



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSGRADO FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

***Arabidopsis thaliana* UN MODELO EN EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE
LOS GENES *COII*, *PDF1.2* Y *PR2* EN LA INTERACCIÓN
COMPATIBLE E INCOMPATIBLE CON *Nacobbus aberrans***

CARLOS MÉNDEZ INOCENCIO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER LE GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2013

La presente tesis titulada: ***Arabidopsis thaliana* UN MODELO DE ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE LOS GENES COI1, PDF1.2 Y PR2 EN LA INTERACCIÓN COMPATIBLE E INCOMPATIBLE CON *Nacobbus aberrans*** realizada por el alumno: **CARLOS MÉNDEZ INOCENCIO**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



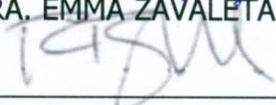
DRA. REYNA I. ROJAS MARTÍNEZ

ASESOR



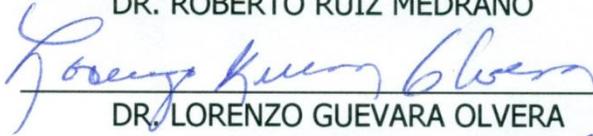
DRA. EMMA ZAVALETA MEJÍA

ASESOR



DR. ROBERTO RUIZ MEDRANO

ASESOR



DR. LORENZO GUEVARA OLVERA

ASESOR



DR. GERARDO ACOSTA GARCÍA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Octubre de 2013

***Arabidopsis thaliana* UN MODELO EN EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE LOS GENES
COII, PDF1.2 Y PR2 EN LA INTERACCIÓN COMPATIBLE E INCOMPATIBLE CON
*Nacobbus aberrans***

RESUMEN

**Carlos Méndez Inocencio, DC.
Colegio De Postgraduados, 2013.**

Los nemátodos fitopatógenos *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne mayaguensis* son de interés económico por su agresividad y rango de hospederos. En este trabajo se usó *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia como modelo de estudio en la interacción con estos nemátodos. Para esto, se evaluó la respuesta sistémica inducida (ISR) en follaje, de genes relacionados con la ruta de señalización de Ácido Jasmónico (JA): *COII* y *PDF1.2* (*PR12*) y el gen de la ruta del Ácido Salicílico: *BGL2* (*PR2*). Los experimentos fueron completamente al azar con inoculación de 100 J2. La evaluación fue a los 1, 2, 3 y 7 días después de la inoculación (ddi). Los niveles relativos de transcritos en roseta se determinaron mediante análisis de PCR en tiempo real (qRT-PCR). Los transcritos de *COII* y *PDF1.2* se incrementaron al inicio de la interacción con ambos nemátodos, por activación mediada por JA. A 3 y 7 ddi se observó incremento de los transcritos de *PDF1.2* en respuesta independiente de *COII*, esto sugiere la inducción de auxinas por ambos nemátodos. *N. aberrans* indujo la expresión de *BGL2* independiente de SA a los 7 ddi. Mientras que *M. mayaguensis* causó la represión *BGL2* de la respuesta dependiente de JA a los 3 y 7 ddi. La respuesta diferente de la planta en la expresión de *PDF1.2* y *BGL2*, posiblemente fue por los hábitos parasíticos de los nemátodos. La respuesta sistémica de la planta durante la infección de los nemátodos activa y reprime las rutas de señalización de JA y SA, respectivamente.

Palabras clave: Col-0, nemátodo falso agallador, *M. enterolobii*, ISR, SAR, PR12, PR2.

**Arabidopsis thaliana A MODEL FOR THE STUDY OF GENE EXPRESSION COI1,
PDF1.2 and PR2 IN COMPATIBLE AND INCOMPATIBLE INTERACTION WITH
Nacobbus aberrans**

ABSTRACT

**Carlos Méndez Inocencio, DSc.
Colegio De Postgraduados, 2013.**

Nacobbus aberrans and *Meloidogyne mayaguensis* are phytopathogenic nematodes, which cause economic losses because their severity and wide host range. In this study the plant model *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia was used to analyze the defense pathways that are activated during the plant-nematode interaction. For this, an evaluation was conducted in foliage for the Induce Systemic Resistance (ISR), by analyzing the expression pattern of the genes related to Jasmonic acid (JA) signaling pathway: *COI1* and *PDF1.2* (*PR12*), and the Salicylic acid (SA) signaling pathway: *BGL2* (*PR2*). Randomized experiments were carried out with 100-J2 inoculum. The samples were collected at 1, 2, 3 y 7 day after inoculation (dai). The gene expression level was determined by quantitative Real time PCR (qRT-PCR). On the interaction with both nematodes, the *COI1* and *PDF1.2* transcripts level increased at the beginning of the interaction, suggested a mediated activation by JA. At 3 and 7 days, *PDF1.2* transcripts level increased in a *COI1*-independent pathway. It shows a putative auxin induction for both nematodes at 7 dai. *N. aberrans* induced *BGL2* expression in a SA-independent pathway at 7 dai. While the *BGL2* repression caused by *M. mayaguensis* was JA-dependent to 3 and 7 dai. The differential response of *PDF1.2* and *BGL2* expression could be by the parasitic habits of both nematodes in *A. thaliana*. During nematode infection, with the plant ISR was observed an activation and repression of the signaling pathways of JA and SA, respectively.

Keywords: Col-0, False root-knot nematode, *M. enterolobii*, ISR, SAR, PR12, PR2.

DEDICATORIA

A mi Familia

A mi Esposa Evelia G.B.

A mis Hijos:

Julisa

Carlos

A mi mamá

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo otorgado que hizo posible la obtención del grado académico.

A los que participaron en mi formación con los diferentes cursos del Colegio de Postgraduados.

Agradezco a mi consejera Dra. Reyna Rojas Martínez, por todo su apoyo y las facilidades brindadas en la realización del presente trabajo.

A mi consejo particular, por darle dirección a mi trabajo, y por facilitarme la entrada a su Laboratorio.

Agradezco el haber podido conocer a los diferentes estudiantes que fueron mis compañeros y a los que me consideran su amigo.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INDICE DE CUADROS	ix
INDICE DE FIGURAS	ix
CAPITULO I. ANTECEDENTES	1
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVO	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	2
Clasificación de los nemátodos Fitopatógenos	2
<i>Nacobbus aberrans</i>	3
<i>Meloidogyne mayaguensis</i>	4
<i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de expresión	5
<i>Arabidopsis thaliana</i> en interacción con nemátodos	6
Proteínas relacionadas con la patogénesis.	7
Rutas de señalización del Ácido Salicílico y Acido Jasmónico	8
Ácido Salicílico	9
Beta-1-3-Glucanasa (<i>PR2</i>)	9
Ácido Jasmónico	10
III. LITERATURA CITADA	11
CAPITULO II. DESARROLLO DE <i>NACOBBUS ABERRANS</i> EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> Y <i>CAPSICUM ANNUM</i>.	17
I. RESUMEN	17
II. INTRODUCCIÓN	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
Material vegetal	18

Inóculo de <i>N. aberrans</i>	19
Análisis estadístico	19
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
Desarrollo de <i>N. aberrans</i> en <i>A. thaliana</i>	20
Desarrollo de <i>N. aberrans</i> en Chile	22
V. LITERATURA CITADA	24
CAPITULO III. EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>COII</i>, <i>PDF1.2</i> Y <i>BGL2</i> DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> DURANTE LA INFECCIÓN DE <i>NACOBBUS ABERRANS</i> Y <i>MELOIDOGYNE MAYAGUENSIS</i>	27
I. RESUMEN	27
II. INTRODUCCIÓN	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
Material vegetal y manejo	30
Inóculo de nemátodos fitopatógenos	31
Extracción de RNA y obtención de cDNA	32
PCR en tiempo Real (qRT-PCR)	32
Análisis estadísticos	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
Respuesta <i>A. thaliana</i> a la infección de <i>N. aberrans</i>	33
Respuesta <i>A. thaliana</i> a la infección de <i>M. mayaguensis</i>	38
V. LITERATURA CITADA	42

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Clasificación de las Proteínas Relacionadas con la Patogénesis (PR)	8
-----------------	---	---

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Nacobbus aberrans</i> .	4
Figura 2	Etapas del desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	5
Figura 3	Sitios de colecta de algunos ecotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> en el mundo.	6
Figura 4	Desarrollo de <i>Nacobbus aberrans</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	21
Figura 5	Desarrollo de <i>Nacobbus aberrans</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	22
Figura 6	Desarrollo de <i>Nacobbus aberrans</i> en Chile (YoloWonder®).	23
Figura 7	Desarrollo de <i>Nacobbus aberrans</i> en Chile (YoloWonder®).	24
Figura 8	Comportamiento de la expresión de los genes <i>COII</i> , <i>PDF1.2</i> y <i>PR2</i> analizados por qRT-PCR, a los 1, 2, 3 y 7 días después de la inoculación con el <i>Nacobbus aberrans</i> .	36
Figura 9	Comportamiento de la expresión de los genes <i>COII</i> , <i>PDF1.2</i> y <i>PR2</i> analizados por qRT-PCR, a los 1, 2, 3 y 7 días después de la inoculación con el <i>Melodogyne mayaguensis</i> .	40

CAPITULO I. ANTECEDENTES

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son parasitadas por nemátodos fitopatógenos, causan pérdidas anuales estimadas de cerca del 8.8-114.6%, o de alrededor de 157 mil millones de dólares anuales en el mundo (Sasser and Freckman, 1987; Koenning *et al.*, 1999; Abad *et al.*; 2008; Nicol *et al.*, 2011). El impacto real del ataque de los nemátodos es mayor que el estimado, ya que estos patógenos no son fáciles de detectar mediante síntomas, por lo que, con frecuencia no se informa el problema con nemátodos y las especies importantes por sitio o área de cultivo no se han evaluado (Singh *et al.*, 2013). El impacto negativo de los nemátodos fitopatógenos puede ser aún mayor sin el uso de estrategias y tácticas para limitar su desarrollo. Las estrategias hasta ahora no han sido eficientes o aceptables para limitar las pérdidas causadas por nemátodos. Es necesario además, considerar el daño directo e indirecto en plantas cultivadas debido a nemátodos y a sus interacciones con otras enfermedades y plagas, entre ellas organismos fúngicos, bacterias, virus, insectos y cultivos arvenses, que puede de manera dramática incrementar las pérdidas (Perry *et al.*, 2006; Nicol *et al.*, 2011).

Los nemátodos fitopatógenos muestran una amplia variedad de interacciones con sus hospederos. Todos tienen estilete protusible, hueco con secreciones que lanza por la boca, usadas para penetrar las células para poder alimentarse y en el caso de los endoparásitos poder penetrar al hospedante. Algunos nemátodos son migratorios ectoparásitos que nunca entran al hospedante, que migran por el suelo y usan las raíces como fuente de alimento durante su travesía. Los nemátodos endoparásitos migratorios entran al hospedante y migran a través de sus tejidos causando grandes daños. Los nemátodos semiendoparásitos pueden tener estadios migratorios, pero penetran parcialmente en el hospedante para poder alimentarse en una etapa de su ciclo de vida cuando son sedentarios, donde inducen un sitio de alimentación. Sin embargo, los nemátodos sedentarios son los de mayor importancia por ser formadores de agallas y quistes, los cuales inducen en el hospedero un sitio de alimentación llamado células gigantes y sincitio respectivamente (Jones *et al.*, 2013). Es de importancia particular el haber encontrado que *Arabidopsis thaliana* puede ser infectada por los dos grupos de nemátodos de mayor importancia, los nemátodos agalladores y los

nemátodos quiste (Sijmons *et al.*, 1991). Por primera vez, todos los recursos desarrollados para el estudio de esta planta modelo fueron disponibles para el estudio de las interacciones planta-nemátodo (Jones *et al.*, 2013).

II. OBJETIVO

Encontrar un modelo para la interacción de *Arabidopsis thaliana* con *Nacobbus aberrans* y evaluar la expresión de genes *COII*, *PDF1.2* y *PR2* de respuesta de defensa en la interacción compatible e incompatible.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

Clasificación de los nemátodos Fitopatógenos

La clasificación de nemátodos actualmente está en estado de cambio constante como las relaciones filogenéticas han aumentado pertinente. Por esta razón, la clasificación mayor está en reacomodo con propuestas para Infraorden y en la unión de grupos los cuales previamente, bajo el sistema de la sistemática clásica, habían sido considerados distantemente relacionados (Decraemer and Hunt, 2006). Para el caso de *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne mayaguensis*, su ubicación taxonómica es:

PHYLUM NEMATODA POTTS, 1932

Class CHROMADOREA INGLIS, 1983

Subclass Chromadoria Pearse, 1942

Orden Rhabditida Chitwood, 1942

Suborden Tylenchina Thorne, 1949

Infraorden Tylenchomonpha De Ley & Blaxter, 2002

Superfamilia Tylenchoidea Örley, 1880

Familia Pratylenchidae Thorne, 1949

Subfamilia Nacobbinae Chitwood *in* Chitwood & Chitwood, 1950

Genero *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944

Especie *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944

Familia Meloidogyninae Skarbilovich, 1959

Genero *Meloidogyne* Goeldi, 1892

Especie *Meloidogyne mayaguensis* Rammah & Hirschmann, 1988(=*Meloidogyne enterolobii* Yang & Eisenback, 1983)

Nacobbus aberrans

N. aberrans es reportado como nemátodo polífago en 18 familias botánicas y 84 especies reportadas como hospedantes, donde se incluye a las especies cultivadas de jitomate, papa, frijol, chile y remolacha (EPPO, 2009). Se reportan pérdidas ocasionadas por este nemátodo de entre 10-65% en América Latina y USA, aunque no se reporta los daños reales ocasionados en todos los cultivos que afecta (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Otro problema asociado con este nemátodo es el rompimiento de la resistencia en chile cuando se asocia con *Phytophthora capsici* (Hernández-Anguiano *et al.*, 1992; López-Martínez *et al.*, 2011). El género *Nacobbus*, el nemátodo falso agallador es endémico de Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador, México, Perú y USA (Jones *et al.*, 2003). Es un nemátodo con hábitos parasíticos, los estadios juveniles y los adultos inmaduros se mueven a través de la raíz y se alimentan de las células, estos juveniles pueden entrar y salir de la raíz varias veces lo que puede ocasionar daño adicional. Solo la hembra madura es sedentaria e induce la disolución parcial de las paredes celulares y la fusión de protoplastos, que resulta en un sitio de alimentación especializado, llamada sincitio, que es parecido al que causan los nemátodos quiste (Jones and Payne, 1977, Holterman *et al.*, 2009). Alrededor del sincitio se forma agallas en la raíz. El modo de reproducción de *Nacobbus* permanece incierto, si es un nemátodo anfimíctico obligado o partenogenético facultativo (Jones *et al.*, 2013). La duración del ciclo de vida de *N. aberrans* puede estar afectado por temperatura, diapausa y el hospedante (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Anthoine *et al.*, 2006) (Figura 1). El nemátodo puede presentar estrategias de cambio tipo r- o K- (o combinación de ambas). La r-estrategia ocurre cuando el ciclo de vida se puede completar en el sistema radical en un tiempo de generación corto (entre 30-60 días a 25°C), mientras que la K-estrategia ocurre cuando el tiempo de generación es largo y como resultado los estadios J3 y J4 pueden estar en reposo en los restos del cultivo y el suelo y cuando haya un cultivo pueden completar su ciclo de vida. Se considera que el estadio J4 está mejor adaptada a la supervivencia, pues cuando se restauran las condiciones óptimas del ambiente los J3 mudan a J4, pero los J4 permanecen quiescentes (Souza and Balwin, 2000).

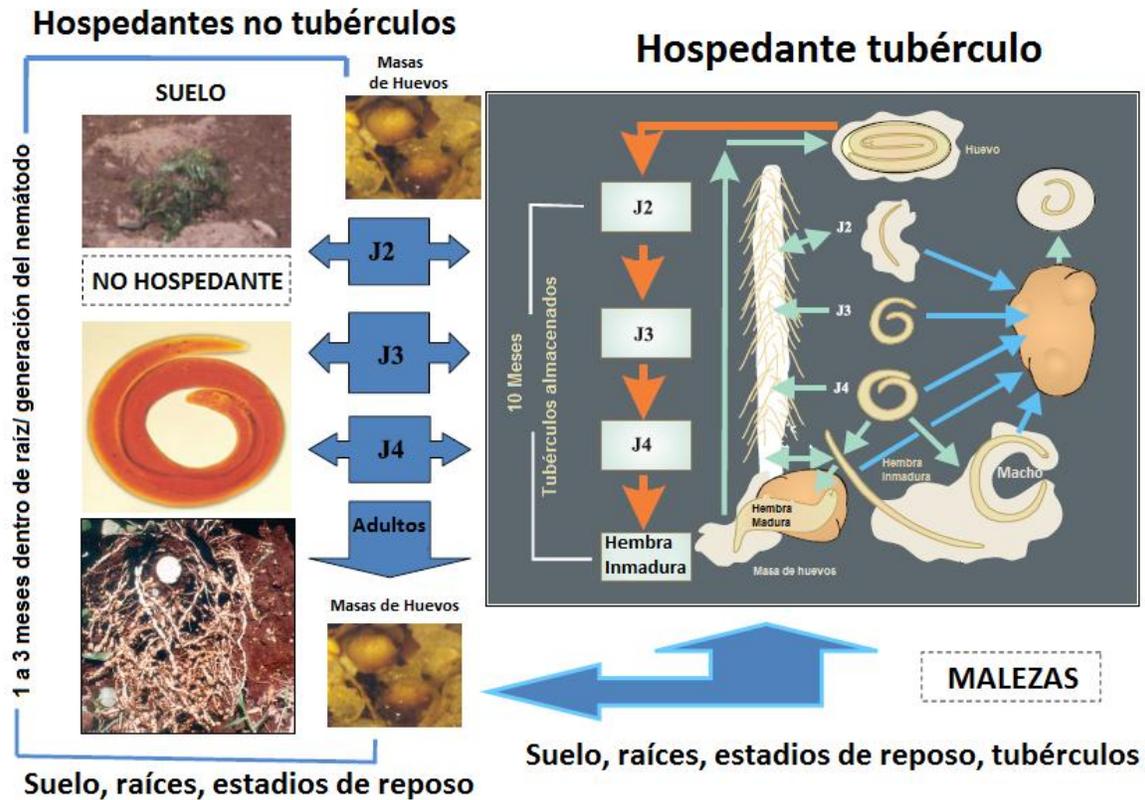


Figura 1. Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans*. Tomado de Manzanilla-López, 2010.

Meloidogyne mayaguensis

Los nemátodos del género *Meloidogyne*, son endoparásitos sedentarios, que interactúan con su hospedante manipulando sus funciones para su beneficio. *M. mayaguensis* es un nemátodo comúnmente considerado la especie emergente más importante de los nemátodos agalladores, por su amplia distribución geográfica, rango de hospederos y su habilidad para superar la resistencia de cultivos importantes, como genotipos de jitomate, chile y cultivos que contienen los genes *Mi-1*, *N* y *Tabasco*, se reportan otros hospederos (Brito *et al.*, 2007; Moens *et al.*, 2010). Además es un nemátodo de alto patogénico y potencial reproductivo, que fue mayor al ser comparado con otros nemátodos agalladores como *M. incognita* o *M. arenaria* (Kiewnick *et al.*, 2009; EPPO, 2011). Su ciclo de vida es similar al de otras especies de *Meloidogyne*, los nemátodos juveniles de segundo estadio (J2) son atraídos hacia las raíces de los hospedantes y después de que han

invadido la raíz (usualmente por la punta de la raíz) se mueven a través de ella para iniciar un sitio de alimentación permanente. Las secreciones de los J2 en las células radicales inducen entonces la diferenciación en un sitio de alimentación multinucleado, llamado células gigantes. Al mismo tiempo que se forman las células gigantes, las células vecinas del periciclo inician su división, hasta formar una agalla típica o nudo en raíz (EPPO, 2011). Los estadios J2 y los machos se pueden encontrar en el suelo, los demás estadios son endoparásitos sedentarios (J3, J4 y hembras) (Moens *et al.*, 2010).

***Arabidopsis thaliana* como modelo de expresión**

A. thaliana una planta arvense dicotiledónea distribuida en diferentes partes del mundo, pertenece a la familia Brassicaceae o de las crucíferas. Por su tamaño pequeño, alto nivel de autofecundación y ciclo de vida corto de seis semanas (Figura 2), hace a esta planta fácil de trabajar en condiciones de laboratorio. Otra característica aceptable de esta planta modelo es toda la variación natural presente en la cantidad de diferentes ecotipos (Figura 3). Se refiere a ecotipo una colecta de germoplasma autofecundado en una localidad en un tiempo dado, que es un germoplasma adaptado a un ambiente específico (Koornneef and Meinke, 2010). Aunque es de uso común el termino ecotipo ahora ha sido reemplazado por accesión. Desde que se inició el trabajo de colecta el número de accesiones se ha incrementado hasta hoy. Las accesiones comúnmente usadas en estudios de genética molecular son Columbia (Col-0), Landsberg erecta (Ler-0) y Wassilewskija (Ws-0) (Koornneef and Meinke, 2010).

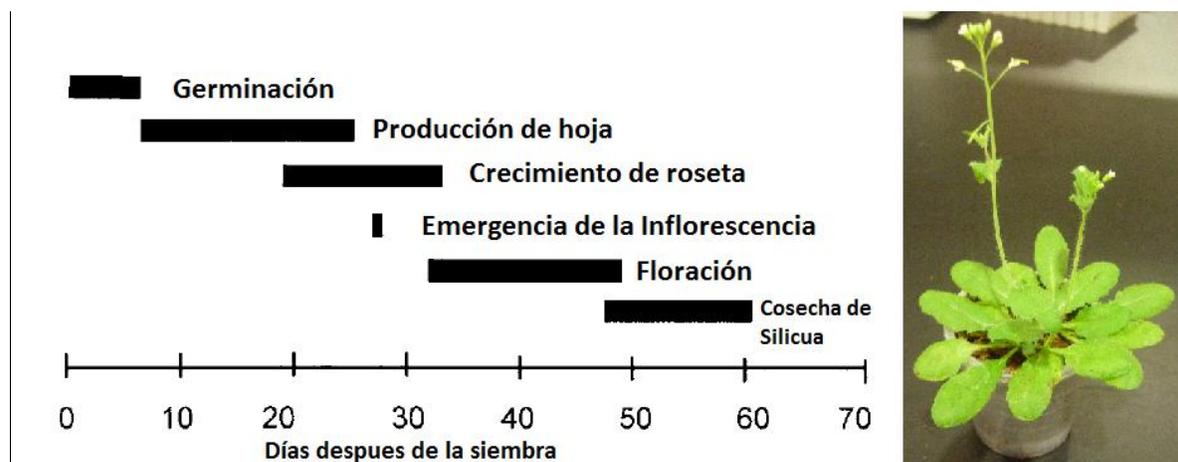


Figura 2. Etapas del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. (Boyes *et al.*, 2001)

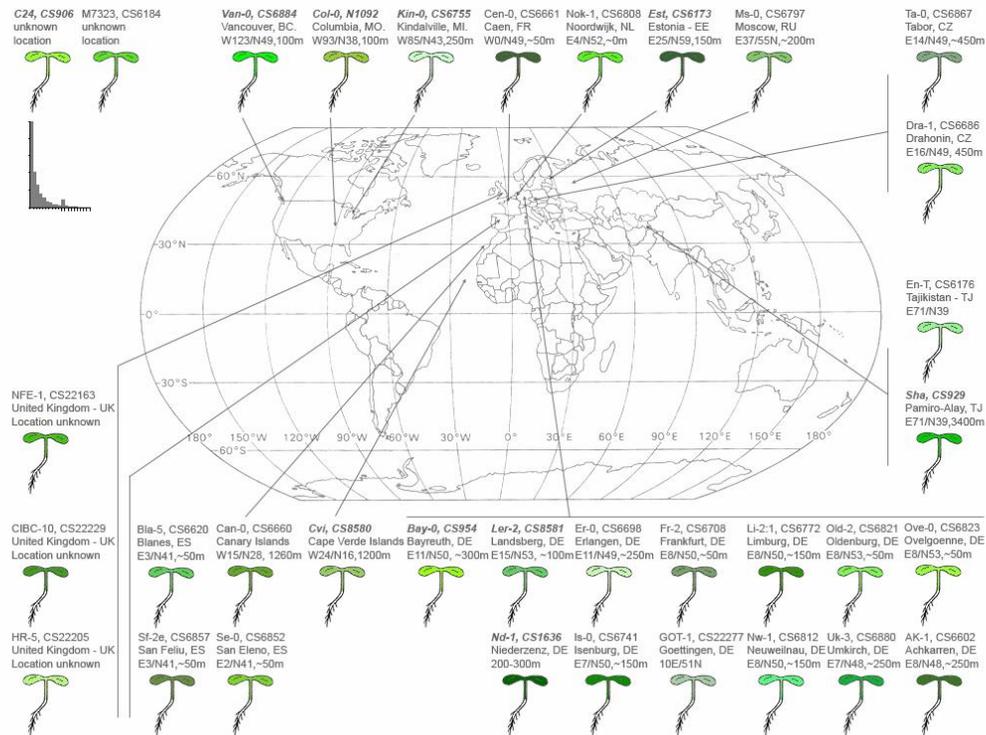


Figura 3. Sitios de colecta de algunos ecotipos de *Arabidopsis thaliana* en el mundo. (Universidad de Toronto <http://www.bar.utoronto.ca/>)

Desde el primer trabajo con *Arabidopsis* desde el 1907, el conocimiento de esta planta se ha incrementado. Fue en los 1980's que *Arabidopsis* fue aceptada como organismo modelo por la comunidad de investigación de la planta y el mayor aporte fue cuando se presentó la secuencia de su genoma en 2000. Fue la primera planta con su genoma completamente secuenciado (AGI, 2000; Somerville and Koornneef, 2002). Ahora los grupos de investigadores que trabajan con esta planta se han incrementado, y la generación de líneas mutantes de genes específicos (AGI, 2000, Koornneef and Meinke, 2010), se encuentran disponibles en sitios como TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource, <http://www.arabidopsis.org>).

***Arabidopsis thaliana* en interacción con nemátodos**

Pocas especies de nemátodos han sido evaluadas en *Arabidopsis*. Se han podido obtener el ciclo completo en *A. thaliana* para especies de nemátodos agalladores que incluye a: *M.*

incognita y *M. arenaria* (Sijmons et al., 1991), *M. javanica* (Wu et al., 1998), *M. hapla* (Boiteux et al., 1999), la especies de nemátodo quiste *Heterodera schachtii*, *H. trifolii*, *H. cajani* (Sijmons et al., 1991), el nemátodo reniforme *Rotylenchulus reniformis* (Urwin et al., 2000) y los nemátodos migratorios *Pratylenchus penetrans* (Sijmons et al., 1991), *P. coffeae* y *Radophulus similis* (Elsen et al. 2001). *P. coffeae* y *Radophulus similis* pueden completar su ciclo de vida en *A. thaliana*, pero la reproducción es baja y es difícil de obtener datos reproducibles (Carlens et al., 2005).

Proteínas relacionadas con la patogénesis.

Las plantas superiores tienen un amplio rango de mecanismos para protegerse contra varias amenazas como las físicas, químicas y estrés biológico, que pueden ser daño mecánico, salinidad, sequía, frío, metales pesado, rayos ultravioleta y ataque a patógenos como organismos fúngos, bacterias, virus y nemátodos (van Loon et al., 2006). Las reacciones de la planta a esos factores son muy complejas e involucran la activación de un set de genes que codifican diferentes proteínas. Esos factores de estrés pueden inducir cambios biológicos y fisiológicos en las plantas, como reforzamiento de la pared celular por lignificación, suberización y deposición de calosa; la producción de compuestos fenólicos, fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), estas proteínas que subsecuentemente pueden prevenir la invasiones de varios patógenos (Bowles, 1990). La acumulación de las PR en la planta en respuesta a la invasión de patógenos y/o estrés es muy importante. Las fitoalexinas son mayormente producidas en las células sanas adyacentes a las células dañadas o necróticas; la producción de las PR en las partes no infectadas puede prevenir la infección de nuevos ataques (3,4). Las PR se clasifican en 17 familias de acuerdo con sus propiedades y función (Cuadro 1), que incluye β -1-3-glucanasas, quitinasa, peroxidasas, defensinas, tioninas, etc. (van Loon and van Strein, 1999).

Cuadro 1. Clasificación de las Proteínas Relacionadas con la Patogénesis (PR). (van Loon *et al.*, 2006)

Familia	Miembro tipo	Propiedades
PR1	Tabaco PR-1a	Desconocida, Antifúngica
PR2	Tabaco PR-2	β -1-3-glucanasa
PR3	Tabaco P,Q	Quitinasa tipo I,II,IV,V,VI,VII
PR4	Tabaco 'R'	Quitinasa tipo I,II
PR5	Tabaco S	Parecida a Thaumatina
PR6	Jitomate Inhibidor 1	Inhibidor de proteinasa
PR7	Jitomate P69	Endoproteinasa
PR8	Pepino quitinasa	Quitinasa tipo III
PR9	Tabaco 'peroxidasa fromacion delignina '	Peroxidasa
PR10	Parsley 'PR1'	Parecido a Ribonucleasa
PR11	Tabaco 'clase V' quitinasa	Quitinasa, tipo I
PR12	Rabano Rs-AFP3	Defensina
PR13	Arabidopsis THI2.1	Tionina
PR14	Cebada LTP4	Proteína de transferencia de lipidos
PR15	Cebada OxOa	Oxalato oxidasa
PR16	Cebada OxOLP	Parecida a Oxalato oxidasa
PR17	Tabaco PRp27	Desconocida

Rutas de señalización del Ácido Salicílico y Acido Jasmónico

Las fitohormonas son moduladores importantes de la respuesta inmune de la planta (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007, Stotz *et al.*, 2011). En general, el ácido salicílico (SA) y la combinación del ácido jasmónico (JA) y etileno (ET) regulan las defensas antimicrobiales contra patógenos biotróficos y necrotróficos, respectivamente (Glazebrook, 2005). Esta es una visión simple del complejo repertorio de fitohormonas que probablemente juegan un rol en mediar las defensas inducibles, como ácido abscísico, auxinas, brasinoesteroides, citocininas y giberelinas (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Se menciona con varias

evidencias en plantas de distintas especies que puede estar evolucionariamente conservado la comunicación entre las rutas de señalización SA y JA, que resulta en un antagonismo recíproco entre las rutas de señalización de SA y JA (Glazebrook, 2005, Derksen *et al.*, 2013). En *Arabidopsis* SA es típicamente prioridad sobre JA (Leon-Reyes *et al.*, 2010b), sin embargo, las plantas usan ET para afinar el tono de la defensa para dar prioridad a la inducción de JA sobre SA en la respuesta a diversos ataques (Leon-Reyes *et al.*, 2010a; Thaler *et al.*, 2012).

Ácido Salicílico

El SA tiene un rol importante en muchas interacciones planta-patógeno por activación de la defensa y es típicamente involucrado en la respuesta de defensa contra biótrosos (Glazebrook, 2005; Spoel *et al.*, 2007; Derksen *et al.*, 2013). En la respuesta a hemibiotróficos, SA tiene un rol inicial en la infección durante la etapa biotrófica del patógeno (Halim *et al.*, 2007), con un ejemplo como la activación de la respuesta de hipersensibilidad, con muerte localizada de células que contienen o rodean al patógeno. SA también está ligado a la respuesta de defensa tal como la resistencia sistémica inducida (Derksen *et al.*, 2013). Se han reportado como genes marcadores de la actividad de SA a los genes relacionados con la patogénesis *PR1*, *PR2* y *PR5*, que son indicio de la respuesta de defensa mediada por SA (Van Loon *et al.*, 2006).

β -1-3-Glucanasa (*PR2*)

Las β -1-3-glucanasas son proteínas relacionadas con la patogénesis, que pertenecen a la familia PR2, y se consideran por jugar un rol en la respuesta de defensa de la planta infección de patógenos. Las β -1-3-glucanasas son hábiles para catalizar el corte de los enlaces β -1-3-glucosídicos presentes en los β -1-3-glucanos. Los β -1-3-glucanos son el mayor componente estructural de las paredes celulares de la mayoría de los hongos y oomicetos. En la planta existen β -1-3-glucanos llamada calosa, es el sustrato de las β -1-3-glucanasas, esta enzimas en la planta desarrolla diferentes funciones incluyendo la defensa de la planta (Cordero *et al.*, 1994). La función que tienen las β -1-3-glucanasas en la defensa es directa sobre la pared de los hongos y por inducir la formación de oligosacáridos elicitors, que elicitan la producción de PR, como las fitoalexinas. Tienen funciones

diversas en la planta como división y elongación celular, maduración de fruto, germinación de polen, fertilización, embriogénesis somática, germinación de semilla y formación de flor (Simmons, 1994).

Ácido Jasmónico

Las rutas de señalización de Ácido Jasmónico (JA) y Etileno (ET) tienen una función preponderante en la interacción planta patógeno. Estas hormonas generalmente actúan juntas en la defensa contra patógenos necrótrofos (Glazebrook, 2005; Derksen *et al.*, 2013). Los genes asociados con la ruta de JA y ET y son usados como marcadores para determinar el papel de estas rutas en la interacción planta patógeno, incluyen a genes como *PDF1.2 (PR12)*, *PR3*, *PR4* y *PR13 (THI2.1)* (Thoma *et al.*, 1998; Derksen *et al.*, 2013). En la respuesta de señalización de JA, se tiene una transcripción transitoria en pulsos como el resultado de la regulación negativa. Los represores JAZ y TOPLESS y los co-represores mantienen los genes de respuesta a JA en estado inactivo, por la supresión de la actividad del activador MYC2 (Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Pauwels *et al.*, 2010). Después de la acumulación y percepción de JA-Ile, la proteína F-box COI1, forma una ligasa SCF^{COI1}E3, su blanco son los represores JAZ para su degradación mediada por el proteosoma 26S. Por lo tanto la capacidad de activación de la transcripción de MYC2 es desreprimida, permitiendo la activación rápida de los genes de respuesta a JA. De manera interesante, entre los genes inducidos por MYC2 están los genes JAZ, creando una autolimitación (Chico *et al.*, 2008). Las proteínas DELLA también favorecen la expresión de los genes de respuesta a JA (Hou *et al.*, 2010).

Además de la señalización de JA, el ácido salicílico (SA) también se ha reportado por suprimir la señalización de auxinas. Auxinas también juegan un papel importante en la defensa de la planta. En la literatura se indica que algunos patógenos pueden producir moléculas parecidas a las auxinas para promover su virulencia (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Por ejemplo la aplicación de auxinas exógenas a plantas asegura la susceptibilidad a *Pseudomonas syringae*, mientras que las mutantes de señalización de auxinas aseguran la resistencia a ese patógeno (Chen *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). La promoción de la virulencia depende en parte de la supresión de la señalización de SA. Por el contrario SA es un potente supresor de muchos de los genes relacionados con auxinas (Wang *et al.*, 2007).

Muchos patógenos de planta han evolucionado para manipular y mimetizar las hormonas de la planta para promover virulencia. La manipulación de la homeostasis hormonal tiene un efecto impactante en la resistencia a la enfermedad llamado la atención y por tanto ha recibido mucho atención (Grant and Jones, 2009)

III. LITERATURA CITADA

AGI. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408:796-815.

Anthoine, G., J.P. Gauthier and D. Mugniéry. 2006. Aspects of the biology of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): 1 – Capacities of quiescence and diapause. *EPPO Bulletin* 36:359-364.

Boiteux L.S., M.E.N Fonseca and P.W. Simon. 1999. Host status and reaction of *Arabidopsis thaliana* ecotypes to infection by the northern root-knot nematode (*Meloidogyne hapla*). *Plant Breeding* 118:355-358

Bowles, D.J. 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 1990; 59:873-907

Brito, J.A., J.D. Stanley, R. Kuar, R. Cetintas, M. Di Vito, J.A. Thies., D.W. Dickson. 2007. Effect of the *Mi-1*, *N* and *Tabasco* genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* from florida on root-knot nematode resistant tomato and pepper. *J. Nematol.* 39:327:332.

Carlens, K, L. Sági, E.J.M. Van Damme, D. De Waele and R. Swennen. 2005. The use of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants to evaluate the nematocidal effect of lectins and lectin-related proteins upon migratory nematodes. *Int J Nematol* 15:1-8.

Chen, Z., J.L. Agnew, J.D. Cohen, P. He, L. Shan, J. Sheen and B.N. Kunkel. 2007. *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 20131–20136.

- Chico, J.M., A. Chini, S. Fonseca and R. Solano. 2008. JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 486–494.
- Chini, A., S. Fonseca, G. Fernández, B. Adie, J.M. Chico, O. Lorenzo, G. García-Casado, I. López-Vidriero, F.M. Lozano, M.R. Ponce, J.L. Micol and R. Solano. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448: 666–671.
- Cordero M.J., D. Raventos and B. San Segundo. 1994. Differential expression and induction of chitinases and β -1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7: 23-31.
- Decraemer W. and D.J. Hunt. 2006. Structure and Classification. In: *Plant Nematology*. Perry R.N. and M. Moens Eds. CABI, UK. Pp 3-32.
- Derksen, H., C. Rampitsch and F. Daayf. 2013. Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant Sci.* 207:79-87.
- Doucet M.E. y Di Rienzo J. A. 1991. El género *Nacobbus* Thorne & Allen, 1994 en Argentina. 3. Caracterización morfológica y morfométrica de poblaciones de *N. aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944. *Nematropica*, 21:19-35.
- EPPO. 2009. *Nacobbus aberrans sensu lato*. *EPPO Bulletin* 39:376–381.
- EPPO. 2011. *Meloidogyne entorolobii*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 41:329-339.
- Flavell R. 2003. In: Tuberosa R., Phillips R.L., Gale M. (eds.). Proceedings of international congress “In the Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution”, Bologna Italy, 365-378.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 43: 205–227.
- Grant, M.R., and Jones, J.D. (2009). Hormone (dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 324: 750–752.

- Halim, V.A., L. Eschen-Lippold, S. Altmann, M. Birschwilks, D. Scheel and S. Rosahl. 2007. Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*, *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 1346–1352.
- Hernández Anguiano, A.M., Zavaleta-Mejía, E. and Carrillo, G. 1992. Efecto de *Nacobbus aberrans* (Thorne y Allen, 1944) en la infección de *Phytophthora capsici* Leo. en Chile. *Rev. Mex. Fitopatol.* 10: 166–174.
- Holterman, M., G. Karssen, S. van den Elsen, H. Van Megen, J. Bakker and J. Helder. 2009. Small subunit rDNA-based phylogeny of the Tylenchida sheds light on relationships among some high-impact plant-parasitic nematodes and the evolution of plant feeding. *Phytopathology* 99: 227–235.
- Hou, X., L.Y.C. Lee, K. Xia., Y. Yan, and H. Yu. 2010. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev. Cell* 19: 884–894.
- Jones J., G. Gheysen and C. Fenoll. 2011. Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions. *ESF Springer.* 557p.
- Jones, J.T., A. Haegeman, E.G.J. Danchin, H.S. Gaur, J. Helder, M.G.K. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-Lopez, J.E. Palomares-Rius, W.M.L. Wesemael and R.N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 14:1-16.
- Jones, M.G.K. and H.L. Payne. 1977. The structure of syncytia induced by the phytoparasitic nematode *Nacobbus aberrans* in tomato roots, and the possible role of plasmodesmata in their nutrition. *J. Cell Sci.* 23:229–313.
- Kiewnick, S., M. Dessimoz, L. Franck. 2009. Effects of Mi-1 and the N root-knot nematode-resistance gene on the infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. *J Nematol.* 41:134-139.
- Koornneef, M. and D. Meinke. 2010. The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J.* 61:909-921.

- Leon-Reyes, A.Y., A. Koorneef, S. Proietti, A.P Köbes, J. Memelink, C.M. Pietersen and T. Ritsema. 2010a. Ethylene signaling renders the jasmonate response of *Arabidopsis* insensitive to future suppression by salicylic Acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23: 187–197.
- Leon-Reyes, A., D. Van der Does, E. S. Lange, C. Delker, C. Wasternack, S.C.M. Van Wees, T. Ritsema and C.M.J. Pietersen. 2010b. Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in *Arabidopsis* is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta* 232: 1423–1432.
- López-Martínez, N., Colinas-León, M.T., Peña-Valdivia, B.C., Salinas-Moreno, Y., Fuentes-Montiel, P., Biesaga, M. and Zavaleta-Mejía, E. 2011. Alterations in peroxidase activity and phenylpropanoid metabolism induced by *Nacobbus aberrans* Thorne and Allen, 1944 in chilli (*Capsicum annuum* L.) CM334 resistant to *Phytophthora capsici* Leo. *Plant Soil*, 338:399–409.
- Manzanilla-López, R.H. 2010. Speciation within *Nacobbus*: consilience or controversy? *Nematology*, 12: 321–334.
- Moens, M., R.N. Perry and J.L. Starr. . Meloidogyne species – a diverse group of novel and important plant parasites. In: *Root-knot Nematodes*. Perry R.N., M. Moens and J.L. Starr Eds. CABI, UK, pp 1-18.
- Nicol, J.M., S.J. Turner, D.L. Coyne, L.D. Nijs, S. Hockland and Z.T. Maafi. 2011. Current Nematode Threats to World Agriculture. In: *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Eds. Jones J, Gheysen G & Fenoll C, Springer pp 21–43.
- Pauwels, L. 2010. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* 464: 788–791.
- Penninckx, I.A.M.A., A. Thoma, J.P. Buchala, W.F. Metraux. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defending gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10:2103-2113.

- Robert-Seilaniantz, A., L. Navarro, R. Bari, R. and J.D.G. Jones. 2007. Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 372–379.
- Robert-Seilaniantz, A., M. Grant and J.D.G. Jones. 2011. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just JASMONATE-SALICYLATE antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49: 317–343.
- Sijmons, P.C., F.M.W. Grundler, N. Von Mende, P.R. Burrows, and U. Wyss. 1991. *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant parasitic nematodes. *Plant J.* 42:245-254.
- Singh S.K., M. Hodda and G.J. Ash. 2013. Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 43:334-374.
- Simmons, C.R. 1994. The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -D-glucanases and 1,3;1,4- β -D-glucanases. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 325-387.
- Somerville, C. and Koornneef, M. 2002. A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Rev. Genetics.* 3: 883-889.
- Souza, R.M. and J.G. Balwin. 2000. Differential behavior of the survival stages *Nacobbus aberrans* (Nemada:Pratylenchidae) under suboptimal-environments. *Nematology* 2:211-215.
- Stotz, H.F., Y. Jicumar, Y. Shimada, E. Sasaki, N. Stingl, M.J. Mueller and Y. Kamiya. 2011. Jasmonate-dependent and COI1-independent defense responses against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*: Auxin is part of COI1-independent defense signaling. *Plan Cell Phisiol.* 52:1941-56.
- Thaler, J.S. P.T. Humphrey and N.K. Whiteman. 2012. Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. *Trends in Plant Science.* 17:1860-1865.
- Thines, B., L. Katsir, M. Melotto, Y. Niu, A. Mandaokar, G. Liu, K. Nomura, S.Y. He, G.A. Howe and J. Browse. 2007. JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661–665.

- Thomma, B.P.H.J., K. Eggermont, I.A.M.A. Penninckx, B. Mauch-Mani, R. Volgelsang, B.P.A. Cammue and W.F. Broekaert. 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15107-11.
- Urwin, P.E., A. Levesley, M.J. McPherson and H.J. Atkinson. 2000. Transgenic resistance to the nematode *Rotylenchulus reniformis* conferred by *Arabidopsis thaliana* plants expressing proteinase inhibitors. *Mol Breeding* 6:257-264.
- Van Loon L.C., E.A. Van Strien. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55: 85-97
- Van Loon, L.C., M. Rep and C.M.J. Pietersen. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-162.
- Wang, D., K. Pajerowska-Mukhtar, A.H. Culler and X. Dong. 2007. Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr. Biol.* 17: 1784–1790.
- Wu, Y, T. Jenkins, G. Blunden, N. von Mende, S.D. Hankins. 1998. Suppression of fecundity of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, in monoxenic cultures of *Arabidopsis thaliana* treated with an alkaline extract of *Ascophyllum nodosum*. *J Appl Phycol* 10:91-94.

CAPITULO II. DESARROLLO DE *NACOBBUS ABERRANS* EN *ARABIDOPSIS THALIANA* Y *CAPSICUM ANNUM*.

I. RESUMEN

Nacobbus aberrans es un nemátodo fitopatógeno con hábitos parasíticos migratorio sedentario, causa pérdidas económicas importantes en cultivos como jitomate, papa, frijol y remolacha. Para su estudio se propuso el uso de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, que presenta características aceptables y se utilizó a Chile (*Capsicum annum* var. YoloWonder®) como variedad susceptible. En el presente estudio se utilizó sustratos Arena y peat moss, para evaluar el comportamiento del desarrollo del nemátodo. Las tendencias mostraron que el ingreso del nemátodo es favorecido por el sustrato solo en el periodo 7-21ddi. Se observaron diferencias estadísticas en la cantidad de nemátodo en raíz a los 30 y 65ddi en *A. thaliana*. Los estadios encontrados en los tiempos de la evaluación correspondieron a J2 (2ddi), J3 (7ddi), J4 (de los 14 a 65ddi). En la variedad susceptible los estadios encontrados fueron a J2 (2ddi), J3 (7ddi), J4 (de los 14 a 21ddi), hembras inmaduras (30ddi) y hembras maduras y machos (45ddi). La distribución en el tiempo de los estadios en Chile lo hace aceptable como fuente de inóculo para estudios con estadios J3, J4 y hembras inmaduras. Es posible el uso de *A. thaliana* como modelo para el estudio de la interacción con *N. aberrans* y se presenta la posibilidad para el estudio de la interacción con J3, J4 y hembras inmaduras.

II. INTRODUCCIÓN

Nacobbus aberrans (Thorne) Thorne y Allen es un nemátodo polífago, se reportan a 84 especies hospedantes de familias botánicas Amaranthaceae, Apiaceae, Asteraceae, Basellaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, chenoioidiaceae, Convulvulaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Labiatae, Malvaceae, Nyctaginaceae, Oxalidaceae, Plantaginaceae, Polygonaceae, Portulacaceae, Solanaceae, Tropaeolaceae and Zygophyllaceae (Manzanilla-López *et al.*, 2002; EPPO, 2009). En estas familias se encuentran cultivos hospedantes importantes como col, zanahoria, pepino, lechuga, Chile, chícharo, jitomate, papa, frijol, remolacha (Manzanilla-Lopez *et al.*, 2002; EPPO, 2009,

Singh *et al.*, 2013). Se reportan pérdidas ocasionadas en los cultivos atacados por *N. aberrans* en promedio de 36-65% en Latinoamérica, y un 10-20% en USA (Manzanilla-Lopez *et al.*, 2002). Los hábitos parasíticos de *N. aberrans* son complejos, es un nemátodo migratorio en su estadio de juveniles vermiformes y adultos inmaduros, que se mueven a través de la raíz y se alimentan de las células, causando cavidades y lesiones dentro de los tejidos de la raíz. Contrasta que la hembra madura es sedentaria e induce disolución parcial de las paredes celulares y la fusión del protoplasto de las células, para formar el sitio especializado de alimentación “sincitio” y agallas desarrolladas alrededor (Manzanilla-Lopez *et al.*, 2002, Jones *et al.*, 2013). *N. aberrans* está adaptado a un rango amplio de condiciones climáticas, su ciclo de vida es fuertemente influenciado por la temperatura. Se ha sugerido quiescencia y diapausa en juveniles no eclosionados y estadios J3 y J4, que sobreviven en el suelo, también se ha reportado la disminución de la actividad de las glándulas esofágicas (Sauza y Balwin, 1998).

N. aberrans se ha estudiado en diferentes hospedantes, por sus características especiales y su ciclo de vida que puede ser parecido al de nemátodos quiste con producción de agallas (Jones *et al.*, 2013), este nemátodo sedentario (Manzanilla-López *et al.*, 2002), resulta de importancia su estudio en una planta modelo. La presente investigación tuvo como objetivo conocer el comportamiento del ciclo de vida de *N. aberrans* en *A. thaliana*, como parte del estudio de la interacción planta-nemátodo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizó *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) de la colección de semillas del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Celaya. Las semillas se sembraron de manera directa, antes de la siembra siembra fue esterilizada superficialmente con Hipoclorito al 1.25% y lavado tres veces con agua destilada estéril, se secaron en campana de flujo laminar. Para la siembra se utilizó dos sustratos Arena pasada por la malla No. 20 y sustrato (peat moss Sunshine®). Se colocaron diez semillas por maceta, y se dejaron 5 plantas por maceta para tener distribuida la raíz en todo el sustrato al momento de la

inoculación. Para comparar el desarrollo del nemátodo se utilizó chile (*Capsicum annum* var. YoloWonder®) susceptible a *N. aberrans*, se sembró solo una semilla por maceta en los diferentes sustratos, cinco días antes que la siembra de *Arabidopsis*. Se tuvieron 50 macetas por tratamiento (*Arabidopsis* en peat moss, *Arabidopsis* en arena, Chile en peat moss y chile en arena). Las macetas se colocaron en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad con 23°C de temperatura y 70% de humedad relativa. El riego fue con agua de la llave estéril. Las plantas fueron inoculadas a los 25 días después de la siembra de *A. thaliana*. Se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento a los 1, 2, 7, 14, 21, 25, 30, 45 y 65 días después de la inoculación (ddi). Para los análisis de infección a raíz se utilizó tinción con fucsina ácida inmediatamente después de la colecta que consistió en eliminar restos del sustrato, tomando tres raíces por tratamiento. De cada muestra se extrajo nemátodos para revisión de estadios.

Inóculo de *N. aberrans*

El inóculo de *N. aberrans* se obtuvo del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, México, el que se mantiene en cultivo moaxénico en raíces de jitomate en el laboratorio de interacción planta patógeno. De manera similar los huevecillos fueron colectados de acuerdo con el método de tamizado (Hussey and Barker, 1973). La colecta de huevecillos se realizó previa al tiempo de inoculación. Los nemátodos J2 se colectaron después de la eclosión de huevecillos incubados en recipiente de Baerman a 25°C. Se inocularon 500 J2 por maceta.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente para una prueba de ANOVA ($P \leq 0.05$) y análisis de medias de Tukey con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo de *N. aberrans* en *A. thaliana*

El ingreso de los J2 en la raíz de *A. thaliana* inició a los 2ddi (Figura 4). Los nemátodos dentro de raíz en peat moss no superaron el 10%. El periodo de entre 7 y 30ddi al parecer es la etapa más activa del nemátodo. Los estadios encontrados durante este periodo fueron J3 al 7ddi y J4 de 14ddi hasta el final de la evaluación (Imagen 1). Cuando el sustrato fue Arena el inicio del ingreso de J2 fue a los 2ddi, con un porcentaje que no superó el 10%. La mayor cantidad de ingreso (40%) se observó a los 7, 14 y 21ddi. En ambos sustratos los estadios encontrados coincidieron 2ddi (J2), 7ddi (J3), 14-65ddi (J4) (Figura 5). No se observó hembras inmaduras. En este caso el hospedante es *A. thaliana*, y su ciclo corto pudo influir en el desarrollo del nemátodo, pues a partir de los 21 ddi las plantas florecieron. No se ha reportado para el caso de Nemátodos un ecotipo de *Arabidopsis* resistente, que sería lo adecuado para el estudio los mecanismos de la resistencia y susceptibilidad a nemátodos (Jones *et al.*, 2011). Por lo que el estudio de interacciones incompatibles a nemátodos es necesario desarrollarlas en especies cultivadas o en líneas mutantes de *Arabidopsis*.

La presencia del mayor número de nemátodos en raíz entre sustratos, pudo ser debido a la movilidad del nemátodo, tiene menor resistencia al acarreo en arena y además la raíz se concentra en la zona de la base en la maceta, esto facilita el acceso al nemátodo. Aunque estadísticamente solo se mostraron diferencias en los 30 y 65ddi.

El proceso de penetración de los raíces del hospedante por los nemátodos agalladores y quiste y también la migración a través de haces vasculares para establecer el sitio de alimentación, puede ser similar en interacciones compatibles e incompatibles (Cai *et al.*, 1997; Das *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2008). La respuesta de defensa contra el nemátodo, se puede iniciar al unirse a las células del hospedante e inyectar secreciones de sus glándulas esofágicas, se ha reportado que la respuesta de hipersensibilidad puede ocurrir tan rápido como a las 24h después de la inoculación (Jones *et al.*, 2011). En contraste la resistencia se puede manifestar después de que el sitio de alimentación se ha formado, o sin manifestación de necrosis impidiendo que el nemátodo alcance la madurez e incluso

favorecer la proliferación de machos (Dhandaydham *et al.*, 2008, citado por Jones *et al.*, 2011). En este caso no se puede definir con los datos obtenidos, si el ecotipo utilizado es resistente o susceptible, será necesario de nuevos estudios. Se reporta que la duración del ciclo de *N. aberrans* puede cambiar de acuerdo con el hospedante (Nickle, 1993). También se ha reportado que *N. aberrans* muda a J4 ante condiciones desfavorables (Souza and Balwin, 2000; Cristobal *et al.*, 2001, Martinez-Fuentez *et al.*, 2010).

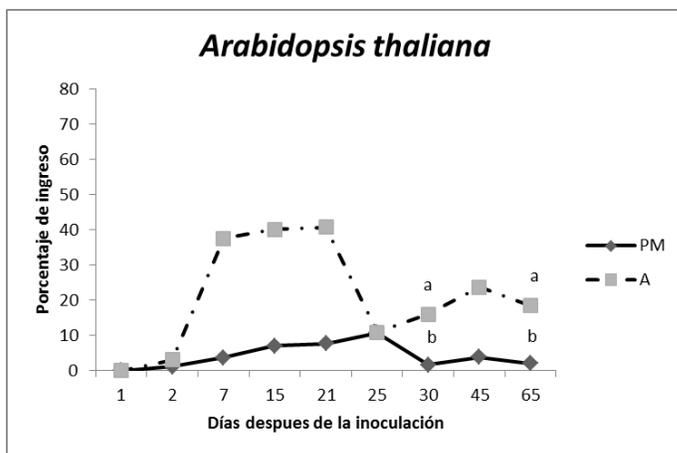


Figura 4. Desarrollo de *Nacobbus aberrans* en *Arabidopsis thaliana*. Se muestra el porcentaje de los nemátodos dentro de raíz a los diferentes días después de la inoculación (ddi) con *N. aberrans* (promedio de 3 repeticiones inoculadas con 500 J2). PM= Peat moss, A=Arena. Los datos son el promedio de las repeticiones evaluadas de cada tiempo. Las letras (a y b) muestran diferencias significativas de acuerdo a la prueba de medias Tukey para el mismo tiempo ($P \leq 0.05$).



Figura 5. Desarrollo de *Nacobbus aberrans* en *Arabidopsis thaliana*. Se muestra los nemátodos extraídos de raíz a los diferentes días después de la inoculación (ddi) con el nemátodo. Estadios J2 (2ddi), J3 (7ddi), J4 (14-65ddi).

Desarrollo de *N. aberrans* en Chile

La infección de *N. aberrans* en Chile (Yolo Wonder®), se observó dentro de raíz a partir del 1ddi (Figura 6). Cuando se utilizó peat moss el ingreso detectado superó el 20% a partir de los 7ddi y se mantuvo durante todo el periodo evaluado. Cuando el sustrato fue arena el ingreso de nemátodos a raíz superó el 20% a los 2ddi. El máximo de ingreso en raíz fue de los 7ddi (J3) a 21ddi (J4), durante este periodo el nemátodo reduce su actividad glandular y puede entrar en quiescencia y diapausa (Manzanilla-López *et al.*, 2002). A partir del 25-45ddi el ingreso fue de entre 10-30%, a los 30 días se observó hembras inmaduras (Figura 7). A los 45ddi se contabilizaron agallas desarrolladas, y los nemátodos obtenidos fueron hembras maduras y machos. Es de notar que en ambos sustratos hacia el final de la evaluación, los nemátodos contabilizados fueron estadísticamente iguales, además que la tendencia del gráfico muestra comportamiento similar. Solo se tuvieron diferencias

estadísticas al día 7ddi donde en el sustrato Arena se registró alrededor del 70% de ingreso. Aun y cuando las tendencias muestran diferencias en el periodo 7-21ddi por efecto del sustrato.

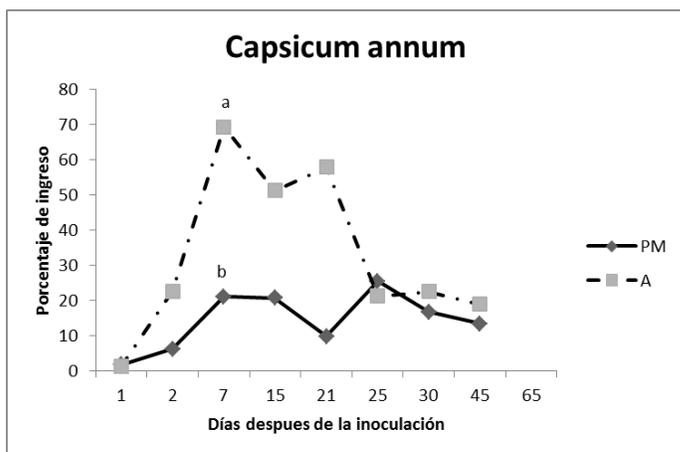


Figura 6. Desarrollo de *Nacobbus aberrans* en Chile (YoloWonder®). Se muestra el porcentaje de los nemátodos dentro de raíz a los diferentes días después de la inoculación (ddi) con *N. aberrans* (promedio de 3 repeticiones inoculadas con 500 J2). PM= Peat moss, A=Arena. Los datos son el promedio de las repeticiones evaluadas de cada tiempo. Las letras (a y b) muestran diferencias significativas de acuerdo a la prueba de medias Tukey para el mismo tiempo ($P \leq 0.05$).

El desarrollo de *N. aberrans* en *A. thaliana* es limitado, pero se puede evaluar utilizar para el estudio de interacción con los diferentes estadios. De los datos obtenidos se observó que la variedad de chile utilizada, puede servir para producir la fuente de inóculo. Se han caracterizado la ocurrencia de diferentes estadios y su comportamiento en esta variedad. Que puede ayudar a estudiar el efecto de los estadios (J3, J4, hembras inmaduras) al evaluarlas en la planta modelo. Pues el comportamiento y el efecto que causan en el hospedante los estadios J3 y J4 también necesita ser esclarecida (Souza and Balwin, 2000).

El desarrollo de *N. aberrans* es posible en *A. thaliana* ecotipo Columbia y es un modelo que se puede seguir utilizando en el estudio de la interacción planta-nemátodo



Figura 7. Desarrollo de *Nacobbus aberrans* en Chile (YoloWonder®). Se muestra los nemátodos extraídos de raíz a los diferentes días después de la inoculación (ddi) con el nemátodo. Estadios J2 (2ddi), J3 (7ddi), J4 (14-21ddi), hembra inmadura (30ddi), hembra madura y macho (45ddi).

V. LITERATURA CITADA

- Cai D, M. Kleine, S. Kifle, H-J. Harloff, N.N Sandal, K.A. Marcker, R.M. Klein-Lankhorst, E.M.J. Salentijn, W. Lange, W.J. Stiekema, U. Wyss, F.M.W. Grundler and C. Jung. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* 275:832–834.
- Cristóbal, A. J., I. Cid del Prado V., N. Marbán-Mendoza, G. P. Sánchez, G. Mora-Aguilera, and L. R. H. Manzanilla. 2001. Survival of life stages of *Nacobbus aberrans* under field conditions. *Nematropica*. 31:229-235.

- Dhandaydham M, L. Charles, H. Zhu, J.L. Starr, T. Huguet, D.R. Cook, J.M. Prosperi, C. Opperman. 2008. Characterization of root-knot nematode resistance in *Medicago truncatula*. *J Nematol* 40:46–54
- Das S, D.A. DeMason, J.D. Ehlers, T.J. Close and P.A. Roberts. 2008. Histological characterization of root-knot nematode resistance in cowpea and its relation to reactive oxygen species modulation. *J Exp Bot* 59:1305–1313.
- EPPO. 2009. *Nacobbus aberrans sensu lato*. *EPPO Bulletin* 39:376–381.
- Hussey, R.S. and K.R. Barker. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Dis. Rep.* 57:1025-1028.
- Jones J., G. Gheysen and C. Fenoll. 2011. Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions. *ESF Springer*. 557p.
- Jones, J.T., A. Haegeman, E.G.J. Danchin, H.S. Gaur, J. Helder, M.G.K. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-Lopez, J.E. Palomares-Rius, W.M.L. Wesemael and R.N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 14:1-16.
- Koornneef, A. and C.M.J. Pietersen. 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol.* 146:839-844.
- Manzanilla-Lopez, R.H., M.A. Costilla, M Doucet, J. Franco, R.N. Inserra, P.S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R.M. Souza and K. Evans. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne y Allen, 1944 (Nematoda:Pratylenchidae): Systematics, Distribution, Biology and Management. *Nematropica* 32:149-232.
- 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: 61-63.
- Nickle, W.R. 1993. *Manual of agricultural nematology*. USDA. Marcel Dekker, New York, 1096pags.
- Sijmons, P.C., F.M.W. Grundler, N. Von Mende, P.R. Burrows, and U. Wyss. 1991. *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant parasitic nematodes. *Plant J.* 42:245-254.
- Singh S.K., M. Hodda and G.J. Ash. 2013. Plant-parasitic nematodes of potential phytosanitary importance, their main hosts and reported yield losses. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 43:334-374.

Souza, R.M. and J.G. Balwin. 2000. Differential behavior of the survival stages *Nacobbus aberrans* (Nemada:Pratylenchidae) under suboptimal-environments. *Nematology* 2:211-215.

**CAPITULO III. EXPRESIÓN DE LOS GENES *COI1*, *PDF1.2* Y *BGL2* DE
ARABIDOPSIS THALIANA DURANTE LA INFECCIÓN DE *NACOBBUS*
ABERRANS Y *MELOIDOGYNE MAYAGUENSIS***

I. RESUMEN

Los nemátodos fitopatógenos *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne mayaguensis* son de interés económico por su agresividad y rango de hospederos. En este trabajo se usó *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia como modelo de estudio en la interacción con estos nemátodos. Para esto, se evaluó la respuesta sistémica inducida (ISR) en follaje, de genes relacionados con la ruta de señalización de Ácido Jasmónico (JA): *COI1* y *PDF1.2* (*PR12*) y el gen de la ruta del Ácido Salicílico: *BGL2* (*PR2*). Los experimentos fueron completamente al azar con inoculación de 100 J2. La evaluación fue a los 1, 2, 3 y 7 días después de la inoculación (ddi). Los niveles relativos de transcritos en roseta se determinaron mediante análisis de PCR en tiempo real (qRT-PCR). Los transcritos de *COI1* y *PDF1.2* se incrementaron al inicio de la interacción con ambos nemátodos, por activación mediada por JA. A 3 y 7 ddi se observó incremento de los transcritos de *PDF1.2* en respuesta independiente de *COI1*, esto sugiere la inducción de auxinas por ambos nemátodos. *N. aberrans* indujo la expresión de *BGL2* independiente de SA a los 7 ddi. Mientras que *M. mayaguensis* causó la represión *BGL2* de la respuesta dependiente de JA a los 3 y 7 ddi. La respuesta diferente de la planta en la expresión de *PDF1.2* y *BGL2*, posiblemente fue por los hábitos parasíticos de los nemátodos. La respuesta sistémica de la planta durante la infección de los nemátodos activa y reprime las rutas de señalización de JA y SA, respectivamente.

Palabras clave: Col-0, nemátodo falso agallador, *M. enterolobii*, ISR, SAR, PR12, PR2.

II. INTRODUCCIÓN

Los nematodos fitopatógenos ocasionan pérdidas económicas millonarias a nivel mundial (Sasser and Freckman, 1987, Jones *et al.*, 2013), dentro de estos se ha considerado de mayor importancia a los formadores de agallas y quiste (Jones *et al.*, 2013). Dentro de los formadores de agallas se tienen a *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944, y *Meloidogyne* spp. Estos nematodos por ser endoparásitos desarrollan un sitio de alimentación especializado llamado sincitio (*N. aberrans*) o células gigantes (*Meoidogyne* spp), que son células modificadas de fácil acceso para su alimentación (Williamson and Gleason, 2003). *N. aberrans* es un nemátodo parásito de importancia en cultivos como chile, papa, jitomate, frijol, remolacha con pérdidas que se estiman de 10-65% (Manzanilla-López *et al.*, 2002). *N. aberrans* es nativo de América, sin embargo, se ha reportado en Europa y Asia (Franklin, 1959). *N. aberrans* está adaptado a un amplio rango de condiciones ambientales (Manzanilla-Lopez *et al.*, 2002), por esto es complicado su manejo, con la idea de limitar su distribución en el año 2000 la Organización Europea y Mediterránea de Protección de Plantas (EPP0) lo sujeto a regulaciones cuarentenarias. Por el rango de hospedantes de *N. aberrans* se han designado razas (Boluarte and Jatala, 1993; Toledo *et al.*, 1993; Ortuño *et al.*, 1997), dado su origen la mayor afección de cultivos se tiene en América Latina y se ha limitado el uso de áreas considerables en producción de papa y cultivos para exportación (Manzanilla-Lopez *et al.*, 2002). Dada su importancia como patógeno se necesita conocer más de su comportamiento en su interacción con el hospedante, esto con la idea de lograr un manejo adecuado para reducir las pérdidas que ocasiona. Otro nemátodo agallador es *Meloidogyne mayaguensis* (= *M. enterolobii*) Rammah y Hirschmann (1988) importante por su agresividad y capacidad de reproducción

en cultivares de chile y jitomate con resistencia a nemátodos, evadiendo la resistencia conferida por los genes *Mi-1* de jitomate y *N* de cultivar de chile y cultivares con genes *Tabasco* (Brito *et al.*, 2007, Kiewinick *et al.*, 2009). Aunque *M. mayaguensis* no está reportado como nemátodo cuarentenario, es considerado ahora el nemátodo agallador más patogénico conocido, por su potencial para ser una plaga cuarentenaria se colocó en la lista de alertas de la EPP0 (Kiewinick *et al.*, 2009).

Por otro lado, la respuesta basal e inducible en la planta por la infección de patógenos, es activada de manera local y sistémica (Durrant and Dong, 2004), lo que provoca la producción de metabolitos secundarios (fitoalexinas y fitoanticipinas), la producción de polímeros para la pared celular, la deposición de calosa y producción de proteínas con actividad antimicrobial (Slusarenko *et al.*, 2000; Van Loon *et al.*, 2006). Por otro lado, la capacidad para infectar del patógeno depende de sus secreciones que disparan en la planta el reconocimiento local y la señalización por compuestos que se difunden sistemáticamente a través de los tejidos de la planta desde el sitio de infección (Durrant and Dong, 2004). La planta responde al ataque de patógenos con diversos mecanismos desde la resistencia basal y la activación de genes relacionados con la patogénesis que codifican para las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Van Loon *et al.*, 2006). La mayoría de las PR tienen actividad antimicrobial por hidrólisis de pared celular, toxicidad al contacto y pueden involucrarse en señalización; otras PR son reguladas por el desarrollo y expresadas solo en tejidos específicos o activadas en respuesta a estrés abiótico. La resistencia o susceptibilidad a patógenos involucra las fitohormonas Ácido Jasmónico (JA) y Salicílico (SA) (Dong, 1998; Thoma *et al.*, 1998). El SA y el JA desencadenan la respuesta de defensa contra diferentes patógenos, la señalización dependiente de SA es crucial para la resistencia a patógenos biotróficos (Delaney, 1994) y en *A. thaliana* activa los genes *PR1*, *PR2* y *PR5*

(Thomma *et al.*, 1998); en contraste la resistencia dependiente de JA parece ser efectiva contra patógenos necrotróficos (Staswick *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998) y activa la expresión en *A. thaliana* de genes *PR3*, *PR4* y *PR12* (*PDF1.2* o defensina) (Thomma *et al.*, 1998).

Arabidopsis thaliana es una planta arvense dicotiledónea distribuida en diferentes partes del mundo, pertenece a la familia Brassicaceae. Por su tamaño pequeño, alto nivel de autofecundación y ciclo de vida corto de seis semanas, hace a esta planta fácil de trabajar en condiciones de laboratorio. Otra característica aceptable de esta planta modelo es toda la variación natural presente en diferentes ecotipos, fue la primer planta secuenciada (AGI, 2000; Somerville and Koornneef, 2002). Además de la gran cantidad de líneas mutantes generadas para genes diversos. *A. thaliana* es una planta modelo utilizado para el estudio de interacción planta-patógeno, incluyendo nemátodos (Sijmons *et al.*, 1991). Considerando las bondades de esta planta modelo, el objetivo de la presente investigación fue para tratar de entender el comportamiento de los genes *COII* (Coronatine Insensitive 1) y *PDF1.2* dependientes de la ruta de señalización de JA y el gen *BGL2* (*PR2*) de la ruta de señalización de SA, evaluado en el follaje como respuesta sistémica inducida en la infección con los nemátodos fitopatógenos *N. aberrans* y *M. mayaguensis*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y manejo

El ecotipo usado para el trabajo de interacción fue *A. thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) de la colección de semillas del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Celaya, el cual se utiliza como fondo genético para diversos estudios y generación de líneas mutantes y transgénicas. Las semillas se sembraron en caja Petri con medio Murashige-

Skoog (MS) en condiciones asépticas. Las semillas antes de la siembra fue esterilizada superficialmente con Hipoclorito al 1.25% y lavado tres veces con agua destilada estéril, se secaron en campana de flujo laminar antes de colocarlas en medio MS. Después se incubaron por 3 días en oscuridad a 4°C, para asegurar una germinación uniforme. Pasado ese tiempo se colocaron en cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad con 23°C de temperatura y 70% de humedad relativa. Cuando se desarrolló las hojas cotiledonares y raíz, las plántulas se trasplantaron a maceta de plástico del número 0 con sustrato húmedo (peat moss Sunshine®). Se colocaron dos plantas por maceta para tener distribuida la raíz en todo el sustrato al momento de la inoculación. El riego fue con agua de la llave estéril. Las plantas fueron inoculadas a los 20 días después de la siembra. Para los análisis se emplearon hojas de la roseta a los 1, 2, 3 y 7 días después de la inoculación con el nemátodo, tomando tres repeticiones por tratamiento y tres del testigo sin inocular. El material se guardó en refrigeración a -70°C hasta su posterior uso, se realizaron dos experimentos.

Inóculo de nemátodos fitopatógenos

El inóculo de *N. aberrans* utilizado fue obtenido del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, México, el que se mantiene en cultivo moaxénico en raíces de jitomate en el laboratorio de interacción planta patógeno. El inóculo de *M. mayaguensis* fue colectado de cultivo de chile también mantenido en el mismo laboratorio. De manera similar los huevecillos de ambos nemátodos fueron colectados de acuerdo con el método de tamizado (Hussey and Barker, 1973). La colecta de huevecillos se realizó previa al tiempo de inoculación. Los nemátodos J2 se colectaron después de la eclosión de huevecillos

colocados en un recipiente de Baerman e incubados a 25°C. Se inocularon 100 J2 por maceta (Sijmons *et al.*, 1991).

Extracción de RNA y obtención de cDNA

El tejido colectado de roseta fue procesado para la extracción de RNA de acuerdo con el método de Logemann *et al.*, (1987), y después tratado con DNAasa con el kit de Promega (RQ1 RNase-free DNase) de acuerdo con el protocolo. Para eliminar posible contaminación el RNA se limpió con el kit de RNA de Qiagen RNAesy®. Para obtener DNA complementario (cDNA) se utilizó el kit M-MLV Reverse Transcriptase de Promega® y Oligo dT Fermentas®, de acuerdo con el protocolo suministrado por el fabricante. El cDNA obtenido de cada muestra se ajustó a 200 ng*µL-1.

PCR en tiempo Real (qRT-PCR)

La concentración relativa de los transcritos de los genes seleccionados, se determinó por qRT-PCR un equipo de PCR en tiempo real ABI7500 (Applied Biosystems), analizando tres repeticiones por muestra. Las condiciones de amplificación fueron con la mezcla de reacción de PCR de 1.75 µL de buffer 10X, 0.8 µL de MgCl₂ (30 mM), 1 µL de cada iniciador (10 mM), 1 µL de dNTP mix (10mM), 1 µL de SYBR® Green 1:150,000 (Molecular Probe, Eugene, OR), 1 µL de Fluoresceína (1 µM), 0.25 µL de Taq (Amplicasa Biogénica®), 4 µL de cDNA y aforado a un volumen de 25 µL con agua libre de RNAsas y DNAsas. Las condiciones de amplificación fueron de una desnaturalización inicial de 95°C/2 min, con 30 ciclos a 95°C/15 s, 60°C/35s y 72°C/35 s, con una disociación final para descartar la formación de dímeros. Los iniciadores utilizados fueron *COII* (225bp) sentido: 5´CGG TGC ACT TCC GAC GGA TGA3´ y antisentido: 5´TGC TGA GCA AGC

TCA TGA AGCCA3', *PR12* (*PDF1.2*, 293 bp) sentido: 5'ACG CAC CGG CAA TGG TGG AAG CAC3' y antisentido: 5'CGG GAA AAT AAA CAT TAA AACAG3', *PR2* (*BGL2*, 355bp) sentido: 5'TCA GAG CTA CAG AGA TGG TGT CAG3' y antisentido: 5'AAC AGT GGA CTG GGC GGT GAA CAG3' (Feng *et al.*, 2003). Para normalizar los datos el gen constitutivo *Actina2* con los iniciadores sentido: 5'CAG AGC GGG AAA TTG TAA GAG3' y antisentido: 5'CCT TTC AGG TGG TGC AAC GAC3' (Kim *et al.*, 2005). Para calcular los cambios relativos en la expresión de los genes de interés, los datos fueron analizados con el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak and Schmittgen, 2001), donde se normaliza los resultados comparando con un testigo sin tratamiento.

Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados estadísticamente para una prueba de ANOVA ($P \leq 0.05$) con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido de transcritos de los genes *COII*, *PDF1.2* y *BGL2* (*PR2*), en las muestra fueron analizados en PCR tiempo real, estos datos fueron normalizados y se compararon contra un testigo no inoculado, a los 1, 2, 3 y 7 días después de la inoculación (ddi) con el nemátodo J2.

Respuesta *A. thaliana* a la infección de *N. aberrans*

Los análisis de la expresión por qRT-PCR, mostraron cambios en la cantidad de transcritos (RNAm) en la roseta de *Arabidopsis thaliana*. En el caso de *COII* solo se observaron diferencias en los 1 y 3 (ddi) con el nemátodo, los 2 y 7 ddi no presentaron diferencias con

el testigo no inoculado (Figura 8). En el día 1 ddi se observó incremento de la expresión de 3.4 veces con respecto del testigo. Por el contrario a los 3 ddi se nota una disminución de 0.3 veces de la expresión de *COII*. Los datos sugieren un activación de la ruta de señalización del JA a inicio de la infección, que se regula a los 2 ddi y es reprimida a los 3 ddi, con una normalización de la expresión a los 7 ddi. Este comportamiento de la expresión sugiere la activación a 1 ddi de la ruta de señalización de JA dependiente del gen *COII*, por la activación de la respuesta de defensa a los daños ocasionados por el ingreso del nemátodo (Feng *et al.*, 2003).

La expresión del gen *PDF1.2* a 1, 2, 3 y 7 ddi aumentó con respecto del testigo no inoculado (Figura 8). Es de notar que a 1 ddi el nivel de expresión de 5.3 fue mayor que el testigo, con disminución de la expresión a los 2 (1.4) y 3 (1.5) ddi con valor similar al del testigo no inoculado, al 7 ddi de nuevo incremento la expresión aunque sin superar el nivel a 1 ddi. El nivel de expresión inicial alto de *PDF1.2* es coincidente con la expresión de *COII*, que sugiere la activación de la ruta de señalización de JA, pues *PDF1.2* es un gen marcador de la activación de la respuesta de defensa de la planta dependiente de JA. La expresión de *PDF1.2* se mantiene activa ligeramente después de la infección del *N. aberrans*, superando a la del testigo no inoculado. La expresión de *PDF1.2* a los 3 ddi supera al testigo no inoculado, que comparado con el valor de *COII* es menor al del testigo. La expresión de *PDF1.2* se ha reportado con bajos niveles de proteína *COII* en la célula. De manera similar para el incremento de la expresión de *PDF1.2* a los 7 ddi, además del efecto de *COII*, el cambio pudo ser debido a que el nemátodo incrementa su agresividad y movilidad. A los 7 ddi *N. aberrans* se encuentra en estadio J3, y se tiene mayor cantidad de nemátodos en raíz, y el nivel de *PDF1.2* pudo ser activado por nuevos daños y secreciones del nemátodo. No se tienen reportes del efecto que pudiera tener las secreciones del

nemátodo durante la muda en el cambio de expresión del hospedero. Se reporta la producción de diversas sustancias que modifican pared celular, con la finalidad de acceder de manera fácil al alimento y crear un sitio de demanda, que pueda soportar el desarrollo del nemátodo (Hofmann *et al.*, 2010). La respuesta inicial de la ruta de JA pudo ser debida a la activación por el daño causado por el nemátodo durante el ingreso y movimiento a la raíz, pues la ruta de señalización es activada con daño mecánico y en respuesta a patógenos necrotróficos (Derksen *et al.*, 2008). La expresión inicial de *PDF1.2* fue activada dependiente de COI1, y la expresión a los 7 ddi al parecer es una expresión independiente de COI1. Se ha reportado la activación de la respuesta de defensa dependiente de JA independiente de COI1, cuando se usaron mutantes, donde la las auxinas se acumulan provocando disminución de Jamonato-isoleucina (Stotz *et al.*, 2011). Además se ha reportado la importancia de las auxinas en la defensa a patógenos (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). En el caso de los nematodos se ha reportado la manipulación de la ruta de señalización de auxinas, con la finalidad de establecerse en su hospedero (Haegeman *et al.*, 2012).

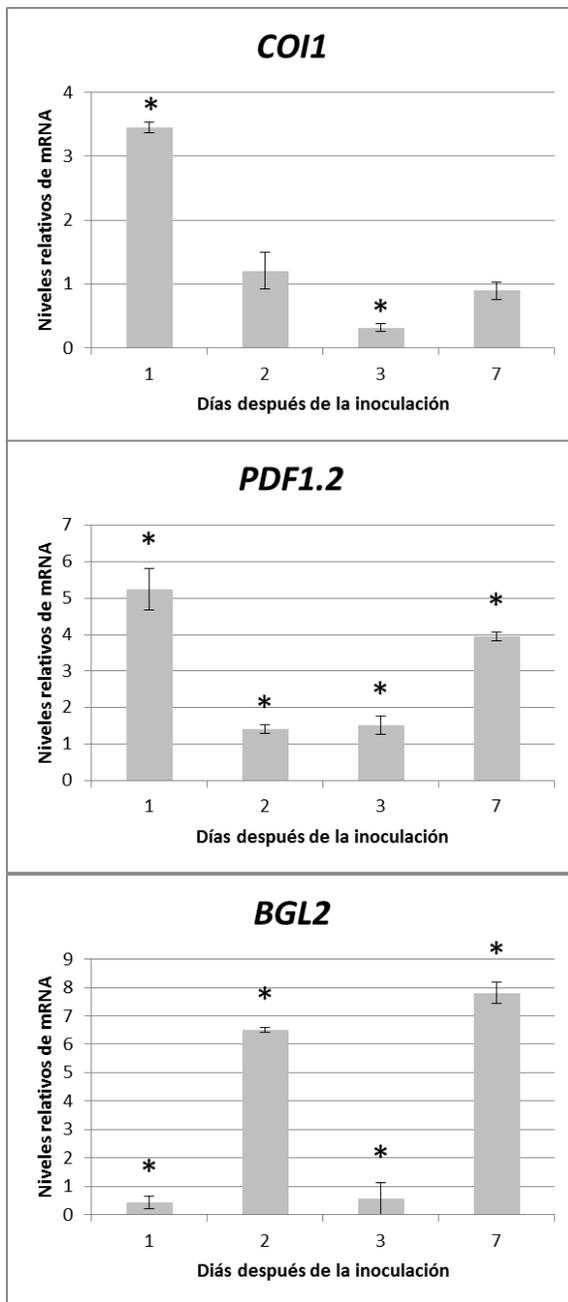


Figura 8. Comportamiento de la expresión de

los genes *COI1*, *PDF1.2* y *PR2* analizados por qRT-PCR, a los 1, 2, 3 y 7 días después de la inoculación con el *Nacobbus aberrans*. Los datos muestran las veces de cambio de la expresión con respecto de un testigo no inoculado, las barras representan el promedio de tres repeticiones, con la línea que representa la desviación estándar. El asterisco (*) indica que el promedio de los datos son diferentes de 1.0 ($P \leq 0.05$) del testigo.

La expresión de *BGL2* en roseta de *A. thaliana* en respuesta a *N. aberrans*, se muestran diferencias en los niveles de expresión en respuesta al nemátodo en comparación con el testigo no inoculado, en todos los tiempos evaluados (Figura 8). Al tiempo 1 y 3 ddi los niveles relativos de transcritos fueron menores que los del testigo no inoculado. Esta disminución pudo deberse al antagonismo de la ruta de señalización de SA con respecto a la de JA, pues *BGL2* es un gene marcador de la ruta de SA. La disminución a 3 ddi puede ser debido a la respuesta de la planta por evitar la dispersión del patógeno, pues *BGL2* participa en eliminar las deposiciones de calosa (polímero β -1, 3-Glucano) en plasmodesmos que pudieran limitar el flujo de metabolitos vía simplasto (Lee and Lu, 2010). Por otro lado, a los 2 (6.5) ddi el nivel de transcritos en roseta se incrementó, comparados con los de *COII* que regresaron a un estado basal mientras que *PDF1.2* presentó un ligero incremento de transcritos. El incremento de *BGL2* a 2 ddi puede deberse a la respuesta de defensa dependiente de SA, inducida por las secreciones producidas por el nemátodo asociadas con el establecimiento y mantenimiento del sitio de alimentación y evitar o modular la deposición de calosa (Haegeman *et al.*, 2012). Al tiempo 7 (7.8) ddi se incrementó los transcritos de *BGL2*, esto sugiere una activación de la ruta de JA debido a que los transcritos de *PDF1.2* también se elevaron en este tiempo, y se ha reportado la expresión de *BGL2* independiente de SA en respuesta a nemátodos (Wubben *et al.*, 2008). *BGL2* es necesaria para crear una demanda metabólica y asegurar la dilución parcial de la pared celular para acceder a nutrimentos en la planta (Goverse *et al.*, 2000).

Respuesta *A. thaliana* a la infección de *M. mayaguensis*

En la interacción de *A. thaliana* con *M. mayaguensis*, datos de los transcritos de los genes analizados por qRT-PCR también mostraron diferencias en los tiempos 1, 2, 3 y 7 ddi (Figura 9). Los niveles de transcritos del gen *COII* fueron diferentes durante los tiempos evaluados. En el 1 (5.6) ddi con respecto del testigo no inoculado se incrementó el nivel de transcritos, esto sugiere la activación de la respuesta de defensa dependiente de JA (Penninckx *et al.*, 2009). Los tiempos 2, 3 y 7 ddi mostraron disminución de los transcritos con respecto del testigo no inoculado. Estos datos muestran que se induce la respuesta dependiente de JA al inicio de la infección, la disminución de la expresión de *COII* en los días 2, 3 y 7 ddi puede ser debida a la autoregulación de la ruta de señalización de JA (Derksen *et al.*, 2013).

Para el gen *PDF1.2* los transcritos se incrementaron a 1 ddi (2.6), lo que coincide con el comportamiento de *COII*, que es necesario para en la señalización de JA (Figura 9). En el día 2 ddi (0.3) los niveles de transcritos de *PDF1.2* disminuyó por debajo del valor del testigo sin inoculación, un comportamiento similar al de *COII*. A los 3 (6.5) y 7 (2.0) ddi el nivel de transcritos de *PDF1.2* se incrementó, a estos tiempos de observación el comportamiento de expresión fue diferente al de *COII*. Al parecer el incremento de la expresión de *COII* en el tiempo 3 ddi no fue necesario para la sobreexpresión de *PDF1.2* o que las cantidades presentes de *COII* sean suficientes para la expresión de *PDF1.2* y posiblemente el nemátodo indujo la expresión de esta defensina por las secreciones producidas (Goverse *et al.*, 2000). Al considerar solo la expresión de *PDF1.2*, se tiene una posible represión de la ruta de señalización de JA a los 2 ddi a causa de *M. mayaguensis*, y se mantiene activa durante los 1, 3 y 7 ddi. La activación de *PDF1.2* a los 3 ddi pudo ser ocasionada por la estimulación por el nemátodo a la formación del sitio de alimentación. Se

ha reportado la estimulación de la necrosis a los 24 horas después de la inoculación en hospedero incompatible, con activación de la resistencia dependiente de SA (Canto-Saenz y Brodie, 1987; Yu, 1995), y la evidencia de la formación del sitio de alimentación a los 2-7 ddi (Yu, 1995).

Los niveles de transcritos del gen *BGL2* fueron diferentes con respecto del testigo no inoculado en los tiempos 1, 2 y 3 ddi y el nivel de transcritos a los 7 ddi fue similar al del testigo no inoculado (Figura 9). Los niveles de transcritos se incrementaron a 1 ddi y con acumulación mayor a los 2 ddi, esta acumulación al contrastarla con los resultados de *COII* y *PDF1.2* se observa una respuesta de defensa dependiente de SA a los 2 ddi, por el incremento de *BGL2*, por la posible represión de JA ocurrida por la disminución de los niveles de transcritos de *COII* y *PDF1.2*. Después a los 3 ddi y 7 ddi con *M. mayaguensis* se reprimió la respuesta de defensa dependiente de SA, por la disminución del nivel de transcritos de *BGL2* y por el incremento que muestra el nivel de transcritos de *PDF1.2*. La posible represión de SA es probable fuera a causa de la inducción del sitio de alimentación por *M. mayaguensis*, pues los J2 necesitan asegurar la formación del sitio de alimentación antes de que sus reservas se terminen, para lograr la infección y establecimiento en su hospedero (Haegeman *et al.*, 2012).

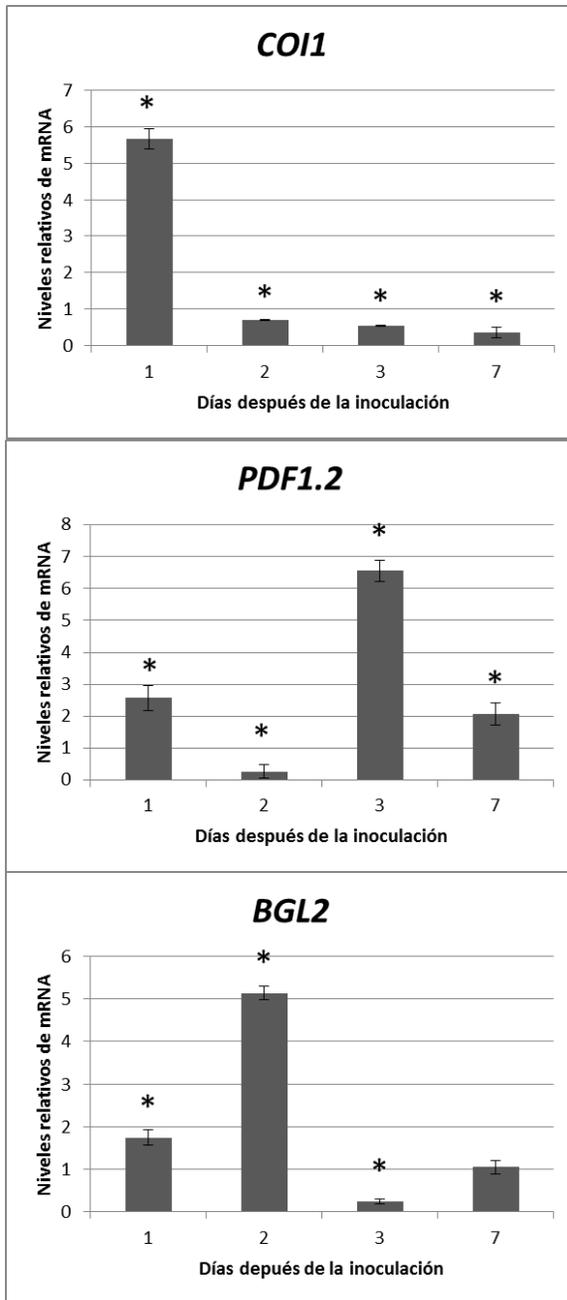


Figura 9. Comportamiento de la expresión de

los genes COI1, PDF1.2 y PR2 analizados por qRT-PCR, a los 1, 2, 3 y 7 días después de la inoculación con el *Melodogyne mayaguensis*. Los datos muestran las veces de cambio de la expresión con respecto de un testigo no inoculado, las barras representan el promedio de tres repeticiones, con la línea que representa la desviación estándar. El asterisco (*) indica que el promedio de los datos son diferentes de 1.0 ($P \leq 0.05$) del testigo.

Los cambios observados en los niveles de transcritos inducidos por los nemátodos *N. aberrans* y *M. mayaguensis*, de acuerdo con los datos analizados. Los datos de los gráficos muestran activación inicial de la respuesta de señalización dependiente de JA, esta característica puede permitir al nemátodo no activar la respuesta de defensa dependiente de SA, por el antagonismo de las rutas. Pues la respuesta de defensa en interacción incompatible con nemátodos se ha reportado dependiente de SA (Wubben *et al.*, 2008), que activa la respuesta hipersensitiva, antes de la inducción del sitio de alimentación o cuando el nemátodo inicia la inducción entre las 24 a 48 horas después de la penetración (Williamson and Hussey, 1996). Se ha reportado que depende de *COII* la expresión de *PDF1.2*. Los datos muestran disminución de la expresión de *COII* al mayor tiempo de la evaluación cuando la defensina se incrementó, esto sugiere que *COII* se mantiene activa por un tiempo prolongado, después del daño e infección del patógeno. El incremento de *PDF1.2* al inicio de la expresión muestra la activación de la ruta de señalización de JA, con una represión posterior y la nueva activación en los tiempos finales de evaluación. Durante estos cambios en la respuesta sistémica de la planta, se favorece la infección por otros patógenos y plagas (Koornneef and Pietersen, 2007; Zarate *et al.*, 2007). La respuesta observada con *BGL2* con *N. aberrans* observó una activación de la respuesta de señalización de SA y una posterior represión, para al final tener una activación donde se expresa a la vez que *PDF1.2*, esto sugiere la expresión de la β -Glucanasa independiente de SA. Para el caso de *M. mayaguensis* solo se observó expresión de *BGL2* dependiente de SA, por la represión de *PDF1.2* a los 2 ddi y la posterior represión y normalización de su expresión en los tiempos finales de la evaluación.

Las diferencias encontradas en la expresión provocada en *A. thaliana*, por los nemátodos, se debe a que *M. mayaguensis* es un parasito sedentario, que ingresa y solo migra para buscar su sitio donde pasara todo su ciclo de vida (en el caso de las hembras). *N. aberrans* es un endoparásito migratorio (Manzanilla-Lopez *et al.*, 2002) que puede ingresar y salir de la raíz de su hospedero, en el tiempo de evaluación que solo fue hasta su estadio J3.

Los nemátodos evaluados afectaron la respuesta sistémica de la planta y puede ser detectada a través de las proteínas relacionadas con la patogénesis. Los nemátodos afectan de manera diferencial la respuesta de la planta, coinciden en activar la respuesta inicial dependiente de JA a través de los genes *COII* y *PDF1.2*, así como la ISR. Además de activar la respuesta dependiente de SA por la expresión el gen *BGL2*. Los datos muestran una respuesta de defensa inicial de *A. thaliana* dependiente de *COI1*, además de la respuesta de defensa independiente de *COI1* en la interacción con ambos nemátodos al final de la evaluación.

V. LITERATURA CITADA

AGI. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.

Nature 408:796-815.

Boluarte, T. and P. Jatala. 1993. Revision of the international race classification schema for identification of physiological races of *Nacobbus aberrans*. Nematropica 23:110.

Brito, J.A., J.D. Stanley, R. Kuar, R. Cetintas, M. Di Vito, J.A. Thies., D.W. Dickson.

2007. Effect of the *Mi-1*, *N* and *Tabasco* genes on infection and reproduction of *Meloidogyne mayaguensis* from florida on root-knot nematode resistant tomato and pepper. J. Nematol. 39:327:332.

- Canto-Saenz, M. and B.B. Brodie. 1987. Comparison of compatible and incompatible response of potato to *Meloidogyne incognita*. J. Nematol. 19:218-221.
- Delaney, T.P., S. Uknes, B. Vernooij, L. Friedrich, K. Weymann, D. Negrotto, T. Gaffney, M. Gut-Rella, H. Kessmann, E. Ward and J. Ryals. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. Science 266:1247-1250.
- Derksen, H., C. Rampitsch and F. Daayf. 2013. Signaling cross-talk in plant disease resistance. Plant Sci. 207:79-87.
- Dong, X. 1998. SA, JA, ethylene and disease resistance in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 1:316-323.
- Durrant, W.E. and X. Dong. 2004. Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 42:185-209.
- Feng, S., L. Ma, X. Wang, D. Xie, S.P. Dinesh-Kumar, N. Wei and X.W. Deng. 2003. The COP9 signalosome interacts physically with SCF^{COII} and modules Jasmonate response. The Plant Cell 15:1083-1094.
- Franklin, M.T. 1959. *Nacobbus serendipiticus* n. sp., a root-galling nematode from tomatoes in England. Nematologica 4:286-293.
- Goverse, A., J.A. Engler, J. Verhees, van der Krol, J. Helder and G. Gheysen. 2000. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. Plant Mol. Biol. 43:747-761.
- Haegeman, A., S. Mantelin, J.T. Jones and G. Gheysen. 2012. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. Gene. 492:19-31.
- Hamamouch, N., C. Li, P.J. Seo, C.M. Park and E.L. Davis. Expression of Arabidopsis pathogenesis-related genes during nematode infection. Mol. Plant Pathol. 12:355-364

- Hussey, R.S. and K.R. Barker. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Dis. Rep.* 57:1025-1028.
- Jones, J.T., A. Haegeman, E.G.J. Danchin, H.S. Gaur, J. Helder, M.G.K. Jones, T. Kikuchi, R. Manzanilla-Lopez, J.E. Palomares-Rius, W.M.L. Wesemael and R.N. Perry. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 14:1-16.
- Jones, M.G.K. 1981. The development and function of plant cells modified by endoparasitic nematodes. In: *Plant Parasitic Nematodes, Vol.III* (Zukerman, B.M. and R.A. Rohde, eds), pp 255-280. New York: Academic Press.
- Kiewnick, S., M. Dessimoz, L. Franck. 2009. Effects of Mi-1 and the N root-knot nematode-resistance gene on the infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars. *J Nematol.* 41:134:139.
- Kim, Y.O., J.S. Kim and H. Kang. 2005. Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. J.* 42:890-900.
- Koornneef, A. and C.M.J. Pietersen. 2008. Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol.* 146:839-844.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25:402-408.
- Logemann, J., J. Shell, and L. Willmitzer. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plants tissues. *Anal. Biochem.* 163:16-20.
- Manzanilla-Lopez, R.H., M.A. Costilla, M Doucet, J. Franco, R.N. Inserra, P.S. Lehman, I. Cid del Prado-Vera, R.M. Souza and K. Evans. 2002. The genus *Nacobbus* Thorne

- y Allen, 1944 (Nematoda:Pratylenchidae): Systematics, Distribution, Biology and Management. *Nematropica* 32:149-232.
- Ortuño, N., R. Oros, J. Franco y J. Main. 1997. Razas de *Nacobbus aberrans* que atacan al cultivo de papa en Bolivia. *Nematropica* 27:118.
- Penninckx, I.A.M.A., A. Thoma, J.P.Buchala, W.F. Mettraux. 1998. Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defending gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10:2103-2113.
- Robert-Seilaniantz, A., L. Navarro, R. Bari and J.D.G. Jones. 2007. Pathological hormone imbalances. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:372-379.
- SAS Institute. 1999. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA. 1028p.
- Sasser, J.N. and D.W. Freckman. 1987. A world perspective on nematology: The role of society. In: *Vistas on Nematology*. J.A. Veech and D.W. Dickson, eds. 7-14 pp. Society of Nematology, Marceline, MO, USA.
- Sijmons, P.C., F.M.W. Grundler, N. Von Mende, P.R. Burrows, and U. Wyss. 1991. *Arabidopsis thaliana* as a new model host for plant parasitic nematodes. *Plant J.* 42:245-254.
- Slusarenko, A.J., R.S.S. Fraser and L.C. van Loon. 2000. Mechanisms of resistance to plant diseases. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.
- Somerville, C. and M. Koornneef. 2002. A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat. Rev. Gen.* 3: 883-889.
- Staswick, P.E., G.Y. Yuen and C.C. Lehman. 1998. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.* 57:771-784.

- Stotz, H.F., Y. Jicumaru, Y. Shimada, E. Sasaki, N. Stingl, M.J. Mueller and Y. Kamiya. 2011. Jasmonate-dependent and COI1-independent defense responses against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*: Auxin is part of COI1-independent defense signaling. *Plant Cell Physiol.* 52:1941-56.
- Thomma, B.P.H.J., K. Eggermont, I.A.M.A. Penninckx, B. Mauch-Mani, R. Volgelsang, B.P.A. Cammue and W.F. Broekaert. 1998. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15107-11.
- Toledo, R.J.C., C. Sosa-Moss and E. Zavaleta-Mejía. 1993. Gama de hospederos de cinco poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 23:105-108.
- Yu, M.H. 1995. Root-knot nematode development and root gall formation in sugarbeet. *J. Sugar Beet Res.* 32:47-58.
- Van Loon, L.C., M. Rep and C.M.J. Pietersen. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44:135-162.
- Vijayan, P., J. Shockey, C.A. Levesque, R.J. Cook and J. Browse. 1998. A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7209-7214.
- Williamson, V.A. and C. A. Gleason. 2003. Plant nematode interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:327-333.
- Williamson, V.M. and R. S. Hussey. 1996. Nematode Pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell* 8:1735-1745.
- Wubben, MJE, J. Jim and T.J. Baum. 2008. Cyst nematode parasitism of *Arabidopsis thaliana* is inhibited by salicylic acid (SA) and elicits uncoupled SA-independent

pathogenesis-related gene expression in roots. *Mol. Plant-Microbe Interact* 21:424-432.

Zarate, S.I., L.A. Kempema and L.L.Walling. 2007. Silverleaf whitefly induces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiol.* 143:866-875.