



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Enseñar la explotación de la tierra, no la del hombre

**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**INFECCIÓN DE *Nacobbus aberrans* EN PLANTAS DE
JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) Y DETECCIÓN
DE GENES PR**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ALDO GUADALUPE BUSTAMANTE ORTIZ



**DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES**



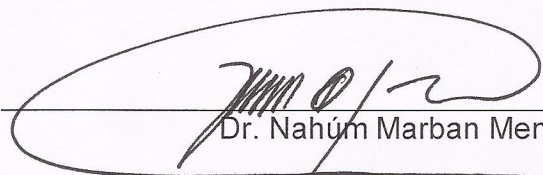
CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO DE 2018

INOCULACIÓN DE PLANTULAS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)
CON *Nacobbus aberrans* Y DETECCIÓN DE GENES PR.

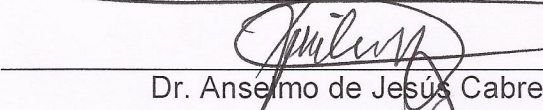
Tesis realizada por **ALDO GUADALUPE BUSTAMANTE ORTIZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

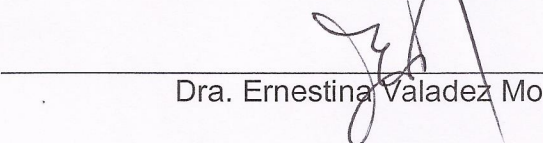
DIRECTOR:


Dr. Nahúm Marban Mendoza

CODIRECTOR:


Dr. Anselmo de Jesús Cabrera Hidalgo

ASESOR:


Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

CHAPINGO, EDO. DE MÉXICO, JUNIO DE 2018

CONTENIDO GENERAL

CONTENIDO GENERAL	II
ABREVIATURAS Y SIGLAS	IV
LISTA DE CUADROS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
DEDICATORIA.....	VIII
AGRADECIMIENTOS	IX
DATOS BIOGRÁFICOS	XI
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL ABSTRACT	2
1 CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
1.1 OBJETIVOS	4
1.1.1 <i>Objetivo General:</i>	4
1.1.2 <i>Objetivos Específicos:</i>	4
1.2 HIPOTESIS	4
2 CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 EL JITOMATE (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> L.) EN MÉXICO.	5
2.1.1. <i>Fitonematodos en el cultivo de jitomate</i>	5
2.2. GENERALIDADES DE LOS FITONEMATODOS	5
2.3. <i>NACOBBUS ABERRANS</i> (THORNE Y ALLEN)	6
2.3.2. <i>Descripción morfológica</i>	6
2.3.3 <i>Ciclo de Vida de N. aberrans</i>	7
2.3.4 <i>Sitios especializados de alimentación</i>	8
2.4. MECANISMOS DE DEFENSA DE LA PLANTA.....	8
2.4.1 <i>Defensas preformadas o constituidas</i>	9
2.4.2 <i>Defensas inducibles</i>	9
2.5. PROTEÍNAS DE RESISTENCIA.....	9
2.5.1 <i>Clasificación de PRs.</i>	10
2.6 LITERATURA CITADA	11
3. CAPÍTULO III. PENETRACIÓN E INVASIÓN DE <i>NACOBBUS</i>	
<i>ABERRANS</i> EN EL SISTEMA RADICULAR DE JITOMATE (<i>SOLANUM</i>	
<i>LYCOPERSICUM</i> L).	15
3.1. RESUMEN.....	15
3.2 ABSTRACT.....	15
3.3. INTRODUCCIÓN	16
3.4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.4.1 <i>Material vegetal</i>	17
3.4.2. <i>Extracción del Nematodo</i>	18
3.4.4. <i>Inoculación y muestreo</i>	19
3.4.5 <i>Tinción y análisis de raíces inoculadas</i>	19

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIONES	21
3.5.1. <i>Búsqueda y cuantificación de N. aberrans en el sistema radical</i>	21
3.6 CONCLUSIONES.....	24
3.7 LITERATURA CITADA	24
4. CAPÍTULO IV. EXPRESIÓN DE GENES DE PROTEINAS RELACIONADAS A PATOGENESIS (PR) EN PLATULAS DE JITOMATE (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i> L) INOCULADAS CON <i>NACOBBUS</i> <i>ABERRANS</i>	26
4.1. RESUMEN.....	26
4.2 ABSTRACT.....	26
4.3. INTRODUCCIÓN	27
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.4.1 <i>Material vegetal</i>	30
4.4.2 <i>Extracción de RNA</i>	30
4.4.3 <i>Síntesis de cDNA</i>	31
4.4.4 <i>Determinación de la calidad de RNA y cDNA</i>	32
4.4.5 <i>Cuantificación de RNA y cDNA</i>	32
4.4.6 <i>Detección de genes de Proteínas Relacionadas a Patogénesis</i>	32
4.4.6.1 <i>Dilución del cDNA</i>	32
4.4.6.2 <i>Estandarización de condiciones de la PCR</i>	33
4.4.6.3 <i>Selección de Primer Oligonucleótidos</i>	34
4.4.6.4 <i>Amplificación de genes relacionados con la defensa</i>	35
4.4.6.5. <i>Separación de fragmentos de PCR mediante</i> <i>Electroforesis</i>	36
4.4.6.6 <i>Estimación cualitativa de la cantidad de transcritos de</i> <i>genes PR</i>	37
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIONES	38
4.5.1. <i>Extracción de RNA y cDNA de muestras vegetales</i>	38
4.5.2. <i>Determinación de la Calidad del RNA y cDNA</i>	39
4.5.2. <i>Determinación de TM por gradiente de temperatura</i>	39
4.5.3. <i>Expresión de Proteínas relacionadas a la patogénesis</i>	40
4.6 CONCLUSIONES.....	45
4.7 LITERATURA CITADA	45
5. APENDICE	49
A1. TÉCNICA DE TAMIZADO	49

ABREVIATURAS Y SIGLAS

A	Adenina
A₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
A₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
ALN	Agua libre de nucleasas
AgNO₃	Nitrato de Plata
APS	Persulfato de Amonio
C	Citosina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA)
ch	Control hoja/ planta sin inoculación de nematodo
cr	Control raíz/ planta sin inoculación de nematodo
cv	Variedad Comercial
DDI	Días después de inoculación
dH₂O	Agua destilada
dNTP	Desoxinucleótidos Trifosfato
EDTA	(<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>) Acido etilendiaminotetracetico
et al	Del latin “et alia” o “et alii” que significa “y otros”
EtBr	Bromuro de etidio
EtOH	Etanol
G	Guanina
g	Gramo (-s)
h	Hora (-s)
HPLC	(<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>) Cromatografía líquida de alta presión
J₁	Juvenil de <i>Nacobbus aberrans</i> de primer estadio
J₂	Juvenil de <i>Nacobbus aberrans</i> de segundo estadio
J₃	Juvenil de <i>Nacobbus aberrans</i> de tercer estadio
J₄	Juvenil de <i>Nacobbus aberrans</i> de cuarto estadio
kb	Kilobases
mA	Miliamperes
Min	Minuto (-s)
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
mL	Mililitros
mM	Milimol (-s)
MPM	Marcador de peso molecular
NaClO	Hipoclorito de sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
Ng	Nanogramo (-s)
Nm	Nanómetro (-s)

PAL	Fenilalanina Amonio Liasa
PCR	(<i>Polymerase Chain Reaction</i>) Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Proteínas implicadas en la patogénesis
POX	Peroxidasa
Pb	Pares de bases
PM	Peso molecular
pM	Picomoles
RNA	Ácido ribonucleico (RNA)
rpm	Revoluciones por minuto
rx	Reacción (-s)
SAS	Statistical Analysis System
s	Segundo (-s)
T	Timina
th	Tratamiento hoja/ Plantas inoculadas con <i>N. aberrans</i>
tr	Tratamiento raíz/ Plantas inoculadas con <i>N. aberrans</i>
TAE	Tris-acetato EDTA (amortiguador)
Taq	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-borato EDTA
TEMED	NNNN-Tretramethylethylene-diamine for electrophoresis
TM	Temperatura de alineamiento
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidad (-s) de enzima
Uv	Ultravioleta
V	Voltios
x	Veces la concentración
[FINAL]	Concentración FINAL
[Sol. concentrada]	Concentración Inicial
°C	Grado Celsius
µg	Microgramo (-s)
µL	Microlitro (-s)
µM	Micromol (-s)

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Familias de proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) detectadas en plantas de interés agrícola (Van Loon et al., 2006; Vidhyasekaran, 2008). .	10
Cuadro 2. Porcentaje de eclosión de huevos sometidos a incubación (28 °C) durante 72 horas.....	21
Cuadro 3. Funciones de algunas Proteínas relacionadas a patogénesis.....	28
Cuadro 4. Muestras vegetales utilizadas en la investigación.	30
Cuadro 5. Condiciones de mezcla de PCR para la amplificación de fragmentos de PR con gradiente de temperatura.	33
Cuadro 6 Oligonucleotidos usados para analizar la acumulación de algunos genes relacionados con la defensa en platas de jitomate cv Rio Grande inoculadas con Nacobbus aberrans.....	34
Cuadro 7. Reactivos para la preparación de geles de acrilamida 8 %	35
Cuadro 8. Condiciones de mezcla de PCR para la amplificación de genes de proteínas relacionadas a patogénesis	36
Cuadro 9. Lecturas de pureza y concentración de RNA y cDNA de las muestras de plantas inoculadas con N. aberrans.....	38
Cuadro 10. Presencia-ausencia de las proteínas relacionadas a patogénesis en muestras de raíz.	41
Cuadro 11. Presencia-ausencia de las proteínas relacionadas a patogénesis en muestras de hojas.....	41
Cuadro 12. Fragmento amplificados de algunas proteínas relacionadas a la patogénesis.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de <i>Nacobbus aberrans</i> . A. Región posterior de hembra inmadura; B. Región posterior de hembra madura; C. Hembras maduras; D. Macho; E. Región anterior del Macho; F. Esófago del macho; G. Región posterior del macho; H. Región anterior de la segunda etapa juvenil (J ₂); I. Región posterior de J ₂ . Fuente: Manzanilla-López et al., (2002).....	7
Figura 2. Obtención de inóculo y proceso de extracción. A) Plantas de jitomate agalladas con <i>N. aberrans</i> . B) Agallas con <i>N. aberrans</i> como fuente de inóculo. C) Huevos extraídos por tamizado de Cobb. D) Juveniles de <i>N. aberrans</i>	18
Figura 3. Inoculación. A) Colocación de raíz agallada en sustrato antes del transplante. B) Inoculación de juveniles al momento del transplante.....	19
Figura 4. Procedimiento general para la tinción de raíces de jitomate infectadas con <i>N. aberrans</i>	20
Figura 5. Desarrollo de <i>Nacobbus aberrans</i> en Jitomate. Se muestra el porcentaje de los nematodos dentro del sistema radical a los diferentes días después de la inoculación con <i>N. aberrans</i> (Promedio de 1 gr de raíz inoculadas con 1200 J ₂).	23
Figura 6. Proceso de infección de <i>Nacobbus aberrans</i> . A) Juveniles del nematodo a los 7 DDI. B) Masa de juveniles a los 14 DDI. C) Juveniles en el tejido vascular a los 21 DDI. D y E) Agallas y hembra del nematodo en raíces de jitomate a los 28 DDI.	23
Figura 7. Condiciones estandarizadas de termociclaje para la amplificación del gen PR a través de la técnica de PCR punto final.	36
Figura 8. Gel de poliacrilamida 8 % que muestra la calidad de RNA y cDNA del material vegetal empleado en la investigación. Las claves siguientes corresponden a la identificación de las muestras: los tiempos de muestreos (2, 7, 14, 21 y 28) días después de inoculación); C*= plantas control sin inoculación; T*= plantas tratamiento, inoculadas con <i>Nacobbus aberrans</i> . MM= Marcador molecular 1Kb	39
Figura 9. Prueba de gradientes en 6 muestras de raíz (Muestras 2ddi, 14 ddi y 28 ddi). Fechas amarillas señalan las bandas del gen esperadas por el peso molecular. El marcador de peso molecular fue de 1Kb.....	40
Figura 10. Prueba de gradientes en 6 muestras de hoja (Muestras 2ddi, 14 ddi y 28 ddi). Fechas amarillas señalan las bandas del gen esperadas por el peso molecular. El marcador de peso molecular fue de 1Kb.....	40

DEDICATORIA

A Dios. Por permitirme llegar a este punto de mi vida profesional, brindándome fuerzas para culminar esta etapa más en mi vida, te amo.

Con Amor dedico este trabajo a mi madre **Ma. Dolores Ortiz Betaza** y a mi padre **Silvio Bustamante B. †** (Q.P.D.), por su esfuerzo, comprensión, amor, sacrificio y apoyo brindado eternamente durante toda mi vida.

A mis hermanos: Silvio y Luis Ángel, quienes a pesar de los obstáculos nunca se han rendido y por ser parte de mi vida e inspiración para salir adelante, y no decaer en este largo camino, los quiero como no se imaginan.

Al resto de mi familia: Abuelos(a), tíos(a) y primos(a), por su eterno apoyo en todas las decisiones que he tomado a lo largo de los años, ya que siempre están ahí, en las buenas y en las malas.

Al agricultor mexicano, ejemplo de carácter, dignidad, éxito, fuerza, inteligencia, orgullo, trabajo y tradición. ¡**Mis Respetos!**

Y a todos aquellos, que ven al igual que yo, la ciencia no como un *modus vivendi*, pero si como un modo para mejorar la calidad de vida en todos sus aspectos.

Quisiera entregarles todo, regalarles mi corazón

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT), por el apoyo económico otorgado para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, por abrirme sus puertas, brindándome la oportunidad de crecer tanto personal, profesional, científica y culturalmente.

A los **Departamentos de Parasitología Agrícola y Fitotecnia**, especialmente al programa de posgrado en **Protección Vegetal**, y cada uno de los doctores, maestros, técnicos y secretarías que lo conforman, por todas las enseñanzas y experiencias recibidas que contribuyeron a una formación académica y profesional.

Al **Dr. Nahúm Marban Mendoza** por su apoyo incondicional, así como sus asesorías en la realización de la presente investigación.

Al **Dr. Anselmo de Jesús Cabrera Hidalgo**, por ser mi guía, por su paciencia, consejos, colaboración e interés en la realización de mi trabajo y por compartir sus conocimientos, porque encontré a un amigo en cual confiar.

A la **Dra. Ernestina Valadez Moctezuma**, por sus enseñanzas, asesorías, apoyo y escucha durante la elaboración del trabajo de investigación, por introducirme a la biología molecular que en un principio fue un reto para mí y que hoy por hoy no podría vivir sin ella.

A la **Sra. Dolores Luna “Lolita”** por la asistencia técnica ya que siempre te mostrabas atenta, amable y dispuesta a apoyarme en cualquier momento, porque tus sabios consejos y hacerme entender que siempre es buen momento para un café.

Al **Dr. Samir Samah** por su valiosa ayuda durante la investigación, por resolver siempre cualquier duda acerca del maravilloso mundo de la biotecnología.

A mis **amigos de laboratorio** Alexander, Christiam, Diana, Mariana, Rosario que me hicieron compañía durante las intensas horas de trabajo.

A **mis compañeros y amigos**, que hicieron más amena mi estadía en Texcoco, porque siempre se aprende algo nuevo de cada una de las personas que se encuentran alrededor: **Cinthya Fernández, Flor Hernández, Jessika Ordoñez, Lu Hernández, Mary Ruiz, Pedro Plancarte, Arturo Peláez, Apolinar Mota, Nelson Salvador, Citlali Almeraya, Viviana Carbajal, Marcos Reyes, Olga Jiménez, Jazmín Zavala, Mayra, Gustavo, Gerardo, Natalia.**

Paola Cubillo, Javier Flores, Imelda Jarquín, Iván Herbé, Christiam Espinoza, Ramiro Hernández por compartir el mismo sueño conmigo, esta Maestría. **¡Ha sido toda una experiencia de vida!**

Iraís Téllez Montalvo, Miguel Escárcega, por seguir siendo mis amigos en la distancia.

Seguramente eh olvidado mencionar a muchas personas e instituciones, que de manera desinteresada contribuyeron con un granito de arena al desarrollo de este trabajo, les pido disculpas, pero **¡En mi corazón♥ nadie falta!**

De quien los ama...

Aldo G. Bustamante Ortiz

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	Aldo Guadalupe Bustamante Ortiz
Fecha de Nacimiento	Loma Bonita Oaxaca, México
Lugar de Nacimiento	11 de agosto de 1991
No. Cartilla Militar	D-3360388
CURP	BUOA910811HOCSRL06
Profesión	Ingeniero Agrícola Tropical
Cédula profesional:	10876364

Desarrollo académico

Bachillerato	Centro de Bachillerato Tecnológico industrial y de servicios No.90
Licenciatura	Universidad del Papaloapan, <i>campus Loma Bonita</i>

*Vive como si fueras a morir mañana,
Aprende como si fueras a vivir siempre.*

Gandhi

RESUMEN GENERAL

INOCULACIÓN DE PLANTULAS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) CON *Nacobbus aberrans* Y DETECCIÓN DE GENES PR.

El jitomate es de las hortalizas más importantes en el mundo con una producción de 165 millones de toneladas, afectada por la presencia de plagas y enfermedades. *Nacobbus aberrans* es un fitoparásito de importancia agrícola con la capacidad de inducir mecanismos de defensa en las plantas hospedantes provocados por la expresión diferencial de genes. La presente investigación tuvo como objetivo establecer *N. aberrans* en el sistema radicular de jitomate y determinar la expresión genética de proteínas relacionadas a patogénesis (PRs) durante la interacción. Juveniles de *N. aberrans* se obtuvieron de raíces agalladas por la técnica de tamizado e identificadas por claves morfológicas. Los tratamientos fueron plántulas de jitomate cv Rio Grande inoculadas con un gramo de agallas, 15000 huevos y 1200 juveniles; los controles consistieron de plantas sin inoculación. Se recolectaron raíces y hojas a los 2, 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación (DDI); algunas raíces se tiñeron con fucsina ácida para el análisis histológico, el resto junto con hojas se les extrajo RNA; se sintetizó cDNA y se amplificaron los genes PR PAL, PR42, PR52, GLU, POX con PCR tanto en hojas como en raíces. Los datos obtenidos, mostraron que menos del 1 % de los nematodos inoculados prevaleció en el sistema radicular, mostrando una mayor actividad durante los días 7 a 21 DDI. La expresión de todos los genes PR indicó también una mayor actividad principalmente durante los días 7-21 DDI en todas las muestras; sin embargo, también se observó una ligera actividad de éstos en tejido no infectado, sugiriendo actividad basal de los mismos. Los resultados obtenidos confirman la activación de los genes para las proteínas Fenilalanina amonio liasa Glucanasas y Quitinasas, pero para el gen de la proteína Peroxidasa no hubo expresión en hojas.

Palabras claves: PCR, Análisis histológico, Tinción de nematodos en tejido vegetal, Proteínas relacionadas a la patogenicidad.

GENERAL ABSTRACT

INOCULATION OF TOMATO PLANTS (*Solanum lycopersicum* L.) WITH *Nacobbus aberrans* AND PR GENE DETECTION

The tomato is one of the vegetables most important in the world with a production of 165 million tonnes, affected by the presence of pests and diseases. *Nacobbus aberrans* is a fitoparásito of agricultural importance with the ability to induce defense mechanisms in the host plants caused by the differential expression of genes. The present investigation had as objective to determine the genetic expression of some proteins related to pathogenesis (PRs) in the interaction tomato-*N. aberrans* as well as the establishment of the latter on the root system. Youths of *N. aberrans* were obtained from roots agalladas by the technique of screening and identified by keys morphological. The treatments were seedlings of tomato cv Rio Grande inoculated with a gram of galls, 15000 eggs and 1200 youth, control was plants without inoculation. Roots and leaves were collected at 2, 7, 14, 21 and 28 days after inoculation (DDI); Some roots were stained with acid fuchsine for histological analysis, the remainder along with leaves were extracted RNA; cDNA synthesized and were amplification for some defense genes with PCR end point. The data obtained showed that less than 1 % of the nematodes inoculated prevailed in the root system, showing increased activity during the days 7 to 21 DDI. The expression of the genes PAL, PR42, PR52, GLU, POX also indicated a greater activity mainly during the days 7-21 DDI in all samples; however, it was also observed a slight activity of these genes in tissue not infected, suggesting basal activity of the same. The results obtained confirm the activation of genes for proteins phenylalanine ammonium lyase Glucanasas and Quitinasas, but for the gene peroxidase protein there was no expression in leaves.

Key words: PCR: histological analysis, staining of nematodes in plant tissue, proteins related to the pathogenicity

1 Capítulo I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El jitomate es de las hortalizas más importantes en el mundo, con una producción de casi 165 millones de toneladas y una productividad aproximada de 60 mil millones de pesos (FAOSTAT, 2014). En México, se consume diariamente como parte de la dieta de sus habitantes; se producen 2, 320,109 ton, con un consumo per cápita de 14.66 kg/año. Se exportan 1, 560,000 ton y se importan 209,000 ton de tomate rojo fresco (FAOSTAT, 2014; SIAP, 2014). Uno de los principales problemas que afectan la producción de este cultivo, es la presencia de plagas y enfermedades, principalmente virus, bacterias, oomicetos, hongos, nematodos e insectos (Jones *et al.*, 2013). Los fitonematodos causan pérdidas anuales estimadas del 8.8 a 14.6% que se traduce en unos 157 mil millones de dólares anuales en el mundo (Nicol *et al.*, 2011); además tienen la capacidad de inducir la formación de sitios especializados de alimentación, células gigantes o sincitios debido a la alteración de la expresión génica de las células hospedantes (García Pineda y Lozoya Gloria, 2004). Se sabe que una vez que se da el reconocimiento del patógeno, se desencadenan señales transduccionales, reprogramando el metabolismo celular; es decir, cambios en la transcripción de genes. La incompatibilidad entre hospedante y patógeno deriva en la regulación y expresión de genes en la planta, relacionados con la defensa y la muerte celular localizada (Dropkin, 1980; Lawton y Lamb 1987). El desarrollo de técnicas moleculares para el análisis de la expresión génica durante la interacción planta-nematodo; mediante la determinación efectiva de la producción de RNAm, que posteriormente será traducido a la proteína específica, permite avanzar en la determinación de la respuesta de resistencia a la infestación (Malo *et al.*, 2015).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General:

- Detectar la expresión de genes relacionados a patogénesis (PRs) en la interacción jitomate-*Nacobbus aberrans* a través del tiempo.

1.1.2 Objetivos Específicos:

- Evaluar la penetración y establecimiento de juveniles de *Nacobbus aberrans* en el sistema radical de plantas de jitomate en diferentes periodos de tiempos.
- Identificar algunos genes relacionados a patogénesis que se expresan en la interacción compatible jitomate-*N. aberrans*.

1.2 HIPOTESIS

- La actividad de *Nacobbus aberrans* en el sistema radical de jitomate es mayor en las primeras etapas fenológicas del cultivo.
- La expresión génica en la interacción jitomate-*Nacobbus aberrans* es inducida por el número de nematodos dentro del sistema radical de *Solanum lycopersicum* L.
- La actividad de Fenilalanina amonialiasa (PAL), Peroxidasa (POX), Glucanasa (GLU) se ven reducidas en la interacción compatible jitomate-*N. aberrans*.

2 Capítulo II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El Jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) en México.

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L) es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las Solanáceas (Nuez, 2001); es una planta de porte erecto, arbustiva y anual, su fruto es una baya bi o plurilocular que alcanza un peso en su madurez entre los 5 a 500 g (Fernández-Ruiz, 2007). A nivel mundial, el área destinada al cultivo de jitomate se incrementó en 38 % y la producción en 42 % en los últimos 10 años (Flores, 2012). México ocupa el décimo lugar en la producción mundial, con una participación del 2 % (SIAP, 2014). La producción de jitomate en México creció a una tasa promedio anual de 3.3 % entre 2005 y 2015, para ubicarse en 3.1 millones de toneladas (FIRA, 2016).

2.1.1. Fitonematodos en el cultivo de jitomate

Greco y Vito (2011), indican que hay un amplio número de nematodos asociados al cultivo del jitomate, entre los más importantes, están los nematodos agalladores de los géneros *Meloidogyne* sp. y *Nacobbus* sp. (Marban-Mendoza et al., 1989). De acuerdo con Flores et al. (2007), en México el nematodo *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen o “nematodo falso agallador” es uno de los más importantes por las pérdidas causadas en la producción de hortalizas, como el chile (*Capsicum annuum* L.), jitomate (*Solanum lycopersicum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Esta nematodo se encuentra en diez estados de la República Mexicana, siendo el jitomate uno de los hospedantes más afectados (Cid del Prado et al., 1995; Manzanilla-López et al., 2002).

2.2. Generalidades de los fitonematodos

Jones et al. (2013) mencionan que existen más de 4000 especies de nematodos fitopatógenos de importancia en la seguridad alimentaria del mundo. Los fitonematodos pueden parasitar todas las partes de la planta y presentan una amplia variedad de hábitos alimenticios (Agrios, 1988). Se caracterizan por presentar un estilete, ya sea un estomatoestilete (Orden: *Tylenchida*) u

odontoestilete (Orden: *Dorylaimida*) que funciona como aguja hipodérmica para extraer el contenido citoplasmático de las células del hospedante durante su alimentación (Christie, 1970; Hooper, 1978). Los nematodos que típicamente inducen la formación de agallas en el sistema radical de las plantas, son *Meloidogyne* sp y *Nacobbus* sp. Los síntomas aéreos que manifiestan las plantas atacadas por estos organismos son achaparramiento, clorosis y marchitamiento, principalmente (Zavaleta, 1999). También, se produce una asociación entre el nematodo y otros patógenos, formando complejos con potencial para producir enfermedades severas (Zavaleta, 2002), por ejemplo marchitez por *Fusarium*, *Verticillium*, ahogamiento por *Phytium*, pudriciones por *Rhizoctonia* y *Phytophthora* o bien cáncer bacteriano por *Corynebacterium michiganense* (Back et al., 2002), entre otras.

2.3. *Nacobbus aberrans* (Thorne y Allen)

Thorne y Allen (1994), proponen al género *Nacobbus* basándose en el dimorfismo sexual, las glándulas esofágicas sobrepuestas dorsalmente al intestino y las agallas o hinchamientos producidos en las plantas hospedantes (Sher, 1970). Este género se reporta predominantemente en ambiente secos y semiáridos y altitudes altas (Manzanilla-López et al., 2002). *N. aberrans* es un nematodo polífago de más de 18 familias botánicas y 84 especies convirtiéndolo en un patógeno importante y de difícil manejo, debido a que bajo condiciones ambientales favorables una sola hembra puede producir de 37 a 833 huevos (Manzanilla-López, 1997; Franco et al., 1999; Manzanilla-López et al., 2002); además de provocar pérdidas en la producción de hasta el 80%, causando serias mermas económicas (Vila-Briones et al., 2008).

2.3.2. Descripción morfológica

Nacobbus aberrans se caracteriza por presentar un marcado dimorfismo sexual (Figura 1). La hembra inmadura, es vermiforme, con glándulas esofágicas sobrepuestas dorsalmente al intestino y con la cola redondeada, generalmente se encuentran en raíces y suelo, debido a que pueden salir de la raíz. Las

hembras poseen un solo ovario (las de *Meloidogyne* con dos ovarios), en forma globosa, pero con adelgazamiento gradual en los extremos, depositan sus huevos en una goma sobre la superficie de la agalla (Jalata, 1985). Los machos son vermiformes, con una bursa terminal. Las larvas de segundo instar son vermiformes con cutícula anillada regularmente, estilete robusto con nódulos basales redondeados (Jalata, 1991).

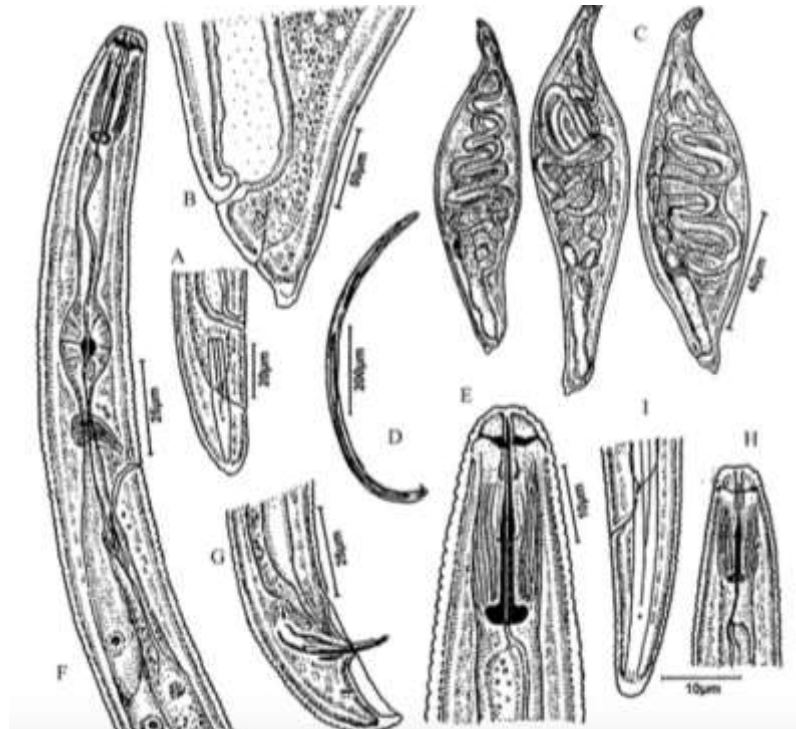


Figura 1. Anatomía de *Nacobbus aberrans*. A. Región posterior de hembra inmadura; B. Región posterior de hembra madura; C. Hembras maduras; D. Macho; E. Región anterior del Macho; F. Esófago del macho; G. Región posterior del macho; H. Región anterior de la segunda etapa juvenil (J₂); I. Región posterior de J₂. Fuente: Manzanilla-López et al., (2002).

2.3.3 Ciclo de Vida de *N. aberrans*

El ciclo completo de *N. aberrans* concluye entre 28 y 95 días dependiendo de las condiciones ambientales y el hospedante, puede soportar temperaturas bajas y sobrevivir en el suelo en condiciones adversas de desecación y ausencia de hospedantes (Jalata y Kaltenbach, 1979). Una vez que la hembra pone la masa gelatinosa, el macho puede fecundarla y producir de 37 hasta 833 huevos

(Costilla, 1985). El ciclo inicia con el huevo hasta desarrollarse en el primer estadio (J_1) dentro de este, muda y eclosiona a segundo instar (J_2) penetrando las raíces de su hospedante para posteriormente moverse intracelularmente con el fin de alimentarse (Brodie, 1984; Jatala 1985; Stone y Burrows, 1985). El J_2 muda dentro de la raíz o en ocasiones en el suelo dando lugar al tercer estadio juvenil (J_3), generalmente se encuentra menos activo y se localiza enrollado en la corteza de la raíz. La muda hacia el cuarto estadio (J_4) ocurre en la corteza y permanece ahí hasta que muda a una hembra o macho (Cid del prado, 1985). Posteriormente, existen dos caminos a seguir: a) salen como preadultos de las raíces o b) siguen alimentándose hasta inducir la formación de agallas hasta completar su ciclo en la raíz (Jalata, 1985).

2.3.4 Sitios especializados de alimentación

El ciclo de vida de *N. aberrans* depende de la exitosa inducción y mantenimiento de los sitios de alimentación, por lo cual las secreciones de las glándulas esofágica juegan un papel importante (Davis *et al.*, 2000). El género *Nacobbus* induce la formación de sitios especializados de alimentación conocidos como sincitios (Gheysen y Fenoll, 2002); como consecuencia de la hiperplasia e hipertrofia de las células vecinas se desarrollan las agallas en las raíces hospedantes. Las alteraciones dependen de la etapa de desarrollo del cultivo y del nematodo (Tovar-Soto *et al.*, 2012). El sincitio es inducido por la hembra inmadura y se caracteriza por el incremento de citoplasma, reducción del volumen de las vacuolas, hipertrofia del núcleo y nucléolo, incremento del retículo endoplásmico, ribosomas, plastidios, mitocondrias, microtúbulos y microfilamento (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

2.4. Mecanismos de defensa de la planta

Las plantas, en la naturaleza se encuentran en constante interacción con los patógenos, por lo tanto según Heath (2000) son capaces de generar un amplio repertorio de respuestas, mismas que les permite de manera temprana reconocer, detener y contrarrestar la infección. En los mecanismos de defensa

de las plantas existe una combinación de mecanismos físicos, químicos y moleculares para resistir la colonización por cualquier patógeno, claro ejemplo es la inducción de algunas proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) (Van Loon, 1997). Estas defensas pueden ser clasificadas en: defensas preformadas (Osbourn, 1996) y defensas inducibles (Collinge *et al.*, 1994).

2.4.1 Defensas preformadas o constituidas

Según Cuartero y colaboradores (2002), hacen mención a algunas características morfológicas propias de la planta, influyendo y modificando el comportamiento del patógeno.

2.4.2 Defensas inducibles

Estos mecanismos solo se activan en respuesta al ataque de patógenos durante el proceso de infección, involucrando cambios en el metabolismo de las plantas (Madriz, 2002). Al respecto se ha propuesto que todas las plantas poseen el potencial genético para defenderse por la velocidad y magnitud con que ese potencial se expresa, así como la actividad de los productos de los genes (Dixon *et al.*, 2002).

2.5. Proteínas de Resistencia

Las proteínas relacionadas con patogénesis (PRs), son aquellas inducidas en respuesta a la infección por oomicetos, hongos, bacterias, virus, nematodos o ataque de insectos (Van Loon *et al.*, 2006), las cuales se han encontrado en plantas mono y dicotiledóneas. El término de PRs (pathogenesis-related proteins) fue acuñado en 1980 (Antoniw *et al.*, 1980) para definir a aquellas proteínas codificadas por las plantas hospedantes pero inducidas sólo en situaciones patológicas o relacionadas. Aunque las PRs son por lo general expresadas en plantas enfermas, su síntesis puede ser inducida por daños mecánicos como heridas, factores ambientales estresantes (salinidad, temperatura, sequía, ozono y luz), y por algunos reguladores de crecimiento como el etileno, ácido abscísico, ácido indolacético, ácido salicílico y óxido nítrico (Hong *et al.*, 2005). Estas

proteínas se caracterizan por ser extraíbles selectivamente a pH bajo, tener peso molecular relativamente bajo, ser termoestables, se acumulan en el espacio intercelular y tienen alta resistencia a actividad proteolítica (Van Loon *et al.*, 1998).

2.5.1 Clasificación de PRs.

Se clasifican en 17 familias de PRs y su localización se encuentra en espacios intra y extracelulares (Cuadro 1). Poseen actividad antimicrobiana y están involucradas en la señalización de defensa. Algunas son reconocidas con actividad de glucanasas, quitinasas, peroxidasas, ribonucleasas, oxalato-oxidasas, inhibidoras de proteínas, transferencia de lípidos, etc.

Cuadro 1. Familias de proteínas relacionadas con patogénesis (PRs) detectadas en plantas de interés agrícola (Van Loon *et al.*, 2006; Vidhyasekaran, 2008).

PPR's	Planta en la que se detectó	Función
PR-1	Arroz, cebada, maíz, tomate, tabaco.	Antifungal, Engrosamiento de la pared celular
PR-2	Arroz, trigo, cebada, maíz, papa, tomate, tabaco, chile, frijol, soya, remolacha.	β , 1-3 glucanasa
PR-3	Arroz, maíz, tomate, chile, remolacha.	Quitinasa tipo I, II, IV, V, VI y VII
PR-4	Tabaco, tomate, árbol de goma.	Quitinasa tipo I y II
PR-5	Arroz, trigo, cebada, avena, sorgo, papa, tomate, tabaco.	Alteración de la permeabilidad de la membrana del hongo., semejante a taumatina
PR-6	Cebada, tomate, papa, tabaco.	Inhibidor de proteinasa
PR-7	Tomate	Endoproteinasa
PR-8	Pepino	Quitinasa tipo III
PR-9	Tomate, arroz, tabaco, trigo.	Peroxidasa
PR-10	Papa, espárrago, guisante, frijol, arroz.	Ribonucleasa
PR-11	Tabaco	Quitinasa tipo I
PR-12	Arabidopsis, guisante, rabano.	Defensina
PR-13	Cebada	Tionina
PR-14	Cebada LTP4	Transferencia intracelular de lípidos
PR-15	Cebada	Oxalacetato oxidasa
PR-16	Cebada y trigo.	Parecida a oxalacetato oxidasa sin presentar esta actividad
PR-17	Trigo.	Peptidasa

2.6 LITERATURA CITADA

- Agrios, G. (1988).** Fitopatología. Trad. del Inglés por Manuel Guzmán Ortiz. Editorial Limusa. México. 756 p.
- Antoniw, J. F., Ritter, C. E., Pierpoint, W. S., and Van Loon, L. C. (1980).** Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal Genetic Virology* 47:79-87.
- Back M.A., Haydock PPJ, Jenkinson P. (2002)** Disease complexes involving plant parasitic nematodes and soilborne pathogens. *Plant Pathol*, 51(6):683-697.
- Brodie, B.B. (1984).** Nematode parasites of potato. In: *Plant and Insect Nematodes*. W. Nickle (ed.). USDA. pp: 199-203.
- Cid del P. V. I. (1985).** Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1994. Pp. 57-65. In: Marban, N. T., Tomson, J. I. (eds). *Fitonematología Avanzada I*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. México.
- Collinge D. B., Gregersen P., Thordal C. H. (1994).** The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In *Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches*. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker. p. 391-433.
- Costilla M.A. (1985).** El falso nematodo del nudo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1994 y su relación con el cultivo de papa en el noreste argentino. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán*. 62: 79-97.
- Cuartero, J., Laterrot, H., Van Lénteren, J.C. (2002).** Host plant resistance to pathogens and arthropods pest. In: *Integrated pest and disease management in greenhouse crops*. 124-138pp. Eds. Albajes R, Gullino M L, Van Lenteren J C and Elad y. Kluwer. Academic Publishers. 545p.
- Christie, J. R. (1970).** Nematodos de los vegetales, su ecología y control. Limusa. p. 275
- Davis E. L., R. S. Hussey, T. J. Baum, J. Bakker, y A. Schots. (2000).** Nematode parasitism genes. *Annual Review of Phytopathology*. 38:365-96.
- Dixon, R.A.; Achnine, P. L.; Kota, C.J.; Liu, M.S.; Reddy, L. W. (2002).** The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective, *Mol Plant Pathol*. 3: 371-390.
- Dropkin, V. H. (1980).** Introduction to plant nematology. John Wiley and Sons. p. 293.
- Fernández-Ruiz V, Cámara M. y Quintela J.C. (2007).** Ingredientes bioactivos de tomate: licopeno. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*. 16:36-40.
- FIRA “Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura”. (2016).** Parnorama Agroalimentario. Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial. pp 36.
- Flores-Camacho. R.; R. H. Manzanilla-López; I. C. del Prado-Vera y A. Martínez-Garza. (2007).** Control de *Nacobbus averrans* (Thorne) Thorne y Allen con *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25(1):26-34. México.

- Flores-Sánchez ID. (2012).** Valoración agronómicas y de calidad de frutos en poblaciones de jitomate mexicano. Tesis de Maestría. Colegio de postgraduados. Posgrado de recursos genéticos y productividad genética. Montecillo, Texcoco edo. de México. pp 105.
- FAOSTAT “Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics”. (2014).** Producción mundial de tomate rojo. Recuperado de la red: 23 <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Fecha de consulta 01/03/2017.
- Franco, J. J. Ramos, R. Oros, G. Main y N. Ortuno. (1999).** Pérdidas económicas causadas por *Nacobbus aberrans* y *Globodera* spp. En el cultivo de la Papa en Bolivia. Revista Latinoamericana de la Papa. 11:40-66.
- García Pineda, E. y E. Lozoya Gloria. (2004).** Genes de resistencia a enfermedades en plantas. Revista Mexicana de Fitopatología, 22(3).
- Gheysen, G., and C. Fenoll. (2002).** Gene expression in nematode feeding sites. Annual Review of Phytopathology 40:191-219.
- Greco, N. and Vito, M. di. (2011).** Main nematods problems of tomato. Acta horticulturae. 914: 243-249.
- Heath, M.C. (2000).** Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. Current Opinion in Plant Biology. 3: 315-319 p.
- Hong, J. K., Lee, S. C., and Hwang, B. K. (2005).** Activation of pepper basic PR-1 gene promoter during signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. Gene 356:169-180.
- Hooper, D. J. (1978).** “Structure and classification of nematodes”. En Plant Nematology. Dir. J. F. Southey. Her Majesty’s Stationary Office. pp. 3–45.
- Jatala, P. (1985).** El nematodo falso nodulador de la raíz: *Nacobbus* sp. In: Fitonematología Avanzada I. N. Marbán-Mendoza e I.J. Thomason (comps.). Colegio de Postgraduados, México. pp: 47-55.
- Jatala, P. (1991).** “Reniform and flase root-knot nematodes, *Rotylenchus* and *Nacobbus* spp.” En Manual of agricultural Nematology. Dir. W. R. Nickle, Marcel Dekker. pp. 509 – 528.
- Jatala, P. and R. Kaltenbach. (1979).** Survival of *Nacobbus aberrans* adverse conditions. Journal of Nematology 11(4):303.
- 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 y R. N. Perry. (2013).** Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology 14(9):946-961.
- Lawton, M.A., Lamb, C.J. (1987).** Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Molecular and Cellular Biology* 7: 335-341.
- Madriz, O.K. (2002).** Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plantas. 63: 23-32.
- Malo, I., & Bernacchia, G., & Arévalo, P. (2015).** Activación de genes de defensa en plantas de tomate de mesa *lycopersicum esculentum* L., a través de la aplicación de sustancias químicas y naturales. La granja. *Revista de Ciencias de la Vida*, 21 (1), 61-68.

- Manzanilla-López, R.H. (1997).** Studies on the characterization and bionomics of *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1994 (Nematoda: Pratylenchidae), Ph.D. Thesis University of Reading. U.K. 395p.
- Manzanilla-López, R.H., M.A. Costilla, M. Doucet, J. Frnaco, R.N. Inserra, P.S. Lehman, V. I. Cid del Prado, R.M. Suza, and K. Evans. (2002).** The genus *Nacobbus* Thorne and Allen, 1994 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149-227.
- Marban-Mendoza, N., M.B. Dicklow, and B.M. Zuckerman. (1989).** Evaluation of control of *Meloidogyne incognita* and *Nacobbus aberrans* on tomato by two leguminous plants. *Revue de Nématologie* 12:409-412.
- 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.
- Nuez F. (2001).** El cultivo de tomate. Edit Mundi-Prensa. España.
- Osborn A. E. (1996)** Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Sher, S.A. (1970).** Revision of the Genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1994. (Nematoda:Tylenchoidea). *Journal of Nematology* 2(3):228-235.
- SIAP “Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera”. (2014).** Avance de Siembras y Cosechas, Resumen nacional por cultivo. Recuperado de http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do. Fecha de consulta: 01/03/2017.
- Stone A.R. y P.R. Burrows. (1985).** C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes. Set 8, num. 119.
- Tovar-Soto A., M. G. Medina-Canales y R. Torres-Coronel. (2012).** Distribución, incidencia y alteraciones histológicas de una nueva enfermedad en betabel (*Beta Vulgaris* L.) causada por el falso nematodo agallador *Nacobbus aberrans*, en el Valle de Tepeaca, Puebla, México. *Nematropica* 42(2):191-197.
- Van Loon L. C., Rep. M., and Pieterse C. M. J. (2006).** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review Phytopathology*. 44:135-162.
- Van Loon, L.C. (1997).** Induced resistance in plants and the role of pathogenesis related proteins. *European Journal of Plant Pathology*. 103: 753-765.
- Van Loon, L.C., Bakker P. A. H., and Pieterse, C. M. J. (1998).** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review Phytopathology*. 36: 453-483.
- Vidhyasekaran, P. (2008).** Fungal pathogenesis in plants and crops. *Molecular biology and host defense mechanisms*. Second Edition, CRC Press. 509p.
- Villa-Briones, A., E. Zavaleta-Mejía, M. Vargas-Hernández, O. Gómez-Rodríguez y S. Ramírez-Alarcón. (2008).** Incorporación de vermicomposta para el manejo de *Nacobbus aberrans* en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Revista Chapingo. Serie horticultura* 14(3):249-255.México.

- Zavaleta M., E. (1999).** "Especies de nematodos que dañan las hortalizas". En Hortalizas, plagas y enfermedades. Dirs. Anaya R., S. y Romero N., J. Trillas. pp. 63 - 76
- Zavaleta, E.M. (2002).** Rompimiento de resistencia a hongos fitopatógenos por nematodos fitoparásitos, una hipótesis, Rev Mex Fitopatol 20:118-122.

3. Capítulo III. PENETRACIÓN E INVASIÓN DE *Nacobbus aberrans* EN EL SISTEMA RADICULAR DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L).

PENETRATION AND INVASION OF *Nacobbus aberrans* IN THE ROOT SYSTEM OF TOMATO (*Solanum lycopersicum* L).

Aldo Guadalupe Bustamante-Ortiz¹ y Nahúm Marban-Menzoda²

3.1. Resumen

Nacobbus aberrans es un fitoparásito de importancia agrícola con una gran heterogeneidad morfológica, alta capacidad reproductiva y amplio rango de hospedantes. En la presente investigación se determinó la penetración e invasión de juveniles de *N. aberrans* a través del tiempo en raíces de jitomate. Se usaron plantas de jitomate variedad Rio grande de 30 días de edad, y se colocaron en macetas previamente inoculadas con un gramo de raíz agallada, 15000 huevos y 1200 juveniles de *N. aberrans*, y se mantuvieron en condiciones de invernadero a $28 \pm 3^\circ\text{C}$, 13 horas de luz y 40% de humedad relativa en promedio. A los 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación, se evaluó el número de nematodos/gramo de raíz que penetraron e invadieron en el sistema radical del cultivo usando la técnica de tinción con fucsina ácida. El nematodo se encontró a partir de los siete días después de la inoculación (DDI) en el sistema radical y la penetración aumento en más del 100 % a los 21 días. La localización del nematodo fue inicialmente en el tejido epidermal y a partir de los 21 DDI se encontró alrededor del sistema vascular de la planta. Hembras inmaduras se encontraron a partir de los 14 DDI, que coincidió con la presencia de las primeras agallas (< 2 mm).

Palabras claves: *Nacobbus aberrans*, tinción con fucsina ácida, invasión, agallas.

3.2 Abstract

Nacobbus aberrans is a fitoparásito of agricultural importance with a great heterogeneity morphological, high reproductive capacity and wide range of host plants. In the present investigation it was determined the penetration and invasion of juvenile *N. aberrans* through time in roots of tomato. The Rio grande variety of 30-day-old tomato plants were used, and they were placed in pots previously inoculated with a gram of gill root, 15000 eggs and 1200 juvenile *N. aberrans*, and were kept in greenhouse conditions at $28 \pm 3^\circ\text{C}$, 13 hours of light and 40% of Relative humidity on average. At 7, 14, 21 and 28 days after inoculation, evaluated the number of nematodes/gram of root that penetrated and invaded in the root system of cultivation using the technique of staining with fuchsin acid. The nematode was found on the basis of the seven days after inoculation (DDI) in the root system and the penetration increased by more than 100 % at 21 days. The location of the nematode was initially in the epidermal tissue and from the 21 DDI is found around the vascular system of the plant. Immature female is found from the 14 DDI, which coincided with the presence of the first galled (< 2 mm).

Key words: *Nacobbus aberrans*, staining fuchsine acid, invasion, galled

¹ Tesista

² Director

3.3. INTRODUCCIÓN

Nacobbus aberrans es un fitoparásito de importancia agrícola con una gran heterogeneidad morfológica, alta capacidad reproductiva y amplio rango de hospedantes, que se distribuye ampliamente en las regiones tropicales y templadas del continente Americano parasitando a más de 40 géneros vegetales (Atkins *et al.*, 2005, Manzanilla-López, 2010). Ocasiona pérdidas económicas en la producción de hortalizas de importancia alimenticia como: jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), chile (*Capsicum annum* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), entre otras (Zamudio., 1990). Los estadios J2 y las hembras jóvenes son estadios infectivos (Clark, 1967; Cid del Prado, 1985; Cristóbal *et al.*, 2001; Manzanilla-López *et al.*, 2002), éstos tienen la capacidad de entrar y salir de la raíz, así como de moverse entre las células de la corteza dentro de las raíces y causar severos daños a las plantas hospedantes, induciendo una serie de cambios estructurales, químicos y fisiológicos que tienen como resultado modificaciones celulares e histológicas en las raíces afectadas (Manzanilla-López *et al.*, 2002).

El grupo de nematodos de mayor importancia económica son los endoparásitos sedentarios, que incluyen los nematodos enquistados y los agalladores. Ambos grupos establecen interacciones complejas con sus hospedantes. El establecimiento exitoso y el mantenimiento de los sitios especializados de alimentación son esenciales para cumplir con las exigencias nutrimentales del nematodo, ya que estos sitios contienen altos niveles de proteínas locales, aminoácidos, lípidos, ADN y azúcares, que los hacen un sustrato adecuado para estos organismos y otros patógenos (Moroz y Hussey, 1996). Los síntomas característicos de las plantas infectadas son la reducción del crecimiento, clorosis del follaje, marchitez súbita y reducción en el rendimiento (Cid del Prado, *et al.*, 1996). Sin embargo, el síntoma más peculiar es la formación de agallas en las raíces; en general son pequeñas y separadas unas de otras a manera de cuenta de rosario (Franco-Navarro, 2005).

Se reportan severas alteraciones inducidas por *N. aberrans* en el sistema radical de plantas de remolacha (*Beta vulgaris* L.) en Nebraska, Estados Unidos,

causando pérdidas del 27-75 % en su peso (Inserra *et al.*, 1984). Así como pérdidas del 65% del rendimiento en cultivos de papa, en la región Andina de América Latina, del 55 % y 36 % en jitomate y frijol en México, respectivamente (Cristóbal *et al.*, 2000; Manzanilla-López *et al.*, 2002). Santa Cruz y Marbán (1986), reportaron pérdidas en el rendimiento en el cultivo de amaranto del 10-14 %.

Es clara la importancia de este fitonematodo en la agricultura nacional e internacional, por lo que cualquier esfuerzo que proporcione información útil y confiable para un mejor entendimiento de la interacción planta-nematodo en un sistema agrícola, justifica la implementación de metodologías prácticas que den respuesta a problemas reales en el área de la fitonematología, ya que actualmente no se cuenta con este tipo de información en donde se involucre la interacción jitomate-*N. aberrans*. La presente investigación tuvo como objetivo detallar y ampliar la información disponible para una mejor comprensión y entendimiento de *N. aberrans* en una relación parasítica compatible, cuantificando los juveniles de *N. aberrans* en el sistema radical de jitomate cv rio grande.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1 Material vegetal

Se utilizó el genotipo de jitomate Río Grande (*Solanum lycopersicum*) por ser uno de los más susceptibles al nematodo. Las semillas se sembraron en charolas de unicel de 200 cavidades con sustrato peat-moss (Kekkila®), después de 30 días de emergidas se trasplantaron en macetas de 150 cm³ de capacidad con sustrato tezontle-agrolita (relación 1:1), inoculadas con un gramo de raíz agallada, 15000 huevos y 1200 juveniles del nematodo. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero (28 ± 3°C, 13 horas de luz y 40 % de humedad relativa en promedio) durante 28 días.

3.4.2. Extracción del Nematodo

Se utilizaron agallas, huevos y juveniles de *N. aberrans* obtenidos de raíces de jitomate recolectadas en invernaderos del campo experimental agrícola “San Martín” de la Universidad Autónoma Chapingo. Las raíces agalladas se fraccionaron, lavaron y desinfestaron con cloro al 2 %, una parte de estas se usaron como inóculo y la otra para la extracción de huevos. Los huevos se extrajeron mediante la técnica de tamizado de Cobb, (1918) (Apéndice 1), y los juveniles por lavado en la cámara nebulizadora (Figura 2).

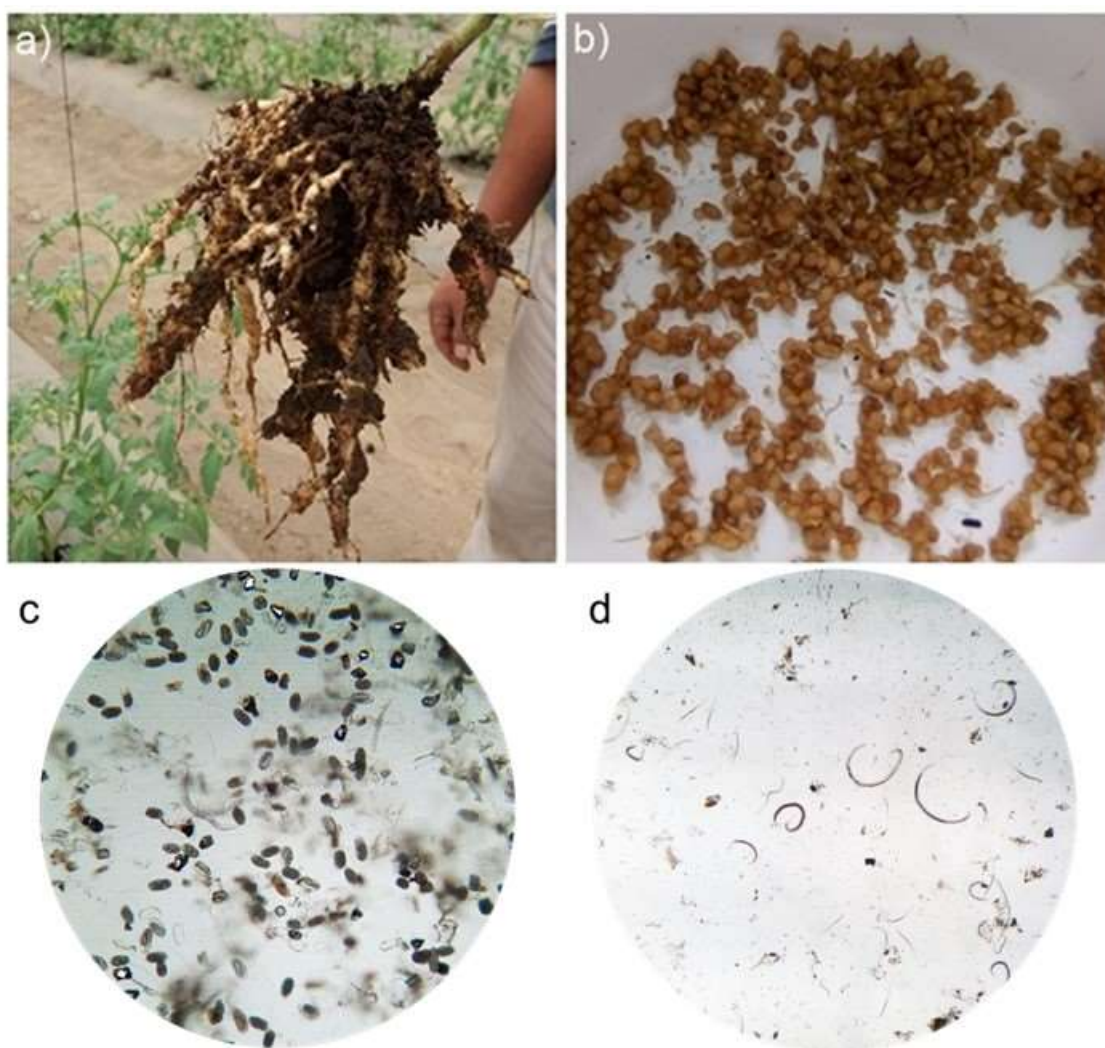


Figura 2. Obtención de inóculo y proceso de extracción. A) Plantas de jitomate agalladas con *N. aberrans*. B) Agallas con *N. aberrans* como fuente de inóculo. C) Huevos extraídos por tamizado de Cobb. D) Juveniles de *N. aberrans*.

3.4.4. Inoculación y muestreo

La inoculación se efectuó en dos momentos, primero se colocó un gramo de raíz agallada y 15000 huevos directamente al sustrato ocho días antes del trasplante, y posteriormente se inocularon 1200 juveniles al cuello de la planta al momento del trasplante, y se mantuvieron en condiciones de invernadero (Figura 3).



Figura 3. Inoculación. A) Colocación de raíz agallada en sustrato antes del trasplante. B) Inoculación de juveniles al momento del trasplante.

Se extrajeron raíces de las plantas inoculadas a los 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación (DDI) para efectuar la búsqueda y conteo de juveniles dentro de las raíces analizadas.

3.4.5 Tinción y análisis de raíces inoculadas

Las raíces se enjuagaron con agua de la llave para eliminar residuos de sustrato y otros materiales. Se tiñeron con fucsina ácida usando la metodología de Hussey y Barker (1978) con modificaciones, que se describe a continuación (**Figura 4**):

- 1) Las raíces se clarificaron con una solución de cloro al 2 % durante 4 minutos, con agitación discontinua.
- 2) Se enjuagaron en agua corriente por 45 s y se dejaron en agua durante 15 minutos para eliminar excesos de cloro.

- 3) Las raíces se secaron y colocaron en una solución de fucsina ácida (40 mL de agua + 1 mL de la solución Stock de fucsina ácida), y se hirvió durante 30 segundos para su tinción.
- 4) Pasado el tiempo de tinción, se drenó la solución y las raíces se transfirieron a una solución de 25 mL de glicerol acidificado con ácido láctico, para eliminar excesos de fucsina.



Figura 4. Procedimiento general para la tinción de raíces de jitomate infectadas con *N. aberrans*.

Con la ayuda de un microscopio compuesto a 10X (Olympus, modelo CX31) se hizo la búsqueda y cuantificación de juveniles en un gramo de raíces teñidas para cada tiempo de muestreo. Los valores obtenidos se analizaron y compararon gráficamente.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.5.1. Búsqueda y cuantificación de *N. aberrans* en el sistema radical

Con el propósito de conocer el porcentaje de eclosión de huevos del nematodo, se hizo una prueba de incubación a 28 °C durante 72 horas. Esto con la finalidad de conocer los posibles juveniles que se tendrían en el sustrato al momento de efectuar el trasplante del cultivo y garantizar la infección del mismo con el nematodo al hacer la inoculación de los huevos en las macetas.

En el Cuadro 2 se observa que la eclosión de huevos de *N. aberrans* es muy bajo, menos del 3 %, posiblemente como resultado de la falta de oxigenación, tal y como lo explican Perry y Tovar-Soto (2012), que la falta de oxígeno afecta la eclosión de huevos al provocar la detención del desarrollo embrionario (diapausa), es decir, la falta de O₂ en suelos saturados de agua retarda o incluso reduce la salida de los juveniles de las masas de huevo, como consecuencia de la detención del desarrollo en un estadio L₁ temprano (quiescencia).

Cuadro 2. Porcentaje de eclosión de huevos sometidos a incubación (28 °C) durante 72 horas.

Tubo	Huevos totales	Juveniles emergidos	% de Eclosión
1	308,400	2520	0.8
2	420,400	6264	1.5
3	124,416	3384	2.8
4	399,168	4680	1.2

El número de juveniles encontrados en el sistema radical de jitomate incremento a través del tiempo, encontrándose la mayor cantidad de este a los 21 días después de la inoculación (DDI) (Figura 4), debido a que durante ese periodo el nematodo reduce su actividad glandular y pudiese entrar en quiescencia y diapausa (Manzanilla-López *et al.*, 2002). Los primeros juveniles se observaron a partir de los siete DDI con 56 juveniles/gramo de raíz (Figura 5),

similar a los resultados de Méndez-Inocencio, 2013 (datos no publicados) quien detecto el ingreso del nematodo a los 2 DDI., en raíces de chile Yolo Wonder®.

Los juveniles en el sistema radical de jitomate, se localizaron principalmente en tejido epidérmico, lo cual aprovechan para asegurar su existencia en el hospedante, ya que con su estilete perforan la pared celular y así alcanzan la membrana plasmáticas de las células y forman tubos de alimentación (Zinoveva *et al.*, 2004)

A partir de los 14 DDI, el nematodo se encontró principalmente cerca del tejido vascular, ya que este es la principal fuente de obtención de alimento para el nematodo (Moroz y Husseyb, 1996) similar a lo reportador por Chavarro *et al.* (2017) en raíces de chile tipo Huacle. También, se observaron las primeras agallas, las cuales presentaban menos de 2 mm de diámetro. Algo similar a lo detectado por Inserra *et al.*, (1983) quienes encontraron los primeros sitios de alimentación hasta los 25 DDI en remolacha, sin embargo Castillo y Marbán (1984), detectaron los sitios de alimentación a los 30 días después de la penetración de *N. aberrans* en raíces de *Capsicum annuum* y *C. baccatum* y los asociaron con hembras jóvenes localizadas en el cilindro central. Estas diferencias podría asociarse a las condiciones ambientales, principalmente temperatura, lo que implica un retraso en el ciclo de vida del nematodo y por tanto un retraso en la formación de los sincitios.

A los 21 DDI, los juveniles de *Nacobbus aberrans* adoptaron una forma de “C” o espiral, similar a lo observado por Villar-Luna *et al.* (2015) en raíces de chile CM334, siendo esta una característica de los juveniles del tercer estadio (J₃) (Figura 6).

A los 28 DDI, ya no se encontraron juveniles, pero si hembras en las agallas de las raíces analizadas, predominando de 1-2 hembras por agalla (Figura 6).

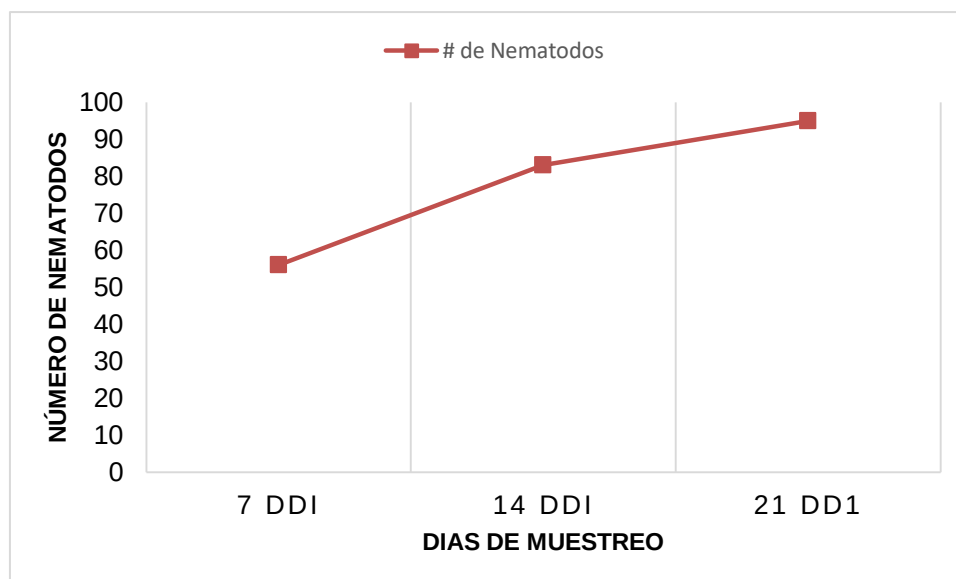


Figura 5. Desarrollo de *Nacobbus aberrans* en Jitomate. Se muestra el porcentaje de los nematodos dentro del sistema radical a los diferentes días después de la inoculación con *N. aberrans* (Promedio de 1 gramo de raíz inoculadas con 1200 J₂).

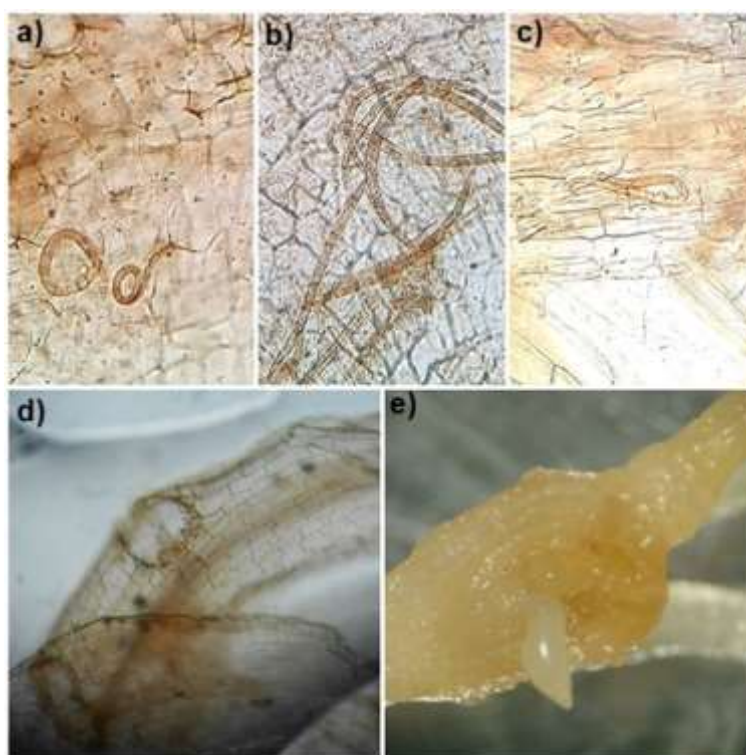


Figura 6. Proceso de infección de *Nacobbus aberrans*. A) Juveniles del nematodo a los 7 DDI. B) Masa de juveniles a los 14 DDI. C) Juveniles en el tejido vascular a los 21 DDI. D y E) Agallas y hembra del nematodo en raíces de jitomate a los 28 DDI.

3.6 CONCLUSIONES

- Se demostró la interacción compatible en el sistema jitomate-*Nacobbus aberrans* observándose el desarrollo del ciclo completo del nematodo.
-
- El ingreso del nematodo ocurrió a partir de los siete días después de la inoculación, y la formación de agallas fue visible a partir de los 14 DDI.
-
- El número de nematodos en el sistema radical del cultivo incrementa con el tiempo.

3.7 LITERATURA CITADA

- Atkins, S. D., R. H. Manzanilla-López, J. Franco, B. Peteira, and B. R. Kerry. (2005).** A molecular diagnostic method for detecting *Nacobbus* in soil and in potato tubers. *Nematology* 7(2):193-202.
- Castillo, P. G, y N. Marbán-Medoza M. (1984).** Histopatología y desarrollo de *Nacobbus aberrans* Thorne y Allen 1944 en raíces de *Capsicum annuum* y *C. baccatum*. *Agrociencia* 56:85-93.
- Chavarro-Carrero, E. A., G. Valdovinos-Ponce, O. Gómez-Rodríguez, C. Nava-Díaz, V. H. Aguilar-Rincón, y E. Valadez- Moctezuma. (2017).** Respuesta de la línea 35-3 de chile tipo huacle (*Capsicum annuum*) a dos poblaciones de *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 47:74-85.
- Cid del P. V. I. (1985).** Ciclo de vida de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1994. Pp. 57-65. *In:* Marban, N. T., Tomson, J. I. (eds). *Fitonematología Avanzada I*. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. México
- Cid del Prado, V., I., K. Evans, L. R. H., Manzanilla, J. C. Cristóbal y A. G. E. Franco. (1996).** Evaluación de algunas estrategias para el manejo de *Nacobbus aberrans* en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. Resumen. Congreso Nacional de Fitopatología, Guadalajara, Jalisco, México.
- Clark, S. A. (1967).** The development and lite history of the false root-knot nematode, *Nacobbus serendipiticus*. *Nematropica* 13: 91-101.
- Cobb, N. A. (1918).** Estimating the nema population of the soil. *Agric. Tech. Circ.* I. Bur. Plant, Industr. U. S. Depart. Agric. 48p.
- Cristóbal, A. J., V. I. Cid del Prado, L. R. H. Manzanilla, M. N. Marbán, A. G. Mora y G. P. Sánchez. (2001).** Sobrevivencia de estadios biológicos de *Nacobbus aberrans* en condiciones de campo. *Nematropica* Vol. 31(2): 227-233.
- Cristóbal-Alejo, J., I. V. Cid del Prado, R.H. Manzanilla-López, N. Marbán-Mendoza, G. Mora-Aguilera, and P. Sánchez-García. (2000).** Area under

- the progress curve of root-knot disease in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) caused by *Nacobbus aberrans*. *Nematropica* 30:120.
- Franco-Navarro F. (2005).** Nematodos fitopatógenos de mayor importancia. pp 207-231 *In*: Producción de tomate en invernadero. Alvarado L. J.; N. Bautista M. y R. Bárcena G. (eds). Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. México. 233 p.
- Hussey, R. S. and K. R. Barker. (1978).** Plant Dis. Reprtr 57: 1025-1028.
- Inserra, R. N., M. Di Vito, and H. Ferris. (1984).** Influence of *Nacobbus aberrans* Densities on Growth of Sugarbeet and Kochia in Pots. *Journal of Nematology* 16(4):393-395.
- Inserra, R. N., N. Vovlas, G. D. Griffin, and J. L. Anderson. (1983).** Development of the false rootknot nematode, *Nacobbus aberrans*, on sugar beet. *Journal of Nematology* 15:288-296.
- Inserra, R. N., N. Vovlas, G. D. Griffin, and J. L. Anderson. (1983).** Development of the false rootknot nematode, *Nacobbus aberrans*, on sugar beet. *Journal of Nematology* 15:288-296.
- Manzanilla-López, R. H. (2010).** Speciation within *Nacobbus*: consilience or controversy *Nematology* 12(3):321-334.
- Manzanilla-López, R. H., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R. N., Lehman, P. S., Cid Del Prado, V. I., Souza, R. M. and Evans, K. (2002).** The genus *Nacobbus* Thorne and Alien, 1944 (Nematode: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32: 209 - 232.
- Méndez-Inocencio, C. (2013).** *Arabidopsis thaliana* Un modelo en el estudio de expresión de los genes *C011*, *PDF1.2* y *PR2* en la interacción compatible e incompatible con *Nacobbus aberrans*. Tesis de Doctorado en ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, México. 56pp.
- Moroz V. W. y Husseyb R. S. (1996).** Nematode Pathogenesis and Resistance in Plants. *The Plant Cell*. 1735-1745.
- Perry, N. R. and Tovar-Soto, A. (2012).** Biology and host-parasite interactions. Pp. 1-20 *In* R. H. Manzanilla-López and N. Marbán-Mendoza (eds.). *Practical Plant Nematology*. Guadalajara, México. Mundi-Prensa, Colegio de Postgraduados.
- Santa Cruz, V. H., y M. N. Marbán. (1986).** Respuesta del cultivo de alegría *Amaranthus hypochondriacus* a niveles iniciales de infestación del nematodo *Nacobbus aberrans*. Pp. 193-203. *In*: El amaranto *Amaranthus spp.* (Alegría) su cultivo y aprovechamiento. Chapingo, México.
- Villar-Luna, H., B. Reyes-Trejo, O. Gómez-Rodríguez, E. Villar-Luna y E. Zavaleta-Mejía. (2015).** Expresión de genes de defensa y acumulación de capsidiol en la interacción compatible chile CM334/*Nacobbus aberrans* e incompatible chile CM334/*Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 45:9-19.
- Zamudio G. V. (1990).** Gama de hospedantes y evaluación del daño de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1994, en hortalizas comerciales. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 8:9-12.
- Zinoveva SV, Vasyukova NI, Ozeretskovskaya OL. (2004).** Biochemical Aspects of Plant Interactions with Phytoparasitic Nematodes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 40:111-119.

4. Capítulo IV. EXPRESIÓN DE GENES DE PROTEINAS RELACIONADAS A PATOGENESIS (PR) EN PLATULAS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L) INOCULADAS CON *Nacobbus aberrans*.

GENE EXPRESSION OF PROTEINS RELATED TO THE PATHOGENESIS (PRs) IN PLANTS OF TOMATO (*Solanum lycopersicum* L) INOCULATED WITH *Nacobbus aberrans*

Aldo Guadalupe **Bustamante-Ortiz**¹ y Nahúm **Marban-Mendoza**²

4.1. Resumen

Los mecanismos de defensa inducida se activan como respuesta al ataque de un patógeno y están involucrados en cambios en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. El objetivo de este trabajo fue estimar mediante PCR la expresión de los genes de defensa PAL, PR42, PR52, GLU, POX, en la interacción *Solanum esculentum* / *N. aberrans* en hoja y raíz a diferentes tiempos después de la inoculación. Plantas control e inoculadas con un gramo de agallas, 15000 huevos y 1200 juveniles de *N. aberrans* fueron recolectadas y se extrajo RNA de raíz y hoja a los 2, 7, 14, 21 y 28 ddi. Posteriormente, se sintetizó cDNA a partir del RNA y se realizaron amplificaciones de los genes de defensa indicados, estos fueron visualizados por electroforesis. Los cinco genes de defensa evaluados se expresaron en las muestras de raíz inoculadas con el nematodo; pero en las hojas se expresaron todos a excepción del gen POX. Los diferentes niveles de expresión observados en raíces y en hojas se deben a que estos genes se encuentran regulados en diferentes órganos de la planta, pero además, sus niveles de expresión pueden estar en niveles basales en tejidos no infectados.

Palabras claves: *Nacobbus aberrans*, PCR, Fenilalanina Amonio Liasa, Peroxidasa, PR52.

4.2 Abstract

The defense mechanisms induced are activated as response to the attack of a pathogen and are involved in changes in metabolism caused by the differential expression of genes. The objective of this work was to estimate by PCR the expression of the genes of defense PAL, PR42, PR52, GLU, POX, in interaction *Solanum esculentum* / *N. aberrans* in leaf and root at different times after inoculation. Control plants and inoculated with a gram of galls, 15000 eggs and 1200 juveniles of *N. aberrans* were collected and extracted root and leaf RNA at 2, 7, 14, 21 and 28 ddi. Subsequently, CDNA was synthesized from RNA and amplifications were made of the genes of defense indicated, these were visualized by electrophoresis. The five defense genes evaluated were expressed in root samples inoculated with the nematode; but in the leaves are expressed four with the exception of the gene POX. The different levels of expression observed in roots and leaves are due to the fact that these genes are regulated in different organs of the plant, but also their levels of expression can be in basal levels in tissues not infected.

Key words: *Nacobbus aberrans*, PCR, phenylalanine ammonium lyase, peroxidase, PR52.

¹ Tesista

² Director

4.3. INTRODUCCIÓN

Debido a la constante interacción y coevolución con los patógenos, las plantas fueron capaces de generar un amplio repertorio de mecanismos de defensas, mismos que les permite reconocer, detener y contrarrestar alguna infección (Heath, 2000). Los mecanismos de resistencia constitutiva o preformada se pueden dividir en mecanismos estructurales constitutivos, por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y mecanismos químicos constitutivos, tales como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales (Osbourne, 1996). Los mecanismos de defensa inducida se activan como respuesta al ataque de un patógeno (Collinge *et al.*, 1994) y están involucrados cambios en el metabolismo provocados por la expresión diferencial de genes. Algunos ejemplos de lo descrito anteriormente son barreras físicas, refuerzo de la pared celular, reacciones hipersensibles, repelentes, supresión de nutrientes esenciales en el sitio de ataque, inhibición de enzimas digestivas del insecto, producción de sustancias que provocan daño físico al insecto, disminución de la palatabilidad, entre otras. En interacciones compatibles patógeno-hospedante, las modificaciones en la expresión génica de las células de la raíz provocan una respuesta lenta y débil de los mecanismos de defensa de la planta mencionados anteriormente (Gheysen y Fenoll, 2002). En una interacción incompatible estas respuestas se caracterizan por ser rápidas y de mayor intensidad (Williamson y Hussey, 1996; Gheysen y Fenoll, 2002). Se ha demostrado que infecciones por nematodos enquistadores y agalladores, llevan a cabo una serie de cambios en la arquitectura de la pared celular e inducir sitios especializados de alimentación durante el desarrollo de células gigantes o sincitios (Goverse *et al.*, 2000), como respuesta metabólica a la alteración y o cambios en la expresión génica de las células hospedantes (Williamson y Hussey, 1996; Williamson y Gleason, 2003; Abad *et al.*, 2009). También se ha reportado la inducción de una sobre o subexpresión de genes que codifican proteínas relacionadas a la patogénesis (Williamson y Gleason, 2003; Goellner *et al.*, 2001 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Funciones de algunas Proteínas relacionadas a patogénesis

Proteína	TIPO	FUNCIÓN	Ejemplo
PR2*: β-1,3 Glucanasa	Las β-1,3 Glucanasas son proteínas relacionadas con la patogénesis y están ampliamente distribuidas en distintas especies de plantas (Van Loon, 1999). Son codificadas por una familia multigenica y son producidas como proteínas con un péptido señal N terminal hidrofóbico, removido contraduccionalmente y un extremo C-terminal N-glicosilado en un solo sitio (Leubner-Metzger y Meins, 1999)	► Capaces de realizar cortes hidrolíticos endógenos en los enlaces β-1,3 glucasídicos de los β-1,3 glucanasa que es el mayor componente de la pared celular de los oomicetos (Ebrahim <i>et al.</i>, 2011). ► Median la respuesta de las plantas a través de la liberación de fragmentos de glucanos de la pared celular del patógeno o la planta, la cual funciona como elicitores, activando otras respuestas de defensa de la planta (Takeuchi <i>et al.</i>, 1990)	Diversos autores (Stintzi <i>et al.</i> , 1993; Leubner-Metzger y Meins, 1999) encontraron que las proteínas de la clase I (aproximadamente de 33 kDa) son proteínas básicas localizadas en la vacuola, mientras que las de la clase II y III (aproximadamente de 34 a 36 kDa) son proteínas ácidas secretadas en los espacios extracelulares y que no contienen el extremo C-terminal presente en las de la clase I.
PR4* Quitinasas	Polímero de Nacetilglucosamina (β 1.4-acetamida-D-glucosa), es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Richard <i>et al.</i> , 2006)	► Procesos de muda de insectos (Ebrahim <i>et al.</i>, 2011) y digestión de alimentos quitinosos, es una enzima potencialmente defensiva contra patógenos quitinosos (Trudel, 1989) ► Los oligómeros de quitina y el quitosano (quitina con baja acetilación) tienen actividades antitumorales, inmunoreguladoras, antibacterianas y antifúngicas (Shang <i>et al.</i>, 2004)	Dao <i>et al.</i> , 2004 utilizaron este polímero para remover un amplio intervalo de compuestos tóxicos como metales pesados y colorantes.
PR-5*: Thaumatina	Proteína tipo taumatina, osmotina, zeamatina, permeatina, similar a inhibidores alfa-amilasa/tripsina	► Función antifúngica, con mecanismo de acción como permeabilizadores de membrana (osmositinas y permetinas) unión e hidrólisis de glucanos y apoptosis. (Leung <i>et al.</i> , 2011).	Fagoaga <i>et al.</i> , 2001 encontraron PR-5 de tabaco constitutivamente expresada en plantas transgénicas de <i>Citrus sinensis</i> (Naranja) confiere resistencia <i>P. citrophthora</i> .
PR-9/POX*: Peroxidasa	Glicoproteínas que contienen un grupo hemo (Gómez-Vásquez <i>et</i>	► Catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos orgánicos e	Do <i>et al.</i> , 2003 reportaron en la interacción incompatible chile cv.

	<i>al.</i>, 2004) ampliamente distribuida tanto en el ambiente intra como extra celular.	inorgánicos por acción del peróxido de hidrogeno (H₂O₂) (Monties 1989). ► Contribuyen al control de la fotorespiración, a la respuesta de diferentes tipos de estrés, la biosíntesis y deposición de materiales que engrosan la pared celular como lignina, suberina y extensina, entre otros (Passardi <i>et al.</i>, 2005; Van Loon <i>et al.</i>, 1999). ► Entrecruzamiento de polisacáridos de la pared celular, oxidación del ácido indolacético, regulación de la elongación celular, oxidación de fenoles ligados al crecimiento (Yoshida <i>et al.</i>, 2003). ► Participación en la biosíntesis de etileno, cicatrización (McInnis <i>et al.</i>, 2006).	Hanbyul-<i>P capsici</i> (aislamiento CB178.26) un incremento fuerte del gen <i>CAPO1</i> que codifica para una peroxidasa, en comparación con la interacción compatible chile cv. Hanbyul-<i>P capsici</i> (aislamiento S197) la cual solo mostro una ligera expresión de dicho gen.
PAL* Fenilalanina amonio-liasa	Enzima de origen vegetal, pertenece a la clase de las liasas (Lange <i>et al.</i>, 2005)	► Precursora de la mayoría de los compuestos fenólicos (FEN), entre ellos las fitoalexina, lignina, suberina, flavonoides (Dixon y Harrison, 1991), cuya síntesis y acumulación es parte estratégica desarrollada por las plantas para evitar la infección del patógeno (Espinosa, 2004) ► Cataliza la diseminación de la L-fenilalanina para producir ácido transcinámico y amonio, reacción que constituye el primer paso en la biosíntesis de los fenilpropanoides en plantas superiores (Lister <i>et al.</i>, 1996; Casañal <i>et al.</i>, 2013)	La síntesis de estas substancias se relaciona con el nivel de resistencia genética de la papa al oomiceto (Andreu <i>et al.</i>, 2000).

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1 Material vegetal

El material vegetal empleado en el análisis de expresión génica fueron raíces y hojas de al menos 5 plántulas de jitomate inoculadas y plantas control (no inoculadas) con *N. aberrans* en 5 tiempos distintos de muestreos a los 2, 7, 14, 21 y 28 DDI. Las muestras fueron enjuagadas con abundante agua estéril, desechando el exceso de residuo del sustrato (Cuadro 4).

Cuadro 4. Muestras vegetales utilizadas en la investigación.

Muestra	Concepto
2CR1	2 días después de inocular control Raíz
2TR1	2 días después de inocular tratamiento Raíz
7CR1	7 días después de inocular control Raíz
7TR1	7 días después de inocular tratamiento Raíz
14CR1	14 días después de inocular control Raíz
14TR1	14 días después de inocular tratamiento Raíz
21CR1	21 días después de inocular control Raíz
21TR1	21 días después de inocular tratamiento Raíz
28CR1	28 días después de inocular control Raíz
28TR1	28 días después de inocular tratamiento Raíz
2CH1	2 días después de inocular control Hoja
2TH1	2 días después de inocular tratamiento Hoja
7CH1	7 días después de inocular control Hoja
7TH1	7 días después de inocular tratamiento Hoja
14CH1	14 días después de inocular control Hoja
14TH1	14 días después de inocular tratamiento Hoja
21CH1	21 días después de inocular control Hoja
21TH1	21 días después de inocular tratamiento Hoja
28CH1	28 días después de inocular control Hoja
28TH1	28 días después de inocular tratamiento Hoja

4.4.2 Extracción de RNA

Se purificó RNA total de las 20 muestras utilizando el protocolo de extracción de RNA (Maxwell® 16 Total RNA Purification Kit PROMEGA). Se pesaron 100 mg de tejido vegetal, en el caso de las raíces se tomaron muestras de las zonas infectadas (agallas), y se maceró con nitrógeno líquido en morteros previamente esterilizados y congelados y se trasladaron a tubos de 2 mL, se adicionaron 700

μL de buffer de lisis (previamente suplementado con β-mercaptoetanol 10 μL/ml) y se mezclaron los tubos por inversión unos segundos. Posteriormente se agregaron 835 μL de buffer azul de dilución de RNA, se mezclaron los tubos por inversión durante 15 segundos una vez más. Se preparó la solución Clearing Agent colocándola en un vortex durante 2 minutos, posteriormente se adicionaron 135 μL de esta solución a cada tubo, se mezcló perfectamente en un vortex cada tubo por 30 segundos. Se incubaron en un termoblock Labnet D-1200 a temperatura estable de 70 °C durante 3 minutos, finalizado el tiempo se mezcló nuevamente cada tubo por 30 segundos en un vortex (Mixer VM-300, Mel de México). Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Concluido el tiempo de incubación se colocaron en la columna provista por el mismo kit, se centrifugaron en una minicentrífuga 5415D (Eppendorf Centrifuge, Labnet, USA) a 12,000 gravedades durante 2 minutos y se transfirió el líquido recolectado a los cartuchos de extracción. Se colocaron los cartuchos de extracción en el equipo, en el pozo número 1 se colocó la muestra obtenida de la centrifugación y se colocó un tubo recolector con 150 μL de agua libre de nucleasas (ALN) para obtener el RNA total después de 34 minutos de actividad del equipo (Maxwell® 16 PROMEGA).

4.4.3 Síntesis de cDNA

Para la síntesis de DNA complementario (cDNA), una vez que se obtuvo el RNA en cantidad y calidad adecuada, se utilizó el kit de Thermo Scientific (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit). En un tubo Eppendorf estéril libre de nucleasas se preparó una mezcla con 1 μL del primer Oligo (dT)₁₈, 10 μL de RNA de cada muestra y 1 μL de agua libre de nucleasas y se incubaron a 65 °C por 5 min en un termoblock Labnet D-1200. Después se incubaron 5 min en hielo, se centrifugaron en la minicentrífuga (Eppendorf Centrifuge, Labnet, USA) unos segundos para concentrar el volumen y se le añadieron 4 μL de Buffer Reaction (5X), 1 μL de RiboLock RNase Inhibitor (20 U/μL), 2 μL de dNTP Mix (10 mM), 1 μL de RevertAid M-MuLV RT (200 U/μL) para un volumen final de 20 μL. Se

incubó por 60 min a 42 °C en el termoblock y se terminó la reacción calentando a 70 °C durante 5 min.

4.4.4 Determinación de la calidad de RNA y cDNA

Para corroborar la calidad e integridad del RNA extraído y cDNA sintetizado se cargaron 2 µL de la muestra stock de cada uno previamente mezclados con 3 µL de buffer de carga en geles de acrilamida al 8% y corridas a 230V en una cámara dual de electroforesis vertical (C.B.S. Scientific CO® modelo MVG-216-33) con una fuente de poder E-C (Apparatus Vorporations®, EC-105). El tiempo de corrida fue de 1.4 h. Posteriormente el gel fue desmontado y se colocó en bandejas para su revelado. Este proceso se realizó en agitación constante; primeramente, se colocó en solución fijadora (etanol 10 %, ácido acético 1 %) durante 20 min posteriormente fue retirada y sumergirlo en la segunda solución, la tinción de plata (nitrato de plata 0.2 %) por 15 min, antes de que se llevara a la última solución se realizó un enjuague con agua destilada y finalmente se aplicó una solución reveladora (Hidróxido de sodio 3 %) más formaldehído (100 µL por cada 100 mL de NaOH) durante 15 min. El gel se secó a temperatura ambiente y se fotodocumentó con una cámara fotográfica Nikon COOLPIX S2700 y un transluminador de luz blanca.

4.4.5 Cuantificación de RNA y cDNA

La cuantificación del RNA y cDNA se realizó por espectrofotometría con absorbancia de luz UV a una longitud de onda de 260 nm y 230 nm en un Espectrofotómetro NanoDrop® (ND 1000 V.3.5.2 Thermo Scientific, USA) utilizando 2 µL de la muestra stock.

4.4.6 Detección de genes de Proteínas Relacionadas a Patogénesis

4.4.6.1 Dilución del cDNA

Se ajustó la concentración de las muestras a 20 ng/µL en un volumen final de 100 µL, para lo cual se utilizó la fórmula: $C_i V_i = C_f V_f$, donde: C_i = concentración inicial, V_i = volumen inicial, C_f = concentración final y V_f = volumen final.

4.4.6.2 Estandarización de condiciones de la PCR

Para determinar la T_m de los oligonucleótidos, se realizó un gradiente de temperatura utilizando 12 muestras, seis muestras control y seis muestras inoculadas con el nematodo tomadas de los tiempos 2 DDI, 14 DDI y 28 DDI. Para tener un mayor rango de comportamiento, esta prueba consistió en una PCR punto final a temperaturas de alineamiento de 50, 50.9, 51.6, 53.6, 55.8, 58, 59, 60.9, 62.6, 64.1, 64.5 y 65 °C. La mezcla que se utilizó fue de 2.5 µL Taq buffer 5X (Promega®), 1.25 µL $MgCl_2$ (1mM), 2.5 µL dNTPs (1mM), 1.25 µL de cada Primer 12.5 pM), 0.15 µL Taq DNA polimerasa (5U/µL) (Promega®), 4 µL cDNA y 0.1 µL agua HPLC para un volumen final de 13 µL (Cuadro 5). La PCR se llevó a cabo en un termociclador MaxyGene Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA), bajo las siguientes condiciones: un primer ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificación [1 min a 94 °C para desnaturalización, 1 min con un gradiente de temperatura de 50 a 60 °C para alineamiento y 1:30 min a 72 °C para extensión] concluyendo con un ciclo final a 72 °C durante 5 min para la extensión final. Los productos obtenidos se conservaron a 4 °C para sus posteriores análisis.

Cuadro 5. Condiciones de mezcla de PCR para la amplificación de fragmentos de PR con gradiente de temperatura.

Reactivos	[Stock]	[Final]	Volumen Final x 1 reacción (µL)
GoTaq Buffer	5X	1x	2.5 µL
$MgCl_2$	1mM	2.5 mM	1.25 µL
DNTPs	1mM	200 µM	2.5 µL
Primer Forward	10pM	20 pM	1.25 µL
Primer Reverse	10pM	20 pM	1.25 µL
GoTaq DNA Polymerase*	5U/µl	1.5U	0.15 µL
cDNA	20 ng/µl	80ng	4 µL
Agua HPLC	-	-	0.1 µL
Volumen total			13 µL

*Se utilizó la Taq ADN Polymerase 5000 U, así como su buffer y $MgCl_2$.

4.4.6.3 Selección de Primer Oligonucleótidos

A partir de los productos obtenidos anteriormente respecto a la temperatura de alineamientos, se procedió a seleccionar cinco oligonucleótidos (Cuadro 6) de un total de 13 que codifican para proteínas PRs de las familias PR-1, PR-2, PR-3, PR-4, PR-5, PR-9, PR-10, PR-12, PR-14.

Cuadro 6 Oligonucleótidos usados para analizar la expresión de genes relacionados con la defensa en platas de jitomate cv Rio Grande inoculadas con *Nacobbus aberrans*.

PROTEÍNA	Nom*	Secuencias 5'-----3'	Temp ¹	Longitud fragmento
PR 1 ^a	1 ^a	[F] AAT-ATC-CCA-CTC-TTG-CCG [R] CCT-GGA-GGA-TCA-TAG-TTG	54	165pb
PR 1b	1b	[F] ATC-TCA-CTC-TTC-TCA-TGC [R] TAC-CTG-GAG-GAT-CAT-AGT	52	187pb
Acidic PR-P	Ap	[F] GGT-AGT-TGG-ACT-CCG-TCC-GC [R] TCG-TTT-TCA-CTC-GAA-GCA-CCA	64	112pb
Acidic PR-Q	Aq	[F] ATC-GGT-CGT-TGG-ACT-CCG-TC [R] GCC-TCA-TCA-CTT-AAA-AGC-GCC	64	334pb
Basic PR3	B3	[F] ATG-AGG-CTT-TGT-AAA-TTC [R] AGT-CGC-CGG-GGC-TAC-CTT-G	56	106pb
SAM22	Sm	[F] AGT-TAC-AGA-TGC-CGA-CAA-CG [R] CCT-CAA-TGG-CCT-TGA-AGA-GA	60	----
N1	N1	[F] ATG-GCT-AAG-TYT-GCT-TCY-ATC [R] TTA-ACA-TGG-GAM-GTA-RAG-ATG-CA	68	----
LTP1	L1	[F] TGG-TGT-GCA-TGG-CAG-CAG-TA [R] TCC-ATC-TTC-TCC-AAG-AAC-GCA	62	----
PAL2	P2	[F] CTT-TGT-CCT-ATA-TTG-CTG-GTT-TGC [R] TTC-TGA-GCT-ACC-TTC-ACA-TAA-GAG-C	70	385pb
PR42	42	[F] CCA-GAC-TAT-AAC-TAC-GCT-ACC-AAC-C [R] GTA-AAG-AAC-CTA-AGC-CAC-GAT-ACC	72	376pb
PR52	53	[F] AAA-CAA-AGG-TGC-CCT-AAT-GC [R] GAA-GGG-AGA-CAT-ACA-TAA-CAC-ACG	64	220pb
GLU	Gl	[F] CAC-CAA-CAT-TCA-CAT-AAC-AGA-GG [R] AGT-AAC-AGG-GCT-GAT-TTC-ATT-ACC	67	325pb
PRXD1	Dx	[F] GTT-GCT-AGA-GAT-GCA-GTT-GTG-G [R] CCC-GGT-GAA-ATT-GTA-TAG-ACG	64	255pb

Los productos de PCR amplificados fueron visualizados en electroforesis con geles de poliacrilamida al 8% (Cuadro 7) en una cámara dual C.B.S. (Scientific CO® modelo MVG-216-33) con buffer de corrida TBE 1x. Se utilizaron 5 µL de muestra mezclados con 3 µL de buffer de carga y se colocaron en cada pozo, se corrieron a 230 voltios por alrededor de 1.5 h. Posteriormente, los geles se tiñeron como se indicó anteriormente y se documentaron con una cámara fotográfica

Nikon COOOLPIX S2700 y un transiluminador de luz blanca. Se realizaron un total de 3 repeticiones de cada uno de los productos para obtener los primers a utilizar.

Cuadro 7. Reactivos para la preparación de geles de acrilamida 8 %

Preparación de mamila	1 gel	2 geles
Solución de acrilamida 30 % (acrilamida-bisacrilamida (29: 1))	13 mL	26 mL
Buffer TBE 5X	12 mL	24 mL
H ₂ O destilada estéril	35 mL	70 mL
APS 10 % (Persulfato de Amonio)	420 µL	840 µL
TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethane-1,2-diamine (Thermo Fisher Scientific))	35 µL	70 µL

4.4.6.4 Amplificación de genes relacionados con la defensa

La amplificación final de fragmentos con PCR se estandarizó para un volumen final de 25 µL, la mezcla que se utilizó fue de 5 µL Taq buffer 5X (Promega®), 2.5 µL MgCl₂ (1mM), 5 µL dNTPs (1mM), 2.5 µL de cada Primer 12.5 pM), 0.3 µL Taq DNA polimerasa (5U/µL) (Promega®), 5 µL cDNA y 2.2 µL agua HPLC (Cuadro 8). Las condiciones de termociclaje (MaxyGene Thermal Cyclor (Applied Biosystem, USA) fueron las siguientes: un primer ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de amplificación [1 min a 94 °C para desnaturalización, 1 min con un gradiente de temperatura de 55 °C para alineamiento y 1:30 min a 72 °C para extensión] concluyendo con un ciclo final a 72 °C durante 5 min para la extensión final (Figura 7). Los productos obtenidos se conservaron a 4 °C para sus posteriores análisis.

Cuadro 8. Condiciones de mezcla de PCR para la amplificación de genes de proteínas relacionadas a patogénesis

Reactivos	[Stock]	[Final]	Volumen Final x 1 reacción (µL)
GoTaq Buffer	5X	1x	5 µL
MgCl ₂	1mM	2.5 mM	2.5 µL
DNTPs	1mM	200 µM	5 µL
Primer Forward	10pM	20 pM	2.5 µL
Primer Reverse	10pM	20 pM	2.5 µL
GoTaq DNA Polymerase	5U/µl	1.5U	0.3 µL
cDNA	20 ng/µl	80ng	5 µL
Agua HPLC			2.2 µL
Volumen total			25 µL

*Se utilizó la Taq ADN Polymerase 5000 U, así como su buffer y MgCl₂.



Figura 7. Condiciones estandarizadas de termociclaje para la amplificación del gen PR a través de la técnica de PCR punto final.

4.4.6.5. Separación de fragmentos de PCR mediante Electroforesis.

Los productos obtenidos de la amplificación final se visualizaron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida 8 %, ya que de acuerdo con Valadez-Moctezuma y Kahl (2000), si se emplea esta concentración, se pueden observar fácilmente fragmentos que se encuentran en un rango de 200 pb a 2.5 kb. Se prepararon las placas, limpiando los cristales con etanol 70 % y papel Kim Wipes®. La preparación del gel se realizó bajo la campana de extracción y con utilización de material de protección (guantes) a una concentración final 8 % en

un aplicador de 100 mL (Cuadro 8). La poliacrilamida se vertió en las placas de cristales colocando enseguida un peine de 50 pozos y dejándolo polimerizar por al menos 30 minutos. Trascurrido el tiempo y ya gelificado el gel se colocaron ambas placas en la cámara dual C.B.S. (Scientific CO® modelo MVG-216-33) con una fuente de poder E-C (Apparatus Vorporations®, EC-105); se le añadió buffer de corrida TBE 1x y se cargaron 5 µL de muestra mezclados con 3 µL de buffer de carga en cada uno de los pozos. La electroforesis se corrió a 230 voltios por alrededor de 1.5 h, posteriormenete los geles se desmontaron y colocan en bandejas para su revelado. Posteriormente, se tiñeron como se indicó anteriormente y se secaron a temperatura ambiente para después fotodocumentarlos con una cámara fotográfica Nikon COOOLPIX S2700 y un transiluminador de luz blanca. El tamaño de los fragmentos generados se estimó por comparación de las muestras con los marcadores de peso molecular o *ladder* de 100 pb y 1 kb (Invitrogen), colocados cada uno en los 2 pozos de los extremos del gel en las imágenes digitalizadas mediante el Software Adobe Ilustrador CS4® (AI, 1987), se compararon las condiciones infestadas (nematodos) y no infestadas en ambos materiales vegetales en los diferentes tiempos (días de muestreo).

4.4.6.6 Estimación cualitativa de la cantidad de transcritos de genes PR.

Normalmente, la cuantificación de genes se realiza con la técnica de PCR tiempo real, que permite determinar con precisión el número de moléculas de interés presentes en la muestra. En esta investigación, solamente se realizó una estimación cualitativa de la expresión de los diferentes genes PR evaluados; para lo cual, se consideraron las mismas cantidades de tejido vegetal utilizado para la extracción de RNA, misma cantidad de RNA utilizada para la síntesis de cDNA, así como la misma cantidad de cDNA usada para PCR y para las muestra colocadas en los geles. Todas estas etapas se hicieron con el mayor cuidado con la idea de lograr observar de forma cualitativa la diferencia en expresión de los genes, a través del grosor de las bandas observadas en geles de acrilamida 8 %.

Siendo está una alternativa para sustituir momentáneamente lo que se debe hacer con PCR-tiempo real.

4.5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.5.1. Extracción de RNA y cDNA de muestras vegetales

El protocolo utilizado para la extracción del RNA de muestras vegetales fue efectivo, ya que permitió aislar exitosamente el RNA genómico. La cantidad de cDNA obtenida fue suficiente para permitir llevar acabo las amplificaciones mediante PCR punto final. Los valores registrados con el NanoDrop (ND-1000) fueron de alrededor de 41.3 ng μL^{-1} (concentración de RNA) y absorbancia ($A_{260/280}$) igual a 2.25. Así como 2599.3 ng μL^{-1} (concentración de cDNA) y absorbancia ($A_{260/280}$) igual a 1.65 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Lecturas de pureza y concentración de RNA y cDNA de las muestras de plantas inoculadas con *N. aberrans*.

Muestra	RNA $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 260 []	cDNA $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 260 []
02 ddi CR	45.7	1477.1
02 ddi TR	22.0	1668.2
07 ddi CR	37.0	1704.7
07 ddi TR	22.1	2267.6
14 ddi CR	16.7	1994.7
14 ddi TR	37.9	2023.1
21 ddi CR	33.0	2898.4
21 ddi TR	47.0	3763.3
28 ddi CR	35.4	3368.3
28 ddi TR	16.6	3120.6
02 ddi CH	35.1	1656.9
02 ddi TH	85.5	1419.6
07 ddi CH	79.9	2810.4
07 ddi TH	50.9	2125.3
14 ddi CH	23.9	2008.1
14 ddi TH	5.2	1996.6
21 ddi CH	69.2	3154.6
21 ddi TH	48.0	3098.7
28 ddi CH	44.3	5614.7
28 ddi TH	71.3	3816.1

4.5.2. Determinación de la Calidad del RNA y cDNA

El RNAm y el correspondiente cDNA se observó en un gel de poliacrilamida 8 % (8) que permitió evaluar y corroborar la calidad de ambas moléculas. Puede notarse en dicha Figura, la presencia de barridos de mayor intensidad a los carriles correspondientes al RNA, esto debido al alto número de transcritos de genes distribuidos en los carriles del gel, producto de la eficiencia del método semi-automatizado para la extracción.

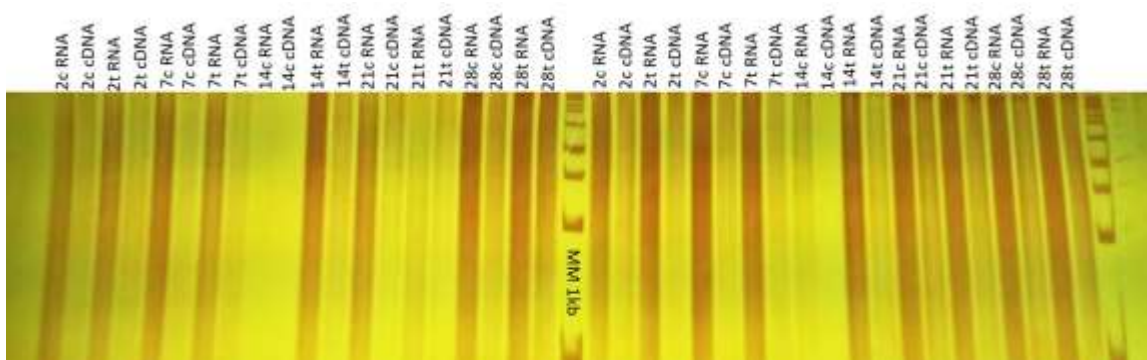


Figura 8. Gel de poliacrilamida 8 % que muestra la calidad de RNA y cDNA del material vegetal empleado en la investigación. Las claves siguientes corresponden a la identificación de las muestras: los tiempos de muestreos (2, 7, 14, 21 y 28) días después de inoculación); C*= plantas control sin inoculación; T*= plantas tratamiento, inoculadas con *Nacobbus aberrans*. MM= Marcador molecular 1kb

4.5.2. Determinación de TM por gradiente de temperatura

Los resultados de la prueba de gradientes para los primers se muestran en las Figura 9 y Figura 10, donde se aprecia que solo en cinco primers existió amplificación visible en el gel. El peso molecular de los fragmentos obtenidos fueron de acuerdo a lo reportado por Ek Xiu (2014) quien trabajo con los genes de quitinasa y fenilalanina amonio liasa en plantas de jitomate y Corral (2014) con los genes PR5, glucanasa y peroxidasa también en jitomate, aunque la mejor TM de alineamiento fue a los 55 °C.

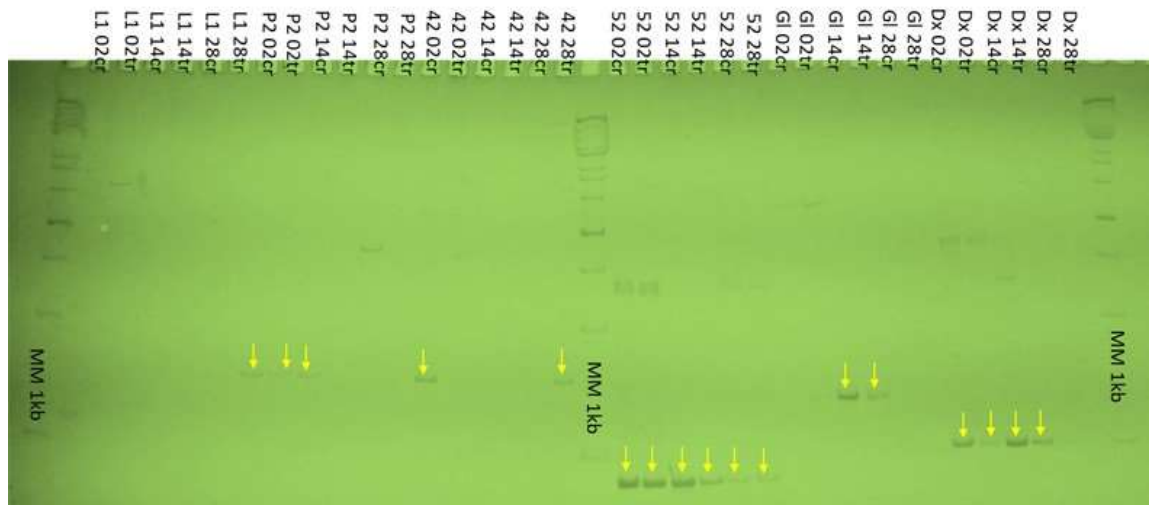


Figura 9. Evaluación de gradientes en 6 muestras de raíz (Muestras 2ddi, 14 ddi y 28 ddi). Fechas amarillas señalan las bandas del gen esperadas por el peso molecular. El marcador de peso molecular fue de 1kb.

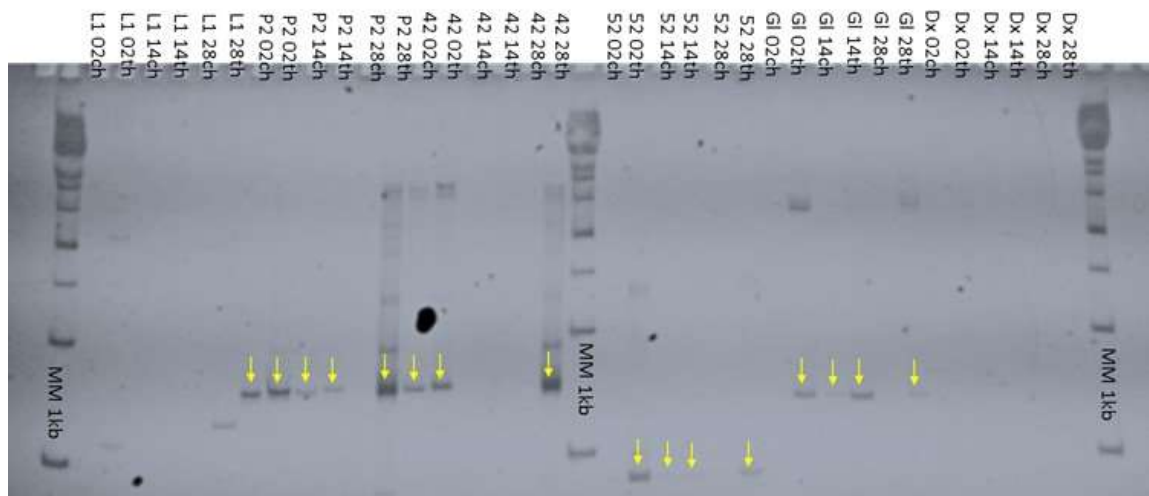


Figura 10. Evaluación de gradientes en 6 muestras de hoja (Muestras 2ddi, 14 ddi y 28 ddi). Fechas amarillas señalan las bandas del gen esperadas por el peso molecular. El marcador de peso molecular fue de 1kb.

4.5.3. Expresión de Proteínas relacionadas a la patogénesis

Los genes PRs se detectan tanto en plantas infectadas como no infectadas, pero además su expresión es diferente en los órganos de la planta. En el caso de su expresión en tejidos infectados, constituyen una barrera natural inicial para evitar la proliferación del patógeno (Chang *et al.*, 2002). Silvar (2008) menciona a la compatibilidad patógeno-hospedante en función del grado de coordinación entre

las defensas y expresión de genes codificantes de metabolitos inhibidores de patógenos. A través de electroforesis en geles de poliacrilamida al 8 % (acrilamida: bis-acrilamida, 29:1) se separaron los fragmentos obtenidos mediante PCR punto final, ya que de acuerdo con Valadez-Moctezuma y Kahl (2000), si se emplea esta concentración, se pueden observar fácilmente fragmentos que se encuentran en un rango de 200 pb a 2.5 kb. A manera de resumen se hace mención la presencia o ausencia de las bandas esperadas de estas enzimas para muestras de raíz y hojas (Cuadro 10 y 11).

Cuadro 10. Presencia-ausencia de las proteínas relacionadas a patogénesis en muestras de raíz.

Primers	02 C	07 C	14 C	21 C	28 C	02 T	07 T	14 T	21 T	28 T
PAL	X	X	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓
P42	✓	✓	X	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓
GLU	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
POX	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
P52	X	✓	X	X	✓	✓	✓	X	X	✓

Cuadro 11. Presencia-ausencia de las proteínas relacionadas a patogénesis en muestras de hojas.

Primers	02 C	07 C	14 C	21 C	28 C	02 T	07 T	14 T	21 T	28 T
PAL	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
P42	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
GLU	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
POX	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
P52	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

El proceso de inducción de producción de PRs debe verse como sistémico, ya que ellas no solo se acumulan en el sitio de localización del patógeno, sino también en partes no inoculadas de la planta, por lo que conocer los cambios metabólicos inducidos por *N. aberrans* puede ayudar a comprender el fenómeno de pérdida o inhibición de la resistencia.

Los niveles de la actividad de la enzima PAL, la cual es inducida tempranamente en respuestas resistente a otros patógenos, también aumentan en tomate resistentes después de la infección con el nematodo (Moroz *et al.*, 1996). Williamson *et al.*, (1994) y Lambert (1995) quienes por screening diferencial de una librería de ápices de raíces infectadas por una hora con nematodos formadores de agallas, identificaron algunos genes de defensa homólogos. En general, las plantas resistentes a los nematodos tienen un mayor nivel de fenilalanina amonio liasa (PAL), que es una enzima clave del metabolismo fenólico, conocida por estar relacionada con la resistencia de las plantas a las enfermedades; esto coincide con nuestros resultados porque estos mostraron que en las muestras de raíz inoculadas se observa un incremento en la concentración del gen, mientras que en los controles solo a los 21 días se observó su expresión. En hojas hubo un decremento en la concentración a los 14 DDI tanto en las plantas control como en las tratadas. En el gel para el corrimiento de PAL se observa que las bandas mostraron en efecto de “sonrisa”, esto puede deberse a que en ocasiones las muestras de los costados se mueven o corren más lento en la electroforesis; además se logran observar incluso, bandas de mayor peso por encima de la banda esperada esto debido a una sobrecarga de cDNA o bien productos de estructura secundaria de mayor peso (Cuadro 12 en PAL).

La glucanasa y quitinasa se encuentra en los exoesqueletos de artrópodos, de aquí la importancia que existan niveles altos de estas enzimas en una planta. Ambas proteínas PR tienen una función importante en la defensa contra patógenos que contienen β -glucano y quitina como los nematodos; esta observación fue previamente hecha por Bliffeld *et al.*, (1999) y Nishizawa *et al.*, (1999), quienes demostraron que plantas de trigo y arroz genéticamente modificados sobre expresaron quitinasas en defensa de los hongos *Erysiphe graminis* y *Magnaporthe grisea*. Por otra parte Zinoveva *et al.* (2001), demostraron que la invasión de *Meloydogine incognita* en plantas de pepino provocó el incremento en la expresión de glucanasas y quitinasa; sin embargo, estos mismos autores hacen mención también que en raíces de tomate se

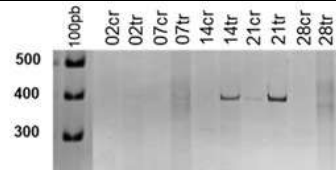
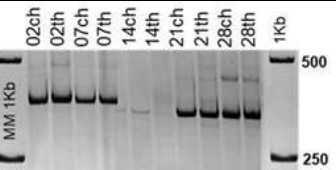
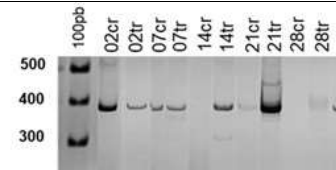
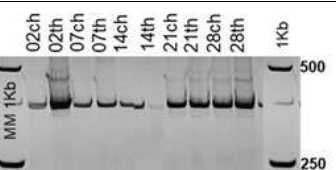
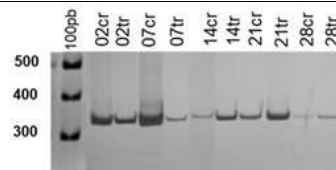
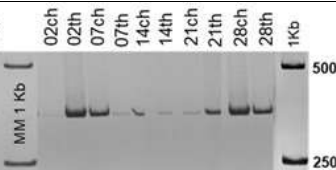
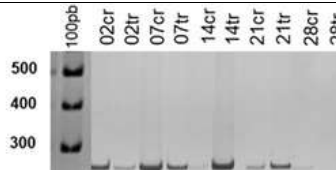
incrementa significativamente la actividad de la enzima β - glucanasa más no la de quitinasa. En la presente investigación se encontraron resultados similares; ya que el gen de quitinasa solo se expresó los primeros 7 DDI en plantas control y fue constante en las plantas inoculadas; por otro lado, el transcrito de glucanasa se manifestó en ambas regiones de la planta durante el tiempo de experimentación (28 días) (Cuadro 12 en PR42 y GLU).

La expresión del transcrito del gen POX y la actividad de peroxidasas se incrementa como resultado de la invasión del patógeno (Van Loon *et al.*, 2006), las peroxidasas aportan resistencia al acumular O_2 creando un ambiente toxico, además de reforzar las paredes celular depositando polímeros que forman una barrera física (Passardi *et al.*, 2005). De manera general, al inocular plantas de jitomate con *N. aberrans*, la actividad de POX en las plantas infectadas experimentan un incremento como respuesta a dicho estrés; encontrando la mayor cantidad de expresión con base en el grosor de la banda a los 14 DDI tal y como se muestra en el Cuadro 12 en POX. Estos resultados son similares a lo reportado por Yamunarani *et al.*, (2004) quienes reportan un aumento de actividad de peroxidasa en jitomate a partir del primer días después de inducir resistencia en la planta tratadas con extracto de agallas de *Quercus infectoria*. En hojas no se detectó expresión de POX debido a que eran muy jóvenes; y como menciona Cuervo *et al.*, (2009), la inducción de la actividad de peroxidasas está asociada a la lignificación, siendo parte de los mecanismos asociados a defensa a nivel del tallo.

La PR52 que corresponde a la proteína Taumatina, se expresó en cada una de las muestras de hoja, sin embargo en la raíz se expresó al comienzo y al final de la invasión (2 DDI y a los 28 DDI). En los tiempos de mayor actividad de los nematodos no se visualizó la expresión del gen (entre los 14 DDI a 21 DDI) (Cuadro 2 en PR52). Esta ganancia de sobre expresión podría dar un margen de expresión mayor cuando las plantas se encuentren en campo sujetas a diferentes tipos de estrés, ya que tanto los factores bióticos como abióticos estimulan de manera natural las rutas principales defensa de la planta. Estudios relacionados

a esta proteína fueron reportados por (Duplessis *et al.*, 2009); estos autores reportaron estudios basados en transcriptoma que revelaron la reprogramación transcripcional en hojas de álamo infectadas por *Melampsora spp.*, incluida la regulación positiva de muchas proteínas PR. Rinaldi y colaboradores (2007) reportaron también el establecimiento de un conjunto de genes de defensa del hospedante, incluidas varias taumatinas, en el perfil de transcripción de hojas de álamo durante una interacción incompatible (es decir, resistencia específica del huésped) con *M. larici-populina*.

Cuadro 12. Fragmento amplificados de algunas proteínas relacionadas a la patogénesis

Primers	RAIZ	HOJA	
PAL2 Fenilalanina amonio liasa			385 pb
PR-42 Quitinasas			376 pb
GLU Glucanasas			325 pb
POX Peroxidasa			255 pb
PR-52 Thaumatina			220 pb

4.6 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman la activación de los genes para las proteínas Fenilalanina amonio liasa, glucanasas, quitinasas y taumatina, incrementando los niveles de expresión proporcionalmente al número de nematodos presentes en el sistema radicular del jitomate; siendo más marcado en raíz.

No se observaron efecto en el sistema antioxidantes (procesos oxidativos) que indujeran la acumulación de peroxidasas en hojas al estar en pleno desarrollo.

El contenido de PRs en los tejidos de las plantas sanas es insignificante, expresándose solo en ciertos estados del desarrollo de las mismas.

4.7 LITERATURA CITADA

- Abad, P., P. Castagnone-Sereno, M. Rosso, J. A. Engler, and B. Favery. (2009).** Invasion, feeding and development. Pp. 163-181. *In: Root-knot nematodes.* R. N. Perry, M. Moens, and J. L. Starr, eds. CABI publishing. UK.
- AI, (1987).** Adobe® Illustrator ® CS4 versión 14.0.0. Adobe Systems Incorporated y sus Licenciados.
- Andreu, A., C. Oliva, S. Distel, and G. Daleo. (2000).** Production of phytoalexins, glycoalkaloids and phenolics in leaves and tubers of potato cultivars with different degrees of field resistance after infection with *Phytophthora infestans*. *Potato Res.* 44: 1-9.
- Bliffeld, M; Mundy, J; Potrykus, I; Futterer, J. (1999).** Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theoretical and Applied Genetics* 98:1079-1086.
- Casañal, A. Zander, U. Muñoz, C. Dupeux, F. Luque, I. Botella, M. Sxhwab, W. Valpuesta, V. y Márquez, J. (2013).** The Strawberry pathogenesis-related 10 (pr-10) fra a proteins control flavonoid biosynthesis by binding to metabolic intermediates. *The Journal of biological chemistry.* Vol. 288 (49).
- Chang, Julie; Baltz, Rachel; Schmett, C. y Beffa, R. (2002).** Downregulation of a pathogen responsive tobacco UDP-GLC: Phenylpropanoid glucosyl transferase reduces scopolition glucosidase accumulation. *Plant Cell.* 14: 1093-1107.
- Collinge D. B., Gregersen P., Thordal C. H. (1994)** The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. In *Mechanisms of plant*

- growth and improved productivity, Modern approaches. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker. p. 391-433.
- Corral, M. J. J. (2014).** Cuantificación de los genes Pr5, glucanasa y peroxidasa en jitomate (*solanum lycopersicum* L.) inducidos por bioprotectores. Tesis de Maestría en ciencias. Universidad Autonoma Chapingo, Chapingo, Edo de México. 46 pp.
- Cuervo, D., Martinez, S., Ardila, H., & Higuera, B. (2009).** Inducción diferencial de la enzima peroxidasa y su relación con lignificación en los mecanismos de defensa del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante su interacción con *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*. Revista Colombiana de Química, 38 (3), 379-393. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/13626/36576>
- Dao, M.; Lim, C. T.; Suresh, S. (2004).** Mechanics of the human red blood cell deformed by optical tweezers. J. Mech. Phys. Solids 51, 2259-2280.
- Dixon, R. A., and M. J. Harrison. (1991).** Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. Adv. Genet. 28: 166-234.
- Do, H.M., Hong, J.K. Jung, H.W., Kim, S.H., Ham, J.H., and Hwang, B.K. (2003).** Expression of Peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* in *Capsicum annuum*. Molecular Plant-Microbe Interactions 16: 196-205.
- Duplessis S, Mayor I, Martin F, Séguin A. (2009).** Interacciones de álamo y patógeno: Perspectivas de Populus Genoma Análisis a gran escala de familias de genes de resistencia y defensa y perfil de expresión génica. Crit Rev Plant Sci. 28: 309-334. doi: 10.1080 / 07352680903241063.
- Ebrahim, S. Usha, K. Sigh, B. (2011).** Pathogenesis Related (PR) Proteins in Plant Defense Mechanism. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. FORMATEX. Ed. A. Méndez-Vilas. 1043-1054 pp.
- Ek xiu, E. A. (2014).** Cuantificación de los genes quitinasa y fenilalanina amonio liasa (pal) en plantas de jitomate (*solanum lycopersicum* L.) tratados con bioprotectores. Tesis de Maestría en ciencias. Universidad Autonoma Chapingo, Chapingo, Edo de México. 61 pp.
- Espinosa Z.C. (2004).** Producción de Tomate en Invernadero. Multiservicios Agropecuarios y Forestales. Zapata y Asociados. México.
- Fagoaga, C., I. Rodrigo y V. Conejero (2001).** Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. Molecular Breeding 7:175-85.
- Gheysen, G., and Fenoll, C. (2002).** Gene expression in nematode feeding sites. Annual Review of Phytopathology. 40:191-219.
- Goellner, M., X. Wang, and E. L. Davis. (2001).** Endo-B-1.4, glucanase expression in compatible plant-nematode interactions. Plant Cell 13:2241-2255.
- Gómez-Vásquez, R., Day, R., Buschmann, H., Randles, S., Beeching, J.R., and Cooper, R.M. (2004).** Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia

- lyase and peroxidases in elicitor-challenged Cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Annals of Botany*. 94:87-97.
- Goverse, A., J. A. Engler, J. Verhees, S. V. der-Krol, J. Helder, and G. Heath, M.C. (2000).** Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 315-319 p.
- Heath. (2000).** Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. *Plant Molecular Biology* 43:474-761.
- Lambert K.N. (1995).** Isolation of genes induced early in the resistance response to *Meloidogyne javanica* in *Lycopersicon esculentum*. PhD thesis. University of California, Davis.
- Lange. C. E., M. M. Cigliano, y M. L. De Wysiecki. (2005).** Los acridoideos (Orthoptera: Acridoidea) de importancia económica en la Argentina. En: Barrientos Lozano, L. & P. Almaguer Sierra (eds.), Manejo integrado de la langosta centroamericana (*Schistocerca gregaria* *gregaria* Walker) y acridoideos plaga en América Latina. Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, Tamaulipas, México, pp. 93-135.
- Leubner-Metzger G, Meins F. (1999).** Functions and regulation of plant β -1,3 glucanases (PR-2). En Datta SK, Muthukrishnan S (Eds.) Pathogenesis-Related Proteins in Plants. CRC Press. Boca Raton, FL, EEUU. pp. 49-66.
- Leung, D. y Alizadeh, H. (2011).** Extending the benefits of antifungal proteins from plants. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. FORMATEX. 1236-1243 pp
- Lister DL, Sproulé RF., Britt AJ, Lowe CR., Bruce NC. (1996).** Degradation of cocaine by a mixed culture of *Pseudomonas fluorescens* MBER and *Comamonas acidovorans* MBLF. 62 (1): 94-9.
- McInnis, S. M., D. C. Emery, R. Porter, R. Desikan, J. T. Hancock, and S. J. Hiscock. (2006).** the role of stigma peroxidases in flowering plants: insights from further characterization of a stigma-specific peroxidases (SSP) from *Senecio squalidus* (Asteraceae). *J. Exp. Bot.* 8: 1835-1846.
- Monties, B. (1989).** Lignins. In P. M. Dey, J. B. Harborne, eds., *Methods. Plant Biochem Vol I*. Academic Press, London, pp. 113–157
- Moroz Valerie W y Husseyb RS. (1996).** Nematode Pathogenesis and Resistance in Plants. *The Plant Cell*. 1735-1745.
- Nishizawa, Y; Nishio, Z; Nakazono, K; Soma, M; Nakajima, E; U g a k i; M; H i b i, T. (1999).** Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theoretical and Applied Genetics* 99:383-390.
- Osbourn A. E. (1996)** Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *The Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005).** Peroxidases have more functions than army knife. *Plant Cell Rep.* 24: 255-265.
- Richard, J.L. Meanwell, P., Shama, G. (2006).** Chitin in a dual role as substrate for *Streptomyces griseus* and as adsorbent for streptomycin produced during fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 38, 657–664.
- Rinaldi C, Kohler A, Frey P, Duchaussoy F, Ningre N, Couloux A, Wincker P, Le Thiec D, Fluch S, Martin F, Duplessis S. (2007).** Transcripción

- Perfilado de hojas de álamo sobre la infección con cepas compatibles e incompatibles de la roya foliar *Melampsora larici-populina*. *Planta Physiol.* 144: 347-366.
- Shang-Hsin, G., Jeen-Kuan, C., Wen-Chien, L. (2004).** Purification and characterization of extracellular chitinase from *Aeromonas schubertii* Taiwan. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 550–556.
- Silvar, C., Merino, F., and Díaz, J. (2008).** Differential activation of defense-related genes in susceptible and resistant pepper cultivars infected with *Phitophthora capsisi*, *Journal of Plant Phisiology*, 165:1120-1124.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kaufmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., and Fritig, B. (1993).** Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75:687.
- Takeuchi, Y., Yoshikawa, M., Takeba, G., Kunisuke, T., Shibata, D., and Horino, O. (1990).** Molecular cloning and ethylene induction of mRNA encoding a phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1, 3-endoglucanase, in soybean. *Plant Physiology* 93:673-682.
- Trudel, J., Asselin, A. (1989).** *Analytical Biochemistry*. 178: 362-366.
- Valadez-Moctezuma, E.; Kahl, G. (2000).** Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-Prensa. México, D. F., México. 147 p.
- Van Loon L.C., Rep M., Pieterse, C.M.J. (2006).** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44: 135-162.
- Van Loon, L. C. (1999).** Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. Pp. 1-12. *in*: Pathogenesis related proteins in plants. Datta S. K. and Muthukrishnan, S. (Eds.). CRC Press LLC.
- Williamson V.M, Lambert K.N, Kaloshian I. (1994).** Molecular biology of nematode resistance in tomato. En F Lamberti, CD Giorgi, DM Bird, eds, *Advances in Molecular Plant Nematology*. Plenum Press, New York. pp. 211-219.
- Williamson, V. M. and R. Hussey. (1996).** Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Pant Cell* 8:1735-1745.
- Williamson, V. M., and C. A. Gleason. (2003).** Plant-nematodes interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 6:327-333.
- Yamunarani, K.; Jaganathan, R.; Bhaskaran, R.; Govindaraju, P.; Velazhahan, R. (2004).** Induction of early blight resistance in tomato by *Quercus infectoria* gall extract in association with accumulation of phenolics and defense-related enzymes. *Acta Physiol. Plant.* 26 (3): 281-290.
- Yoshida, K., P. Kaothien, T. Matsui, A. Kawaoka, and A. Shinmyo. (2003).** Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60: 665-670.
- Zinoveva SV, Perekhod EA, Il'ina AV, Udalova ZhV, Gerasimova NG, Vasyukova NI. (2001).** PR Proteins in Plants Infested with the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) Chitwood 1949. *Doklady Biological Sciences.* ; 379:393-5.

5. APENDICE

A1. TÉCNICA DE TAMIZADO

La extracción del nematodo se realizó primeramente desinfestando las raíces con Hipoclorito al 2% (NaCl), enseguida se enjuagaron con abundante agua (se mantuvo el agua para posteriormente tamizar), se trituraron para obtener una mayor liberación de huevos y juveniles del nematodos. Se licuaron 150 gramos de raíz agallada en 200 mL de agua corriente; la suspensión se procesó en tamices 20, 40, 60, 100, 200, 325 y 400 micras. Los huevos y juveniles se recolectaron de los matiz 325 y 400, respectivamente. La cuantificación de huevos y juveniles se realizó en un contador de acrílico de 72 pozos de 3 mL de capacidad.

