storage protein (VSP) genes: gene organization and tissue-specific expression. *Plant Mol Biol*. 38(4):565-576.

-
58. Valle R. V. 2001. Nematodos agalladores afectando hortalizas y otros cultivos en el norte centro de México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 19(1):107-109.
 59. Villar-Luna E., O. Gómez-Rodríguez, R. I. Rojas-Martínez, E. Zavaleta-Mejía. 2016. Presence of *Meloidogyne enterolobii* on Jalapeño pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sinaloa, Mexico. *Helminthologia*, 53(2):155-160.
 60. Williamson V. M. y C. A. Gleason. 2003. Plant–nematode interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6(4):327-333.
 61. Yang Y. X., G. Ahammed, C. Wu, S. Y. Fan, Y. H. Zhou. 2015. Crosstalk among jasmonate, salicylate and ethylene signaling pathways in plant disease and immune responses. *Curr. Protein Pept. Sci.* 16(5):450-461.

CAPÍTULO 2. EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE RESISTENCIA SISTÉMICA INDUCIDA EN *Arabidopsis thaliana* INFECTADA POR NEMATODOS AGALLADORES

Resumen

Los nematodos agalladores (NAGs) limitan la producción agrícola. Los NAGs son patógenos biotróficos y establecen una relación altamente especializada con sus hospedantes, promoviendo la alteración de genes relacionados con la defensa del hospedante. En respuesta al ataque por patógenos, las plantas activan sus mecanismos de defensa a nivel local y sistémico, la regulación de estas defensas es promovida por la acción de varias fitohormonas y se diferencian en resistencia sistémica adquirida (RSA: por ácido salicílico) e inducida (RSI: por ácido jasmónico y etileno). Al respecto, surgió el interés por conocer las modificaciones transcripcionales que *Meloidogyne enterolobii* (*Me*) y *Nacobbus aberrans* (*Na*) inducen en *Arabidopsis thaliana* (*At*, ecotipo Columbia) a nivel local (raíces) y sistémico (follaje). Para ello, mediante qRT-PCR se determinaron niveles de expresión de genes marcadores de RSI (*PR3* y *PR4*), y de ácido jasmónico (*VSP*); y adicionalmente, se determinó el tipo de interacción que establecen *Me* y *Na* con *At*. Se establecieron dos experimentos independientes, en el primero se evaluó el desarrollo del nematodo en *At*; y el segundo correspondió a los análisis de expresión. Se incluyó a *M. incognita* (*Mi*), como referencia de interacción compatible *At*-nematodo. Los tratamientos evaluados consistieron de plantas de *At*: 1) inoculadas con *Me* (*At-Me*), 2) inoculadas con *Mi* (*At-Mi*), 3) inoculadas con *Na* (*At-Na*), y 4) *At* sin inoculación (*Control*). Los tiempos de muestreo fueron 2, 7, 14, y 30 días post-inoculación (dpi) con juveniles de segundo estadio (J2). El nivel de inóculo fue de 500 J2/planta. En el experimento 1, a 7, 14 y 30 dpi el número de individuos de *Me* fue superior a *Mi* en un 864 %, 374 % y un 455 %, respectivamente ($p < 0.05$). Para *N. aberrans* (*Na*), a los 7, 14 y 30 dpi el número de individuos de *Na* fue 913.6363 %, 435.7087 % y 21.4997 % superior a *M. incognita* (*Mi*), respectivamente. En contraste con *M. enterolobii* (*Me*), a 7 y 14 dpi, *Na* fue 17.2141 % y 43.0514 % superior, respectivamente; mientras que a 30 dpi fue 73.3552 inferior ($p < 0.05$). A 30 dpi, el número de agallas inducidas por *Me* fue 89.0469 % superior al

registrado por *Mi*. No fue evidente la presencia de agallas en raíces de plantas inoculadas con *Na*. En el experimento 2, a nivel local, en general *PR3*, *PR4*, y *VSP* fueron sobre-expresados en respuesta a la inoculación con NAGs; a nivel sistémico, los tres genes fueron generalmente reprimidos en los últimos tiempos de evaluación. En conclusión, *M. enterolobii* se desarrolló y concluyó con éxito su ciclo de vida en *A. thaliana*, aparentemente la agresividad de este nematodo fue superior a la de *M. incognita*, en ambos casos la interacción fue de tipo compatible. En cuanto a *N. aberrans*, los resultados obtenidos sugieren una interacción incompatible pues no fue observable la presencia de hembras adultas ni hubo formación de agallas en *A. thaliana*. Con respecto a los niveles de expresión génica, esta fue diferencial, *M. enterolobii* y *N. aberrans* modificaron los niveles de los genes marcadores de RSI (*PR3* y *PR4*), y de ácido jasmónico (*VSP*) a nivel local (raíces) y sistémico (follaje), dicho fenómeno fue contrastante con lo registrado en las plantas Control.

Palabras clave: *Meloidogyne enterolobii*, *Nacobbus aberrans*, ciclo de vida, genes de defensa, proteínas relacionadas con patogénesis.

Abstrac

The root-knot nematodes (RKN) limit agricultural production. RKN are biotrophic pathogens and have a highly specialized relationship with their hosts, promoting the alteration of genes related to the defense of the host. In response to attack by pathogens, the plants activate their defense mechanisms at the local and systemic level, the regulation of these defenses is promoted by the action of several phytohormones and they differ in the acquired systemic resistance (SAR: by salicylic acid) and induced (ISR: for jasmonic acid and ethylene). In this regard, there was interest in knowing the transcriptional modifications of *Meloidogyne enterolobii* (*Me*) and *Nacobbus aberrans* (*Na*) induce in *Arabidopsis thaliana* (*At*, ecotype Columbia) at the local (roots) and systemic level (foliage). To do this, the levels of expression of ISR marker genes (PR3 and PR4) and jasmonic acid (VSP) are determined by qRT-PCR; and additionally, the type of interaction that was related to *Me* and *Na* with *At* was determined. Two independent experiments were established, in the first the development of the nematode in *At* was evaluated; and the second corresponds to the expression analysis. *M. incognita* (*Mi*) was included as a reference for compatible *At*-nematode interaction. The treatments evaluated consisted of plants of: 1) inoculated with *Me* (*At-Me*), 2) inoculated with *Mi* (*At-Mi*), 3) inoculated with *Na* (*At-Na*), and 4) In without inoculation (Control) . The sampling times were 2, 7, 14 and 30 days post-inoculation (dpi) with juveniles of second stage (J2). The inoculum level was 500 J2 / plant. In experiment 1, at 7, 14 and 30 dpi, the number of individuals of *Me* was greater than *Mi* by 864%, 374% and 455%, respectively ($p < 0.05$). For *N. aberrans* (*Na*), at 7, 14 and 30 dpi the number of individuals of *Na* was 913.6363%, 435.7087% and 21.4997% higher than *M. incognita* (*Mi*), respectively. In contrast to *M. enterolobii* (*Me*), at 7 and 14 dpi, *Na* was 17.2141% and 43.0514% higher, respectively; While at 30 dpi it was 73.3552 lower ($p < 0.05$). At 30 dpi, the number of galls induced by *me* was 89.0469% higher than that registered by *me*. The presence of galls on the roots of plants inoculated with *Na* was not evident. In experiment 2, a local level, in general PR3, PR4 and VSP were over-expressed in response to inoculation with ; A systemic level, the three genes were generally repressed in the last evaluation times. In conclusion, *M. enterolobii* is followed and concluded with a life cycle in *A. thaliana*, apparently the aggressiveness of this nematode was superior to that of *M.*

incognita, in both cases, the interaction was compatible. As for *N. aberrans*, the results appeared as an incompatible interaction because the presence of adults was not observable and there was no gall formation in *A. thaliana*. Regarding the levels of gene expression, this was differential, *M. enterolobii* and *N. aberrans* modified the levels of the ISR marker genes (PR3 and PR4), and jasmonic acid (VSP) at the local (roots) and systemic levels (foliage), this phenomenon was contrasted with what was recorded in the Control plants.

Key words: *Meloidogyne enterolobii*, *Nacobbus aberrans*, life cycle, defense genes, proteins related to pathogenesis.

2.1. Introducción

Los nematodos agalladores (NAGs) (*Meloidogyne* spp) constituyen el grupo de fitoparásitos de mayor relevancia por los diversos daños que ocasionan en los cultivos y por la compleja interacción parasítica que establecen con sus hospedantes susceptibles. *Meloidogyne* infecta a varias plantas de importancia agroalimenticia como jitomate (*Solanum lycopersicum*), chile (*Capsicum annuum*), papa (*S. tuberosum*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), entre otros (Tirumalaraju *et al.*, 2011; Cardona-Piedrahíta *et al.*, 2016). Las especies comunes de agalladores son *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* y *M. hapla*, sin embargo, en los últimos años *M. enterolobii* (= *M. mayaguensis*) ha despertado gran interés económico y científico (Moens *et al.*, 2009). *M. enterolobii* es emergente y considerado de alta peligrosidad por la EPPO⁵ por su creciente distribución geográfica, amplio rango de hospedantes, y por su notable agresividad para superar en varios cultivos la resistencia a NAGs (Brito *et al.*, 2007; Moens *et al.*, 2009). Otro nematodo de importancia en la agricultura tropical y subtropical es *Nacobbus aberrans*, en México afecta principalmente a los cultivos de chile, jitomate, y frijol (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2013). Al igual que *Meloidogyne* spp. *N. aberrans* induce la formación de agallas en las raíces de sus hospedantes, afectando la absorción de agua y nutrimentos, y en consecuencia la planta exhibe síntomas de clorosis, enanismo, marchitez, y es susceptible a la infección por otros patógenos (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Perry *et al.*, 2009).

Como parte de su ciclo de vida, *Meloidogyne* spp y *N. aberrans* inducen la formación de sitios especializados de alimentación (SEA), células gigantes y sincitios, respectivamente (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Caillaud *et al.* 2008); estas estructuras le proveen al nematodo los nutrimentos necesarios para su crecimiento y reproducción (Abad *et al.*, 2008; Caillaud *et al.* 2008). Durante la inducción y mantenimiento del SEA ocurren cambios dramáticos en la fisiología del hospedante (Jammes *et al.*, 2005; Caillaud *et al.*, 2008; Gheysen y Mitchum, 2008). El nematodo inyecta distintos efectores e induce modificaciones transcripcionales en las células del hospedante (Abad *et al.*, 2008; Caillaud *et al.*, 2008). Estas modificaciones usualmente comprenden la sobre-expresión de genes cuyos productos están involucrados en la

⁵ EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization

formación y mantenimiento del SEA, y la represión de genes cuyos productos están asociados con la defensa del hospedante (Williamson y Gleason, 2003; Caillaud *et al.*, 2008). Por ejemplo, en la interacción compatible *Arabidopsis thaliana-Meloidogyne incognita*, el análisis transcriptómico global en raíces reveló que a 14 y 21 días post-inoculación con el nematodo, una alta proporción de genes implicados en defensa, comunicación y transporte celular fueron reprimidos; los genes de defensa comprendieron aquellos que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs), fenilpropanoides, y proteínas tipo lipasa (PAD4) cruciales para la señalización de ácido salicílico (Jammes *et al.*, 2005). El éxito de la infección e instalación de los nematodos en las raíces de las plantas depende del tipo de interacción que se establezca entre estos dos organismos, la cual puede ser compatible o incompatible (Caillaud *et al.*, 2008). En una interacción compatible se reprime la defensa de la planta, lo que da como resultado que el nematodo se instale y se desarrolle sin ningún inconveniente, asegurando una próxima generación; en contraste, en la interacción incompatible se activan los genes de defensa, y en este caso el nematodo no se instala, no concluye su ciclo o produce masas con huevecillos estériles (Caillaud *et al.*, 2008; Pieterse *et al.*, 2009).

Las plantas durante el curso de su evolución han desarrollado múltiples mecanismos de defensa bioquímica contra el estrés biótico; la regulación de estos mecanismos esta mediada por diferentes señalizadores como las fitohormonas ácido salicílico (AS), ácido jasmónico (AJ) y etileno (ET) (Koornneef and Pieterse, 2008; Pieterse *et al.*, 2009). El AS está asociado con la resistencia sistémica adquirida (RSA) (inducida por patógenos biotróficos); en contraste, el AJ y ET están involucrados en la resistencia sistémica inducida (RSI) (activada en respuesta a patógenos necrotróficos, daño mecánico y por el ataque de herbívoros) (Kunkel y Brooks, 2002; Bari y Jones, 2009). El reconocimiento de elicitores bióticos por la planta, dispara la señalización hormonal y subsecuentemente se activan genes de defensa a nivel local y sistémico (Thomma *et al.*, 2001). La inducción de la RSI está correlacionada con un incremento en la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) como *PR3* (quitinasas I, II, IV, V, VI, y VII), *PR4* (quitinasas I y II) y *PR12* (*PDF1.2* defensina), y particularmente, en *A. thaliana* se ha demostrado que el AJ también regula la expresión del gen *VSP* (proteína de reserva vegetativa) en respuesta al estrés biótico (Utsugi *et al.*, 1998; Van Loon y Van Strien, 1999; Thomma *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005).

Poco se ha estudiado la implicación de la RSI en la interacción planta-nematodo agallador, por ejemplo, Kumari y colaboradores (2016), en la interacción *M. graminicola-Oryza sativa* L., determinaron la expresión de genes marcadores de RSI en dos variedades de arroz, y encontraron que en la variedad resistente los marcadores para AJ se sobre-expresan en todos los tiempos de evaluación mientras que en la susceptible solo en etapas tempranas se sobre-expresa para posteriormente reprimirse, a nivel local y sistémico. Por otro lado, Gleason y colaboradores (2016), evaluaron la expresión del precursor de AJ, OPDA (cis-(C)-12-oxo-phytodienoic acid) en plantas de *A. thaliana* susceptibles inoculadas con *M. hapla* y encontraron que las plantas deficientes en la biosíntesis de AJ y OPDA fueron susceptibles al nematodo, sugiriendo que este precursor juega un rol importante en la regulación de la defensa contra NAGs. Es importante precisar que a la fecha no se han documentado los cambios transcripcionales de genes marcadores de RSI en la interacción de *A. thaliana* con *M. enterolobii* y *N. aberrans*. En este sentido, surgió el interés por conocer los niveles de expresión de los genes *PR3*, *PR4* y *VSP* en raíces y follaje de *A. thaliana* durante la interacción con estos fitoparásitos, y adicionalmente se comparó el tipo de interacción que estos nematodos establecen con el hospedante en cuestión.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Material vegetal

Semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) (proporcionadas por la Dra. Reyna I. Rojas-Martínez del Colegio de Postgraduados) se desinfectaron superficialmente según lo descrito por Chávez *et al.* (2013), se estratificaron por 72 h a 4° C, y se germinaron en placas Petri conteniendo medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) a 25±1° C con fotoperiodo de 16 h.

2.2.2. Preparación del sustrato y trasplante

Previo a los experimentos de interacción planta-nematodo agallador, con el propósito de obtener raíces con un desarrollo adecuado y superficialmente limpias al momento del

muestreo, se evaluaron seis combinaciones de sustrato esterilizado (arena⁶/peat moss: 75:25, 80:20, 85:15, 90:10, 95:5 y 100). Se utilizaron plántulas de *A. thaliana* (germinadas en placas Petri) de ocho días de edad, las cuales se trasplantaron a macetas conteniendo 25 cc de sustrato (una plántula/maceta). Para los experimentos de interacción se usó la proporción 90:10 de sustrato. En todos los experimentos, las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento a 25±1° C con fotoperiodo de 16 h. El riego se realizó cada 24 h con solución nutritiva (300 ppm⁷ de 18-18-18 en agua esterilizada).

2.2.3. Obtención de inóculo e inoculación con nematodos agalladores

El inóculo de *M. enterolobii* (*Me*), *M. incognita* (*Mi*) y *N. aberrans* (*Na*) se obtuvo de raíces agalladas de jitomate cv. Río grande (cultivo monoxénico). La extracción de huevecillos se realizó de acuerdo a Vrain (1977), y para la obtención de juveniles del segundo estadio (J2), los huevecillos se incubaron a 25±1 °C en agua esterilizada (método de Baermann). A los 21 días después del trasplante de *A. thaliana* (*At*), se realizó la inoculación con 500 J2/planta.

2.2.4. Experimentos

2.2.4.1. Desarrollo de nematodos agalladores en raíces de *A. thaliana*.

En este experimento, los tratamientos evaluados consistieron de plantas de *At*: 1) inoculadas con *Me* (*At-Me*), 2) inoculadas con *Mi* (*At-Mi*), 3) inoculadas con *Na* (*At-Na*), y 4) *At* sin inoculación (*Control*). A 2, 7, 14 y 30 días posteriores a la inoculación (dpi) se realizó el muestreo de raíces. Las raíces se tiñeron por el método de NaOCl-fucsina ácida según Bybd *et al.* (1983). Cada tratamiento constó de 7 repeticiones (7 plantas). El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar donde se evaluó el desarrollo de los nematodos, y número de nematodos y agallas por sistema radical.

⁶ Se compararon dos tipos diferentes de arena, una gruesa (obtenida con un tamiz de 20 mallas) y una fina (obtenida con un tamiz de 60 mallas).

⁷ Previamente se evaluaron diferentes concentraciones de fertilizante (100, 200, 300 y 400 ppm) y se usó la concentración que promovió un desarrollo óptimo de la planta.

2.2.4.2. Expresión génica.

Los tratamientos fueron: 1) *At-Me*, 2) *At-Mi*, 3) *At-Na*, y 4) *At* sin inoculación (*Control*). A 2, 7 y 14 dpi se realizó el muestreo (15 plantas por tiempo), para ello las plantas se congelaron con N₂ líquido y se conservaron en ultracongelación hasta su uso. La variable evaluada fue niveles relativos de mRNA de los genes *PR-3*, *PR-4* (chitinases type) y *VSP* (vegetative storage protein) en raíz y follaje. Se incluyeron plantas adicionales en los tratamientos que involucraron nematodos para verificar su presencia en el interior de las raíces. Cada tratamiento constó de dos repeticiones (dos grupos de cinco plantas). El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar, y se repitió una vez.

2.2.4.2. Extracción de RNA, síntesis de cDNA, y PCR en tiempo real⁸.

La extracción de RNA total se realizó a partir de raíces y follaje (tejido ultracongelado) de *A. thaliana* utilizando el RNeasy® Plant mini kit (Qiagen), adicionalmente se incluyó una digestión con DNasa (Qiagen), todo este procedimiento fue de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza e integridad del RNA se verificó por espectrofotometría (260 nm), y por electroforesis en gel de agarosa a 1 % respectivamente. La síntesis de cDNA se realizó a partir de RNA total usando oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen), dNTP Mix (Bioline), agua libre de nucleasas, y la enzima M-MLV reverse transcriptase (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de expresión génica se determinaron mediante PCR cuantitativa en un sistema CFX Connect™ Real-Time PCR Detection (Bio-Rad). La mezcla de reacción fue de 25 µL y consistió de 0.63 U de MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline), 10 pM de cada oligonucleótido, SYBR® Green I (1:75000) (Molecular Probes™-Invitrogen™) como fluoróforo, 3 µL de cDNA, y agua libre de nucleasas. Los oligonucleótidos específicos para cada gen se describen en el Cuadro 2. Las condiciones de amplificación consistieron de una desnaturalización inicial a 95° C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 95° C por 15 s, alineamiento a 65° C por 35 s, y extensión a 72° C por 35 s. Para descartar la formación de productos inespecíficos, se incluyó un análisis de disociación. La expresión relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008), se usó como referencia interna el gen 18S rRNA

⁸ Previamente se optimizaron las condiciones de amplificación de los oligonucleótidos para su uso en cuantificación relativa por PCR en tiempo real.

para normalizar la expresión del gen de interés, y las plantas *Control* para calibrar su expresión.

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para PCR en tiempo real

Gen	Numero	Secuencia (5'-----3')	Amplicon (pb)	Referencia
<i>PR3</i>	AT3g12500	Fw-CGGGCATCATTTC AAGTTCT Rv-GCAACAAGGTCAGGGTTGTT	432	Hamamouch <i>et al.</i> (2011)
<i>PR4</i>	At3g04720	Fw-TGTTCTCCGACCAACA ACTG Rv-CAATGAGATGGCCTTGTTGA	397	Hamamouch <i>et al.</i> (2011)
<i>VSP</i>	At5g24770	Fw-ACCCATCATACTCAGTGACCGT Rv-GAGATGCTTCCAGTAGGTCACG	91	Hu <i>et al.</i> (2012)
<i>18 S rRNA</i>		Fw-GGTGGTAACGGGTGSCGGAGAAT Rv- CGCCGACCGAAGGGACAAGCCGA	355	Hofmann <i>et al.</i> (2007)

PR3: Quitinasa (clase I-VI); PR4: Quitinasa (clase I-II); VSP: proteína de reserva vegetativa; *18 S rRNA*: referencia interna.

2.2.6. Análisis estadístico

Los datos de las variables evaluadas se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y a un análisis de comparación de medias (Tukey, $p < 0.05$) con el programa estadístico GraphPad Prism 5 (Graphpad software, Inc., La Jolla, CA, USA).

2.3. Resultados

La evaluación de las diferentes concentraciones de fertilizante indicó que la dosis óptima fue de 300 ppm; las plantas presentaron un mejor desarrollo de raíces y follaje, y no mostraron clorosis. Con respecto al sustrato, la mejor relación fue 90:10 (arena gruesa-peat moss), las plantas mostraron un crecimiento uniforme (Fig. 8), y una menor cantidad de sustrato adherido a sus raíces.

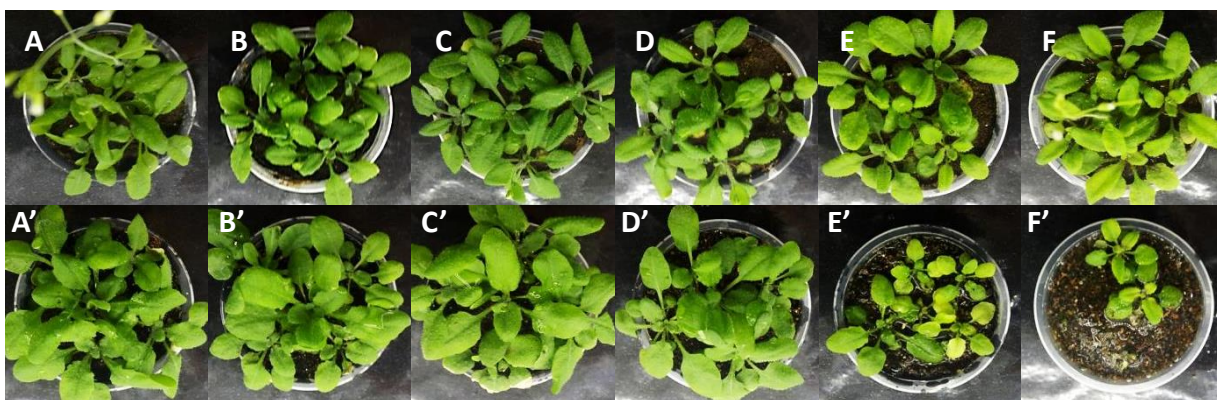


Figura 8. Plantas de *A. thaliana* crecidas en diferentes proporciones de sustrato. A-F) en arena fina 60 mallas (75-25, 80-20, 85-15, 90-10, 95-5 y 100) con Peat moss; A'-F') en arena gruesa 20 mallas (75-25, 80-20, 85-15, 90-10, 95-5 y 100) con Peat moss. Se evaluó el crecimiento de la planta y la limpieza de la raíz a los 7 días después del trasplante.

2.3.1. Desarrollo de nematodos agalladores (NAGs) en raíces de *A. thaliana*

Al igual que *M. incognita*, *M. enterolobii* (*Me*) estableció una interacción compatible con *A. thaliana*. A 30 días post-inoculación (dpi) fue evidente la presencia de hembras adultas y juveniles de segundo estadio (J2) (probablemente pertenecientes a una nueva generación) (Fig. 9). A 7, 14 y 30 dpi el número de individuos de *Me* fue superior a *Mi* en un 864 %, 374 % y un 455 % respectivamente ($p < 0.05$) (Fig. 10). A los 2 dpi únicamente se encontraron J2, a los 7 dpi solo J3, a los 14 dpi J3 (41 %), J4 (38 %), y hembras inmaduras (Hi 21 %); a los 30 dpi se observó la presencia de J2 (5 %) pertenecientes a una nueva generación, J3 (8 %), J4 (31 %), Hi (23 %), y hembras adultas (Ha 33 %) (Fig. 11).

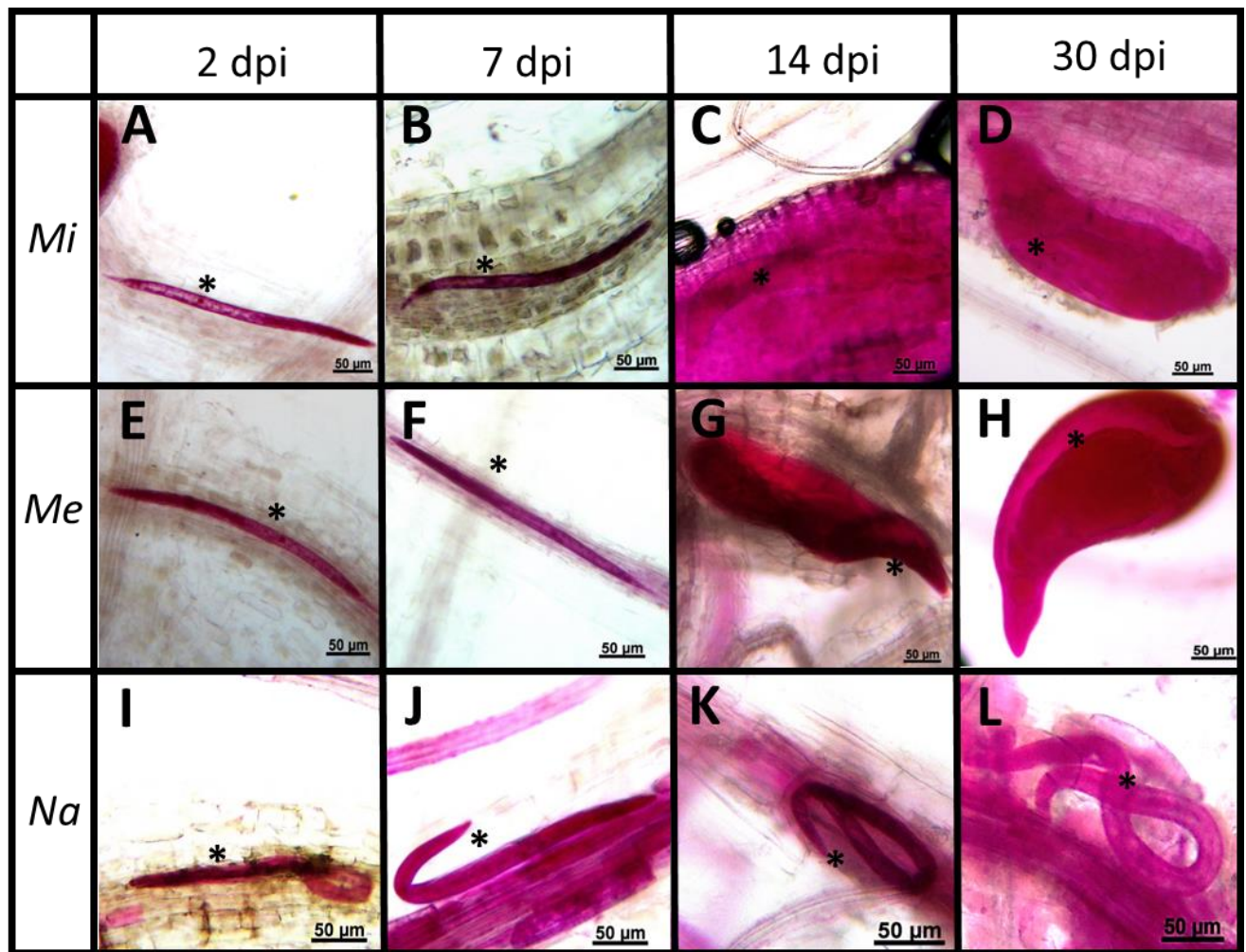


Figura 9; Desarrollo de *Mi*, *Me* y *Na* en raíces de *A. thaliana* a diferentes dpi. A-D) *Mi* (estadios J2, J3, J4 y Ha), E-H) *Me* (J2, J3, J4 y Ha), I-L) *Na* (J2, J3, J3 y J4), a los 4, 7, 14 y 30 dpi el * indica la presencia del nematodo dentro de la raíz de la planta en sus diferentes estadios teñidos con fucsina acida.

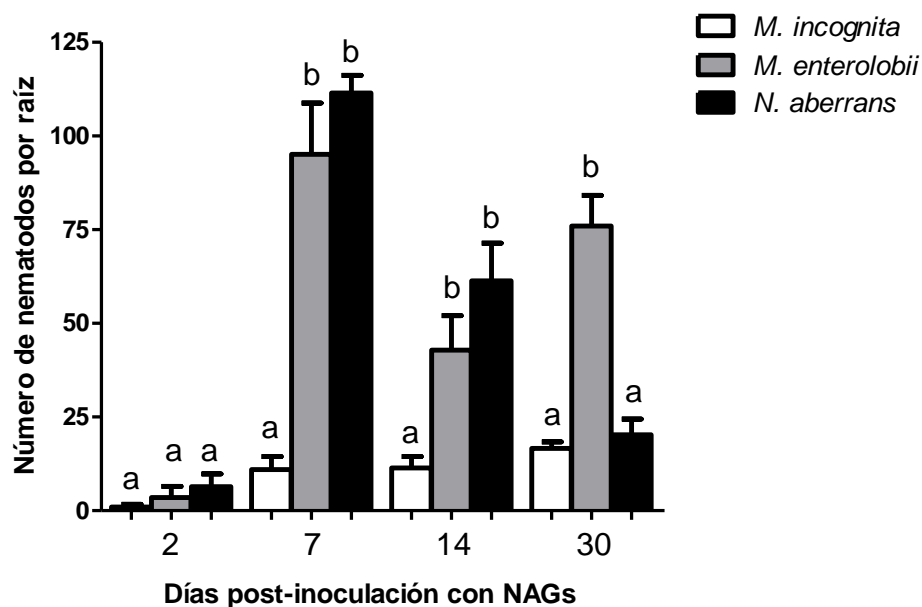


Figura 10. Número de nematodos en el interior de raíces de *A. thaliana*. Plantas de 21 días de edad inoculadas con 500 J2 de cada nematodo, las barras representan el promedio±desviación estándar (DE) (n=12). Barras con letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, $p<0.05$).

Para *N. aberrans* (*Na*), a los 30 dpi, en raíces de *A. thaliana* solo se encontraron individuos pertenecientes al estadio J4 (Fig 9I-L). A los 7, 14 y 30 dpi el número de individuos de *Na* fue 913.6363 %, 435.7087 % y 21.4997 % superior a *M. incognita* (*Mi*), respectivamente. En contraste con *M. enterolobii* (*Me*), a 7 y 14 dpi, *Na* fue 17.2141 % y 43.0514 % superior, respectivamente; mientras que a 30 dpi fue 73.3552 inferior ($p<0.05$) (Fig. 10). Con relación al estadio presente, a los 2 dpi se encontraron únicamente J2, a los 7 dpi J2 (54 %) y J3 (46 %), a los 14 dpi J3 (59 %) y J4 (41 %), y a los 30 dpi se observaron en su mayoría J4 (98 %) y J3 (2 %) (Fig. 11).

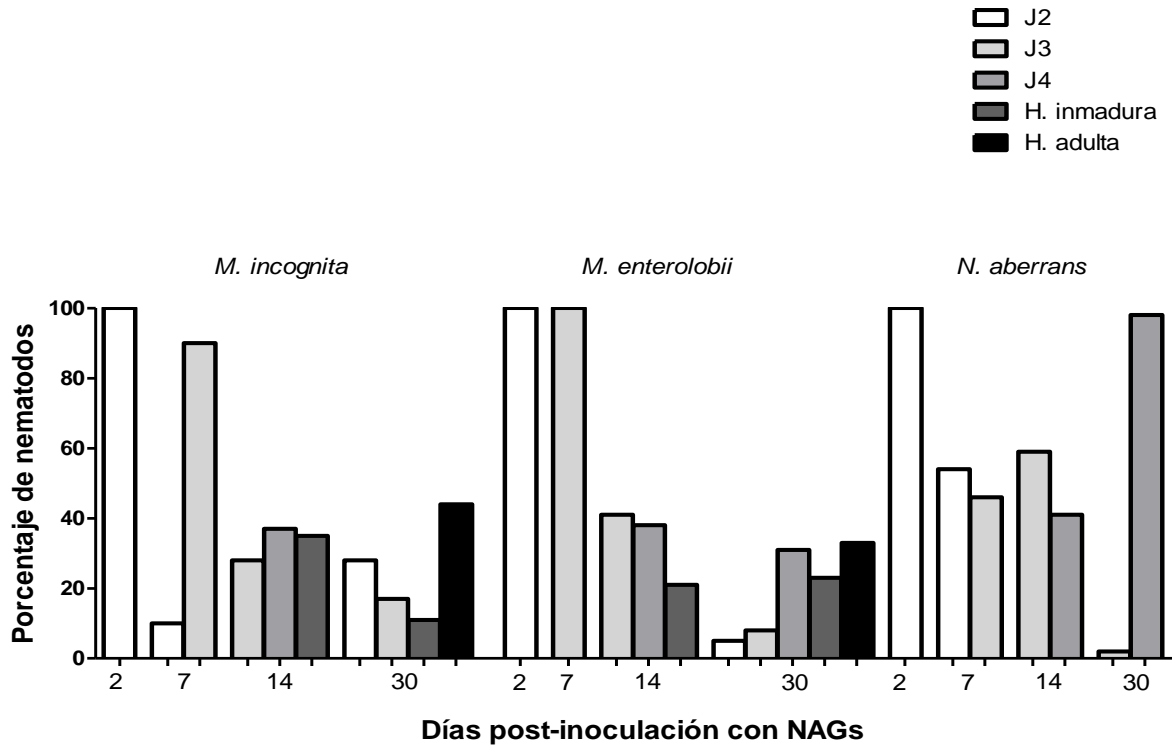


Figura 11. Proporción de estadios de cada nematodo presente en raíces de *A. thaliana* a diferentes tiempos post-inoculación. Los porcentajes se obtuvieron a partir del promedio del número total de nematodos en raíces infectadas.

Además del número de nematodos y del porcentaje de estadios presentes en las raíces de *A. thaliana* también se contabilizó el número de agallas inducidas por *M. enterolobii* y *M. incognita* a los 30 dpi (Fig. 12A), esto se realizó observando las raíces bajo un microscopio óptico con un ocular de 4x (Fig. 12B-C). El número de agallas inducido por *Me* fue 89.0469 % superior al registrado por *Mi*. En este último tiempo de evaluación, no fue evidente la presencia de agallas en raíces de plantas inoculadas con *Na*.

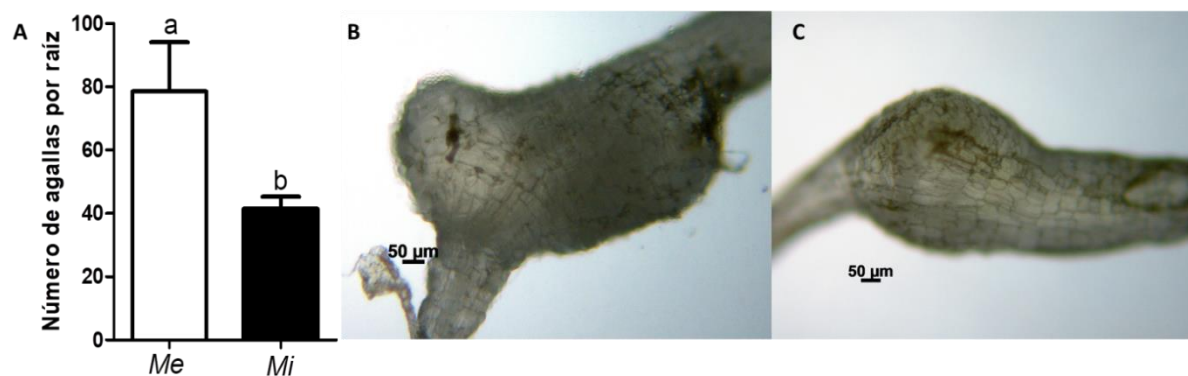


Figura 12. Número de agallas en raíces de *A. thaliana* infectadas con *M. enterolobii* (*Me*) y *M. incognita* (*Mi*) a 30 dpi. Plantas de 21 días de edad fueron inoculadas con 500 J2 de cada nematodo y sus raíces se observaron bajo microscopio óptico para realizar el conteo total. **A)** Número de agallas en raíces de *A. thaliana*, **B)** Agalla inducida por *Me*, **C)** Agalla inducida por *Mi*. (Tukey, $p < 0.05$).

2.3.2. Expresión relativa de genes *PRs* en raíces de *A. thaliana* inoculadas con NAGs

A excepción de los 7 dpi, en general los tres genes evaluados (*PR3*, *PR4*, y *VSP*) fueron sobre-expresados en respuesta a la inoculación con NAGs (los niveles fueron superiores a los registrados en las plantas Control “sin nematodo”). A 2 dpi, el nivel de expresión del gen *PR3* en el tratamiento *Me* fue 27.0233 % superior al registrado por *Mi*, y 32.0818 % inferior al de *Na* ($p < 0.05$); por otra parte, la expresión en el tratamiento *Na* fue superior a los de *Mi* y *Me* (87.0242 % y 47.2361 %, respectivamente) ($p < 0.05$). A 14 dpi, la expresión de este gen en el tratamiento *Me* fue 127.2261 % superior a la de *Mi*, y 195.6363 % con respecto a *Na* ($p < 0.05$); mientras que para *Na*, la expresión génica fue 66.1746 % inferior a la de *Me* ($p < 0.05$) (Fig. 13A). Entre los diferentes tiempos de evaluación, a 14 dpi los niveles de expresión en *Me* se incrementaron en un 200.9663 % y 346.3475 % con respecto a los 2 y 7 dpi, respectivamente. Para *Na*, a 7 dpi los niveles disminuyeron en un 70.9772 % con respecto a los 2 dpi, y posteriormente a 14 dpi se incrementaron en un 138.2531 %.

A 2 dpi, el nivel de expresión del gen *PR4* en el tratamiento *Me* fue superior a los registrados por *Mi* y *Na* (203.3707 % y 47.1389 % respectivamente) ($p < 0.05$); por otra parte, la expresión en el tratamiento *Na* fue superior a *Mi* 106.179 % y 32.0370 % inferior al de *Me* (Fig. 13B). Adicionalmente, a 14 dpi los niveles de expresión en *Me* se incrementaron en un 22.1111 % y 1045.7645 % con respecto a los 2 y 7 dpi, respectivamente. Para *Na*, a 7 dpi los niveles

disminuyeron en un 65.3024 % con respecto a los 2 dpi, y a 14 dpi se incrementaron en un 289.2806 %.

A 2 dpi, el nivel de expresión del gen *VSP* en el tratamiento *Me* fue 244.9365 % superior al registrado por *Mi* ($p < 0.05$); con respecto al registrado por *Na* no se presentaron diferencias significativas. La expresión en el tratamiento *Na* fue superior a *Mi* en un 232.8568 %. A 14 dpi, la expresión de este gen en el tratamiento *Me* fue 228.5078 % superior al de *Na* ($p < 0.05$); mientras que para *Na* fue 69.7652 % inferior con respecto a *Me* ($p < 0.05$) (Fig. 13A). A 14 dpi los niveles de expresión en *Me* se incrementaron en un 1871.6336 % y 4795.6521 % con respecto a los 2 y 7 dpi, respectivamente. Para *Na*, a 7 dpi los niveles disminuyeron en un 73.7918 % con respecto a los 2 dpi, y a 14 dpi se incrementaron en un 2257.0967 %.

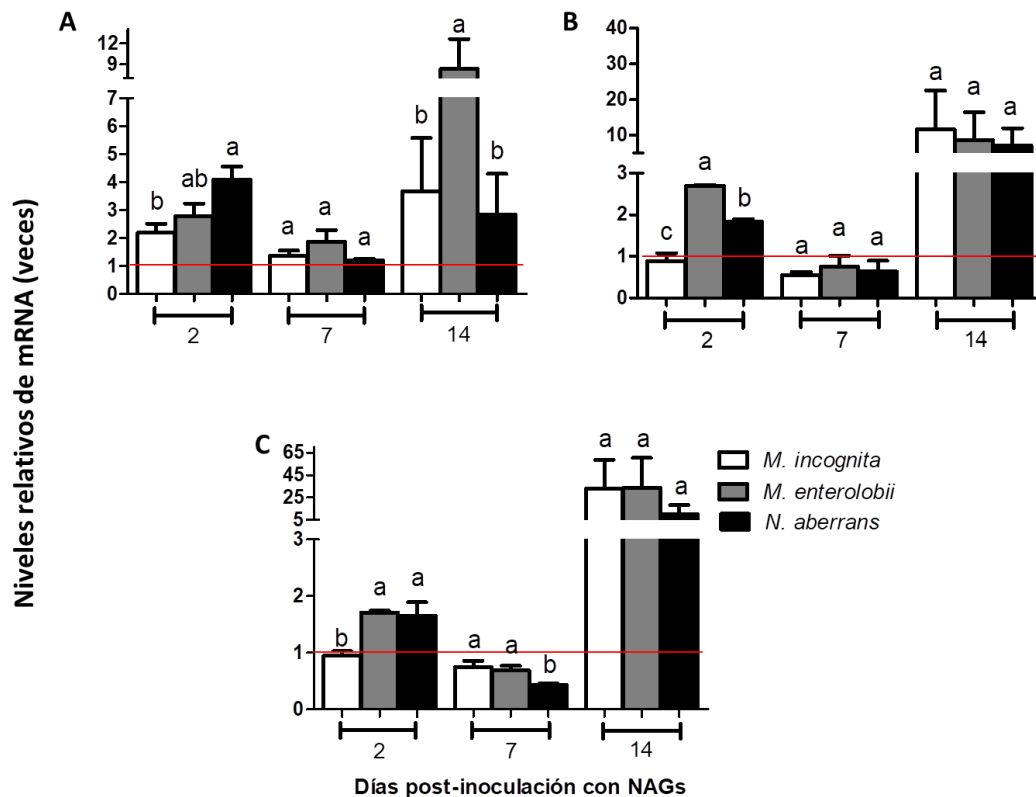


Figura 13. Niveles de expresión de genes marcadores de RSI y de ácido jasmónico en raíces de *A. thaliana* a diferentes tiempos post-inoculación con NAGs. A) *PR3* (Quitinasa clase I-VI), B) *PR4* (Quitinasa clase I-II) y C) *VSP* (proteína de reserva vegetativa). Valores de expresión por debajo de la línea roja indican represión, y encima de la línea roja sobre-expresión. Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar ($n = 4$). Barras con letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, $p < 0.05$).

2.3.3. Expresión relativa de genes *PRs* en follaje de *A. thaliana* inoculada con NAGs

En el primer tiempo de evaluación, los mayores niveles de expresión de los genes *PR3*, *PR4*, y *VSP* fueron registrados en el follaje de plantas inoculadas con *Me* y *Na*. A 2 dpi, el nivel de expresión de *PR3* en el tratamiento *Me* fue 49.2987 % inferior al registrado por *Mi*, y 93.93 % inferior al de *Na* ($p < 0.05$); por otra parte, la expresión en el tratamiento *Na* fue superior a los de *Mi* y *Me* (853.8014 % y 1553 %, respectivamente) ($p < 0.05$). A 7 dpi *Na* fue superior a *Mi* y *Me* (2279.3373 % y 928.5327 %, respectivamente) ($p < 0.05$) (Fig. 14A). Entre los diferentes tiempos de evaluación, a 14 dpi los niveles de expresión en *Me* disminuyeron en un 95.7854 % y 87.5944 % con respecto a los 2 y 7 dpi ($p < 0.05$), respectivamente. Para *Na*, a los 7 y 14 dpi las reducciones fueron de un 78.8611 % y 97.4503 %, respectivamente ($p < 0.05$).

A 2 dpi, el nivel de expresión del gen *PR4* en el tratamiento *Me* fue 41.4505 % superior al registrado por *Mi*, ($p < 0.05$); mientras que en el tratamiento *Na* fue 40.7635 superior a *Mi* ($p < 0.05$). A 7 dpi la expresión en *Na* y *Me* fue inferior a *Mi* (70.0563 % y 89.5011 % respectivamente) ($p < 0.05$). A 14 dpi, *PR4* fue reprimido en todos los tratamientos (Fig. 164B). A 14 dpi los niveles de expresión de este gen en el tratamiento *Me* disminuyeron en un 98.5476 % y 57.8059 % con respecto a los 2 y 7 dpi ($p < 0.05$), respectivamente. Para *Na*, a los 7 y 14 dpi los niveles disminuyeron en un 90.10 % y 96.1499 %, respectivamente con respecto a los 2 dpi ($p < 0.05$).

Para el gen *VSP*, a 2 dpi, el nivel de expresión en el tratamiento *Me* fue 276.1904 % superior al registrado por *Mi*, ($p < 0.05$) y 80.1735 % inferior al registrado por *Na*; mientras que la expresión en el tratamiento *Na* fue superior a *Mi* y *Me* (1797.4126 % y 404.3755 % respectivamente) ($p < 0.05$). A 7 dpi en el tratamiento la expresión de *Me* y *Mi* fue inferior a *Na* (58.6032 % y 68.4723 % respectivamente) ($p < 0.05$). A 14 dpi, el tratamiento con *Me* fue inferior al de *Mi* y *Na* (85.9886 % y 86.1031 % respectivamente) ($p < 0.05$); para el tratamiento con *Na* la expresión fue 619.5882 % superior a la de *Me* (Fig. 14C). A 14 dpi los niveles de expresión en *Me* disminuyeron en un 48.4848 % y 87.5612 % con respecto a los 7 y 2 dpi

($p < 0.05$), respectivamente. Para *Na*, a los 7 y 14 dpi los niveles disminuyeron en un 84.8156 % y 82.2537 %, respectivamente con respecto a los 2 dpi ($p < 0.05$).

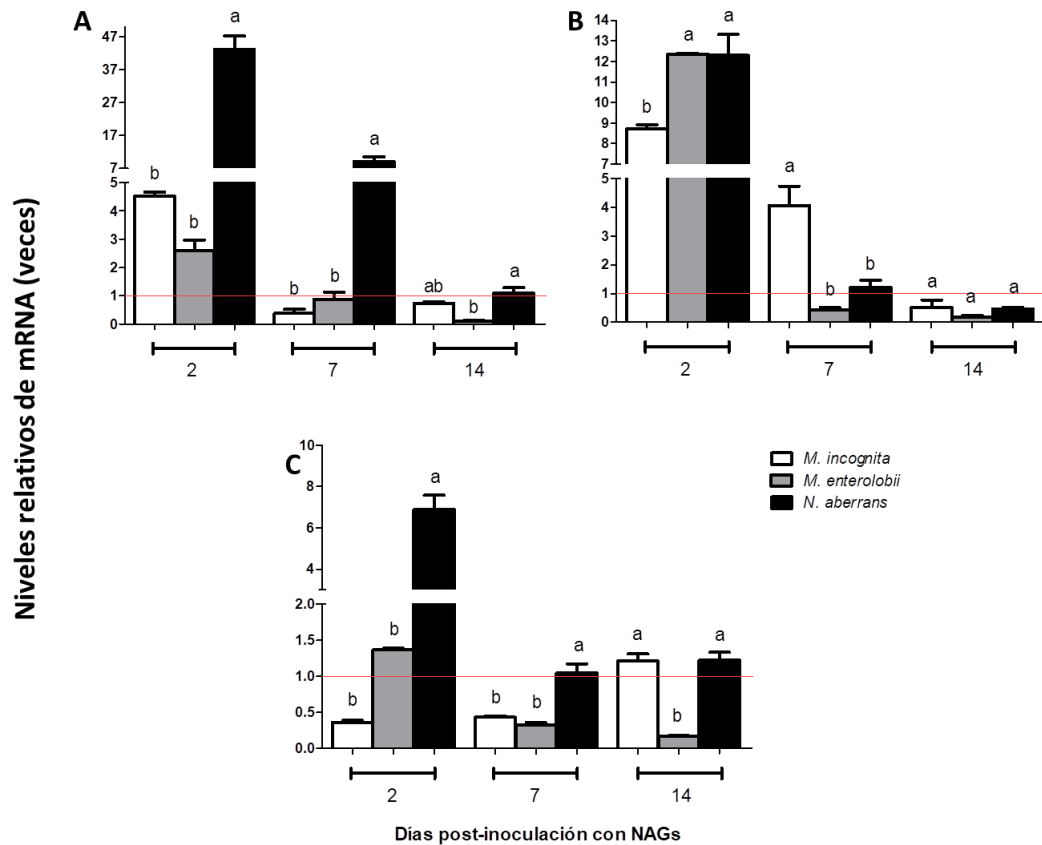


Figura 14. Niveles de expresión de genes marcadores de RSI y de ácido jasmónico en el follaje de *A. thaliana* a diferentes tiempos post-inoculación con NAGs. **A)** *PR3* (Quitinasa clase I-VI), **B)** *PR4* (Quitinasa clase I-II) y **C)** *VSP* (proteína de reserva vegetativa). Valores de expresión por debajo de la línea roja indican represión, y encima de la línea roja sobre-expresión. Cada barra representa el promedio \pm desviación estándar ($n = 4$). Barras con letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, $p < 0.05$).

2.4. Discusión

Los nematodos agalladores *Meloidogyne* spp. y *N. aberrans*, además de su relevancia económica, también son de interés científico por su marcada especialización parasítica para inducir alteraciones transcripcionales en sus hospedantes, generalmente por la acción de sus efectores (Caillaud, *et al.*, 2008; Eves-van der Aker *et al.*, 2014). En respuesta al ataque por patógenos, las plantas activan sus mecanismos de defensa a nivel local y sistémico, la regulación de estas defensas es promovida por la acción de varias fitohormonas y se diferencian en resistencia sistémica adquirida (RSA: por ácido salicílico) e inducida (RSI: por ácido jasmónico y etileno) (Bari y Jones, 2009; Pieterse *et al.* 2009). La implicación de la RSI ha sido escasamente documentada en la interacción planta-nematodo agallador. En el presente estudio, dada la relevancia de estos fitoparásitos en la agricultura, en plantas de *A. thaliana* infectadas por *M. enterolobii* y *N. aberrans* se determinaron los niveles de expresión de genes marcadores de RSI (*PR3* y *PR4*), y de ácido jasmónico (*VSP*) a nivel local (raíces) y sistémico (follaje); y adicionalmente, se monitoreó el desarrollo de los nematodos en las raíces.

Los resultados sobre el desarrollo de NAGs en raíces de *A. thaliana* revelaron que *M. enterolobii* al igual que *M. incognita* concluyó con éxito su ciclo de vida, debido a que a 30 dpi fue evidente la presencia de hembras adultas, masas de huevecillos y una segunda generación de individuos (juveniles de segundo estadio). Se ha documentado, que para *Meloidogyne* spp, el juvenil de segundo estadio (J2) penetra la raíz y migra intercelularmente a las células del cilindro vascular, cada J2 selecciona entre cinco y siete células parenquimatosas para formar los sitios especializados de alimentación (SEA); los SEA consisten de células gigantes multinucleadas (CGM) que le proveen al nematodo los nutrimentos necesarios para su crecimiento y reproducción (Abad *et al.*, 2008; Caillaud *et al.* 2008). Posteriormente, el J2 muda al tercer y cuarto estadio, y ocurre el proceso de diferenciación sexual en machos y hembras (Bridge y Starr, 2007; Caillaud *et al.*, 2008). El ciclo concluye cuando la hembra adulta ovoposita los huevecillos en una matriz gelatinosa (Abad *et al.*, 2008; Caillaud *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 2008; Gheysen y Mitchum, 2011; Rosso *et al.*, 2012). En *A. thaliana*, el ciclo de vida de *Meloidogyne* spp usualmente tiene una duración de 20 días aproximadamente; en este trabajo, a 7 dpi se observó una mayor cantidad de individuos de *M. enterolobii* en

contraste con *M. incognita*, el mayor número puede deberse a la alta agresividad de este nematodo y a su capacidad para superar las barreras de defensa (Brito *et al.* 2007; Castagnone-Sereno, 2012). Con relación a *N. aberrans*, los resultados no fueron suficientes para determinar con solidez el tipo de interacción que establece con *A. thaliana*, pues a 30 dpi, la planta concluyó su ciclo de vida, por ello el nematodo no pudo desarrollarse hasta el estadio adulto. En contraste con *Meloidogyne* spp, la migración de *N. aberrans* es intracelular. El J2 de este nematodo ingresa a la raíz, y hasta el cuarto estadio es de hábito migratorio (sale y reingresa a la raíz), ocurre la diferenciación del J4, luego la hembra inmadura induce la formación del SEA (sincitio), comienza su hábito sedentario, y una vez que alcanza su madurez ovoposita sus huevecillos en una matriz gelatinosa (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Eves-van den Akker *et al.*, 2014). En la mayoría de sus hospedantes la duración del ciclo de vida puede ser de hasta 90 dpi (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Por otra parte, la menor proporción de *M. enterolobii*, *M. incognita* y *N. aberrans* a 2 dpi, se debe a que el proceso de invasión puede durar desde algunas horas hasta varios días, inicia desde las 3 hpi como lo reportó Gourd *et al.*, (1993) quienes evaluaron la tasa de penetración de *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica* y *Heterodera glycines* en raíces de *Glycine max* L. Este proceso puede extenderse hasta varios días como lo reportado por Sousa *et al.*, (2017), quienes encontraron la presencia de J2 a los 5 días dpi lo que concuerda con lo obtenido en este trabajo, pues a los 7 días aún se encontraron algunos J2. De igual manera a los 7 dpi fue el tiempo de muestreo en el que se presentó la mayor cantidad de nematodos por raíz, lo que se puede deber a que en este periodo ya penetra el número total de individuos. Nuestros datos se relacionan con los obtenidos por Arens *et al.*, (1981) quienes reportaron la mayor cantidad de nematodos de *M. javanica* a los 6 dpi en plantas de *Nicotiana tabacum* con 124 nematodos dentro de las raíces, y de *M. arenaria* a los 8 dpi con 108 nematodos. Posteriormente a los 14 días se presentó una disminución con respecto a los 7 días y eso se lo atribuimos a que durante el proceso de diferenciación, las hembras permanecen en las raíces, mientras que los machos salen de éstas (Caillaud *et al.*, 2008). En *Meloidogyne* a los 30 días se obtuvo un incremento en el número de nematodos por raíz, debido a una nueva generación de individuos (Escobar *et al.*, 2015).

Con respecto a la expresión de genes marcadores de RSI, y de ácido jasmónico; en todos los tiempos de evaluación, tanto en raíz como en follaje, la expresión de los genes *PR3*, *PR4* y *VSP* fue diferencial. *N. aberrans*, *M. enterolobii*, y *M. incognita* indujeron y reprimieron los niveles de expresión, este fenómeno es similar a los cambios transcripcionales reportados en otras interacciones planta-nematodo agallador. Por ejemplo, Kumari *et al.* (2016), en plantas de arroz (*Oryza sativa*) inoculadas con *M. graminícola*, reportaron una expresión diferencial a nivel local y sistémico de genes relacionados con el ácido jasmónico (AJ); similarmente, Kammerhofer *et al.*, (2015) encontraron que la expresión génica de genes relacionados con AJ es diferencial a nivel local en *A. thaliana* infectada por *Heterodera schachtii*. A nivel local (raíces), a 2 dpi, la sobre-expresión génica inducida por los tres nematodos se asocia con la penetración y migración del nematodo en la raíces de *A. thaliana* (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Escobar *et al.*, 2015). Para el caso particular de *N. aberrans* la migración es intracelular, lo que implica un mayor daño y por tanto una mayor respuesta por parte del hospedante (Manzanilla-López *et al.*, 2002). El movimiento migratorio de *N. aberrans* puede provocar necrosis en las raíces lo que conduce a la expresión diferencial de los genes evaluados (Manzanilla-López, 2010; Eves-van den Akker *et al.*, 2014). Eves-van den Akker *et al.*, (2014) encontraron similitudes entre algunos genes codificantes para factores de patogenicidad en *N. aberrans* con aquellos de *Globodera pallida*, ellos realizaron un análisis del transcriptoma y revelaron que cerca de la mitad de una familia de 36 efectores de *Globodera* fue hallada en J2 de *N. aberrans*. En *G. pallida* estos efectores se relacionan con el proceso de migración celular, la represión de defensa y la formación del sincitio. La reducida expresión génica observada a 7 dpi, particularmente para *M. enterolobii* y *M. incognita*, puede relacionarse con la formación de las células gigantes multinucleadas, para este proceso es necesaria una represión efectiva de los mecanismos de defensa, de tal forma que no se afecte el desarrollo del nematodo (Caillaud *et al.*, 2008). A 14 dpi, aun cuando los tres genes fueron sobre-expresados, está asociado con la serie de eventos metabólicos que tienen lugar a nivel local, dicha activación podría estar asociada con la protección del sitio especializado de alimentación (SEA) de la invasión por microorganismos oportunistas. A este último tiempo, el hecho de que raíces de *A. thaliana* inoculadas con *N. aberrans* sobre-expresen a *PR3*, *PR4* y *VSP*, se relaciona con el hábito migratorio de este nematodo (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

A nivel sistémico (follaje), la sobre-expresión génica exhibida a 2 dpi también tiene relación con el proceso de migración de los NAGs en las raíces (Manzanilla-López et al., 2002; Escobar et al., 2015). Usualmente, los niveles de expresión se redujeron con el paso del tiempo, debido al establecimiento exitoso de *M. enterolobii* y *M. incognita* en la raíz, para el caso de *N. aberrans* se asocia con el hábito migratorio de todos sus estadios larvarios. Se ha reportado que durante el proceso de infección los nematodos inducen necrosis iniciales, antes de instalarse en el cilindro vascular y comenzar la formación del sitio especializado de alimentación (Williamson y Hussey, 1996). Para las especies de *Meloidogyne* la posterior disminución o represión de los genes *PR3* y *PR4*, puede deberse a la inducción del sitio especializado de alimentación, pues con el fin de desarrollar los SEA, el nematodo inyecta efectores que van a provocar los cambios metabólicos necesarios para obtener los nutrientes (Jammes, et al., 2005; Ling, et al., 2017), y para llevar a cabo este proceso varios de estos efectores tienen un efecto negativo sobre la expresión de genes relacionados con la defensa como aquellos regulados por ácido jasmónico (Nahar, et al., 2011; Kumari, et al., 2016). En los diferentes días muestreados se pudo observar que la expresión de genes fue diferente para *M. enterolobii* y *M. incognita*, esto puede ser producto de los efectores producidos e inyectados por cada uno de los nematodos, pues al pertenecer a diferentes especies los efectores van a tener algunas diferencias entre ambos (Hewezi y Baum 2012; Zhuo et al., 2017). La expresión del gen *PR3* de forma local se relaciona con lo reportado por Hamamouch, et al. (2011) quienes observaron una expresión diferencial en plantas de *A. thaliana* inoculadas con *M. incognita*, al igual que en plantas infectadas con *Heterodera schachtii*. Esto también se relaciona con los datos obtenidos por Hewezi, et al. (2010), quienes encontraron que *PR3* se mantiene en estado basal a los 7 dpi en plantas de *A. thaliana* inoculada con *H. schachtii*. A nivel local, a 14 dpi con NAGs, los niveles de expresión de *PR4*, fueron diferentes a los reportados por Hamamouch, et al. (2011), quienes encontraron niveles basales en todos los tiempos de evaluación en plantas de *A. thaliana* inoculadas con *M. incognita* y *H. schachtii*, esto se le puede atribuir al sistema de experimentación empleado, pues en este trabajo se realizó en sustrato (arena-Peat-moss) mientras que Hamamouch et al. utilizaron un sistema *in vitro*, por lo que el comportamiento de los nematodos es diferencial en estos dos sistemas empleados. A nivel sistémico, los resultados fueron similares. La sobre-expresión de este gen también fue acorde a lo reportado por Kammerhofer et al. (2015) en *A.*

thaliana inoculada con *H. schachtii*. Cabe mencionar que *H. schachtii*, tiene ciertas similitudes con el ciclo de *N. aberrans*.

En interacciones incompatibles, cuando los efectores de un patógeno interactúan con los productos de genes *R* del hospedante, se desencadena la síntesis y señalización de AJ/ET, provocando la sobre-expresión de genes que codifican para factores de transcripción (Niu *et al.*, 2011; Hamamouch *et al.*, 2011) Esto incrementa la cantidad de genes en el citosol, lo que lleva a la expresión de genes que codifican para PRs, y en consecuencia ocurre la defensa contra patógenos como por ejemplo nematodos, (Niu *et al.*, 2011; Hamamouch *et al.*, 2011). Su función principal dentro de la planta va a ser de defensa, *PR3* codifica para Quitinasas (clase I-VI) y *PR4* para Quitinasa (clase I-II) (Jain, 2018). La sobre-expresión de genes *PR3* y *PR4* resulta perjudicial para los nematodos porque activa la respuesta de defensa de la planta dependiente para ácido jasmónico, lo que puede dificultar su ciclo de vida (Niu, 2011; Hamamouch, *et al.*, 2011). Al ser quitinasas van a tener un efecto directo sobre la quitina que forma parte de la cutícula de algunos insectos, y en conjunto con las glucanasas tienen acción perjudicial sobre la pared celular de hongos, al degradarla (Bidochka y Khachatourians, 1988; Donzelli y Harman, 2001).

Por otra parte, los genes *VSP* que codifican para proteínas VSP se sintetizan y se acumulan transitoriamente en vacuolas celulares y son utilizadas para el crecimiento de las plantas y el desarrollo de nuevos órganos (Utsugi *et al.*, 1998). Se ha propuesto que las VSP pueden ser necesarias como fuente de nitrógeno para sintetizar diversas sustancias para la defensa contra plagas o patógenos o para la regeneración de tejidos (Utsugi *et al.*, 1998). En este trabajo se observó que a los 2 dpi con *M. enterolobii* y *N. aberrans*, el gen fue sobre-expresado y posteriormente reprimido, lo que concuerda con lo reportado por Berger, *et al.* (2002), quienes al evaluar el gen *VSP* de forma sistémica observaron que a los 3 dpi el gen se sobre-expreso en plantas de *A. thaliana* inoculadas con larvas de *Spodoptera littoralis*, datos similares fueron presentados por Stein, *et al.* (2008) en plantas de *A. thaliana* inoculadas con *Piriformospora indica* para inducir la resistencia hacia un hongo fitopatógeno, registrando una sobre-expresión a 3 dpi y una posterior represión a 6 dpi. Por otro lado, estudios demuestran que *VSP* se expresa a 3 dpi para reprimirse a los 6 dpi en plantas de *Arabidopsis* inoculadas con larvas de

Spodoptera littoralis datos contrarios a los obtenidos en este trabajo, lo que puede deberse al tipo de patógeno con el que se trabajó, a los diferentes efectores inyectados por los patógenos, así como a las condiciones climáticas.

2.5. Conclusiones

Meloidogyne enterolobii se desarrolló y concluyó con éxito su ciclo de vida en raíces de *A. thaliana* (presencia de hembras adultas y formación de agallas), aparentemente la agresividad de este nematodo fue superior a la de *M. incognita*, en ambos casos la interacción fue de tipo compatible. En cuanto a *Nacobbus aberrans*, los resultados obtenidos sugieren una interacción incompatible pues no fue observable la presencia de hembras adultas ni hubo formación de agallas en las raíces de *A. thaliana*. Con respecto a los niveles de expresión de genes marcadores de RSI (*PR3* y *PR4*), y de ácido jasmónico (*VSP*), esta fue diferencial, *M. enterolobii* y *N. aberrans* modificaron los niveles a nivel local (raíces) y sistémico (follaje), dicho fenómeno fue contrastante con lo registrado en las plantas Control. Los resultados a nivel local sugieren que la sobre-expresión en etapas tardías puede ser producto de una estrategia de los nematodos para activar AJ y evitar la respuesta hipersensible producto de la respuesta de defensa dependiente de AS. Por último, la modulación diferencial de los genes *PR3*, *PR4* y *VSP* sugiere que los nematodos evaluados son capaces de interferir con la fitohormona ácido jasmónico y tener un efecto negativo sobre la respuesta de defensa de la planta.

2.6. Literatura citada

1. Abad P., J. Gouzy, J-M. Aury, P. Castagnone-Sereno, E. G. Danchin, E. Deleury. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. Nat. Biotechnol. 28(6):909-915.
2. Arens M. L., J. R. Rich, y D. W. Dickson. 1981. Comparative studies on root invasion, root galling, and fecundity of three *Meloidogyne* spp. on a susceptible tobacco cultivar. J. nematol. 13(2):201.
3. Berger S., T. Mitchell-Olds, y H. U. Stotz. 2002. Local and differential control of vegetative storage protein expression in response to herbivore damage in *Arabidopsis thaliana*. Physiol. Plant. 114(1):85-91.
4. Bidochka M. J., y G. G. Khachatourians. 1988. N-Acetyl-D-Glucosamine Mediated Regulation of Extracellular Protease in the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. Appl. Environ. Microbiol. 54(11):2699-2704.
5. Bridge J. y J. L. Starr. 2007. Plant Nematode Biology and parasitism. In Plant nematodes of agricultural importance. J. Bridge, & J. L. Starr (eds). London. 2007. Manson Publishing Ltd (ed). págs. 5-18.
6. Brito J. A., J. D. Stanley, R. Kaur, R. Cetintas, M. Di Vito, J. A. Thies, D. W Dickson. 2007. Effects of the *Mi-1*, *N* and Tabasco genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* on tomato and pepper genotypes. J Nematol, 39(4):327.
7. Bybd Jr D. W., T. Kirkpatrick, B. K. 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. J. nematol. 15(1):142.
8. Caillaud M. C., G. Dubreuil, M. Quentin, L. Perfus-Barbeoch, P. Lecomte, J. d. A. Engler, P. Abad, M. N. Rosso, B. favery. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. J. Plant Physiol. 165(1):104-113.
9. Cardona-Piedrahíta L. F., J. Castaño-Zapata, N. C. Aguirre. 2016. Respuesta de quince introducciones de tomate cherry (*Solanum lycopersicum* L.) al nemátodo Nodulador (*Meloidogyne* spp. GOELDI) e identificación de las especies. Revista Acad. Colomb. Ci. Exact. 40(156):450-460.

-
10. Chávez-Avilés M. N., C. L. Andrade-Pérez y H. Reyes de la Cruz, 2013. PP2A mediates lateral root development under NaCl-induced osmotic stress throughout auxin redistribution in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil*. 68:591–602.
 11. Davis E. L., R. S. Hussey, M. G. Mitchum, T. J. Baum. 2008. Parasitism proteins in nematode–plant interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11(4):360-366.
 12. Donzelli, G. G., Harman, E. G. 2001. Interaction of Ammonium, Glucose, and Chitin Regulates the Expression of Cell Wall-Degrading Enzymes in *Trichoderma atroviride* Strain P1. *Environ. microbiol*, 67(12):5643–5647.
 13. Escobar C., M. Barcalaa, J. Cabrera, C. Fenoll. 2015. Overview of Root-Knot Nematodes and Giant Cells. *In Plant Nematode Interactions: A View on Compatible Interrelationships*. C. Escobar, y C. Fenoll (eds). España. 2015. Academic Press (ed).731-32.
 14. Eves-van den Akker S., C. J. Lilley, E. G. J. Danchin, C. Rancurel, P. A. J. Cock, P. E. Urwin, J. T. Jones. 2014. The transcriptome of *Nacobbus aberrans* reveals insights into the evolution of sedentary endoparasitism in plant-parasitic nematodes. *Genome Biol. Evol.* 6(9):2181-2194.
 15. Gheysen G., M. G. Mitchum. 2008. Molecular insights in the susceptible plant response to nematode infection. *In Plant Cell Monographs*. D. G. Nick (ed). Berlin. Springer (ed).45-81.
 16. Gheysen G., M. G. Mitchum. 2011. How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 14(4):415-421.
 17. Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 205-227.
 18. Gleason C., N. Leelarasamee, D. Meldau, I. Feussner. 2016. OPDA Has Key Role in Regulating Plant Susceptibility to the Root-Knot Nematode *Meloidogyne hapla* in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci.* 7:1-15.
 19. Gourd T. R., D. P. Schmitt, y K. R. Barker, 1993. Penetration rates by second-stage juveniles of *Meloidogyne* spp. and *Heterodera glycines* into soybean roots. *J. nematol.* 25(1):38.

-
20. Hamamouch N., C. Li, P. J. Seo, C. M. Park, E. L. Davis. 2011. Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 12(4):355-364.
 21. Hewezi T. y T. J. Baum, 2012. Manipulation of Plant Cells by Cyst and Root-Knot Nematode Effectors. *Mol Plant Microbe Interact.* 26(1):9-16.
 22. Hewezi T., P. J. Howe, T. R. Maier, R. S. Hussey, M. G. Mitchum, E. L. Davis, 2010. *Arabidopsis* spermidine synthase is targeted by an effector protein of the cyst nematode *Heterodera schachtii*. *Plant Physiol.* 152(2):968-984.
 23. Jammes F., P. Lecomte, J. de Almeida- Engler, F. Bitton, M.-L. Martin-Magniette, J. P. Renou, P. Abad y B. Favery. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 44:447–458.
 24. Jones J. T., A. Haegeman, E. G. J. Danchin, H. S. Gaur, J. Helder, M. G. K. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-López, J. E. Palomares-Rius, W. M. L. Wesemael R. N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 14(9):946-961.
 25. Kammerhofer N., Z. Radakovic, J. M. Regis, P. Dobrev, R. Vankova, F. M. Grundler, 2015. Role of stress-related hormones in plant defence during early infection of the cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 207:778–789.
 26. Kumari C., T. K. Dutta, P. Banakar, U. Rao, 2016. Comparing the defence-related gene expression changes upon root-knot nematode attack in susceptible versus resistant cultivars of rice. *Scientific Reports.* 6:1-13.
 27. Ling J., Z. Mao, M. Zhai, F. Zeng, Y. Yang, y B. Xie, 2017. Transcriptome profiling of *Cucumis metuliferus* infected by *Meloidogyne incognita* provides new insights into putative defense regulatory network in Cucurbitaceae. *Scientific reports.* 1-15.
 28. Manzanilla-López R. H. 2010. Speciation within *Nacobbus*: consilience or controversy? *Nematology*, 12(3):321-334.
 29. Manzanilla-López R. H., M. A. Costilla, M. Doucet, J. Franco, R. N. Inerra, P. S. Lehman, K. Evans. 2002. the genus *nacobbus* thorne & allen, 1944 (nematode: *pratylenchidae*): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica.* 32(2):149-227.

-
30. Méndez- Inocencio C. 2013. *Arabidopsis thaliana* un modelo en el estudio de expresión de los genes CoI1, PDF1. 2 y PR2 en la interacción compatible e incompatible con *Nacobbus aberrans*.
 31. Moens M., R. N. Perry, y J. L. Starr, 2009. *Meloidogyne* species—a diverse group of novel and important plant parasites. Root-knot nematodes, 483.
 32. Murashige T., y F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and Bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15(3):473–497.
 33. Nahar K., T. Kyndt, D. De Vleeschauwer, M. Höfte y G. Gheysen, 2011. The jasmonate pathway is a key player in systemically induced defense against root knot nematodes in rice. *Plant Physiol*. 157(1):305-316.
 34. Niu D. D., H. X. Liu, C. H. Jiang, Y. P. Wang, Q. Y. Wang, H. L. Jin, J. H. Guo. 2011. The plant growth–promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate-and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. *Mol Plant Microbe Interact*. 24(5):533-542.
 35. Perry R. N., M. Moens, y J. L. Starr, 2009. Root-knot nematodes. CABI.
 36. Pieterse C. M., A. Leon-Reyes, S. Van der Ent, S. C. Van Wees. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol*. 5(5):308-316.
 37. Rosso M. N. 2012. 13 Nematode Effector Proteins: Targets and Functions in Plant Parasitism. *In* Effectors in Plant-Microbe Interactions. F. Martin (ed). India. Wiley-Blackwell. 327-354.
 38. Saubeau G., F. Perrin, N. Marnet, D. Andrivon, F. Val. 2016. Hormone signalling pathways are differentially involved in quantitative resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol*. 65(2):342-352.
 39. Schmittgen T. D. y K. J. Livak, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc*. 3(6):1101.
 40. Sousa A. D., E. Pedrosa, M. Régis, C. U. Silva, J. Castro, y J. Ribeiro, 2017. Penetration, development, and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on Psidium species and induced cellular responses in the roots. *Rev. Bras. Frutic*. 39(2):1-16.
 41. Stein E., A. Molitor, K. H. Kogel, y F. Waller, 2008. Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires

-
- jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. *Plant Cell Physiol.* 49(11):1747-1751.
42. Tirumalaraju S., M. Jain, M. Gallo. 2011. Differential gene expression in roots of nematode-resistant and-susceptible peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars in response to early stages of peanut root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*) parasitization. *J Plant Physiol.* 168(5):481-492.
43. Utsugi S., W. Sakamoto, M. Murata, F. Motoyoshi. 1998. *Arabidopsis thaliana* vegetative storage protein (VSP) genes: gene organization and tissue-specific expression. *Plant Mol Biol.* 38(4):565-576.
44. Vrain T. C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. *J. Nematol.* 9(3), 249.
45. Williamson V. M. y C. A. Gleason. 2003. Plant–nematode interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6(4):327-333.
46. Williamson V. M., y R. S. Hussey, 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell*, 8(10), 1735.
47. Zhuo K., J. Chen, B. Lin, J. Wang, F. Sun, L. Hu, 2017. A novel *Meloidogyne enterolobii* effector MeTCTP promotes parasitism by suppressing programmed cell death in host plants. *Mol Plant Pathol*, 18(1):45-54.