

Artículo reseña

ASPECTOS GENERALES DE LA INTERACCIÓN TOMATE (*Solanum lycopersicon* L.) – *Meloidogyne incognita*

Yailén Arias*, Ivonne González*, Mayra Rodríguez, Carolina Rosales***, Zoraida Suárez*** Belkis Peteira***

Grupos de Fitopatología* y Plagas Agrícolas.* Dirección de Protección de Plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. Correo electrónico: yailenav@censa.edu.cu; ***Laboratorio de Nematología Agrícola. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-CENIAP), Maracay, Venezuela

RESUMEN: En el presente trabajo se abordan aspectos generales de la interacción tomate-*Meloidogyne incognita*. Se tienen en cuenta especificidades morfológicas y fisiológicas propias de los nematodos como organismos causantes de enfermedades, mecanismos desarrollados por este grupo en el momento de la penetración e infección y los mecanismos de defensa que desarrolla la planta.

(Palabras clave: tomate; *Meloidogyne incognita*; mecanismos de defensa)

GENERAL ASPECTS OF THE INTERACTION TOMATO (*Solanum lycopersicon* L.) – *Meloidogyne incognita*

ABSTRACT: In this paper, general aspects of the interaction tomato-*Meloidogyne incognita* are summarized. The morphological and physiological specifications of nematodes as organisms causing diseases, the mechanisms developed by this group during penetration and infectation and the plant defense mechanisms are analyzed.

(Key words: tomato; *Meloidogyne incognita*; defense mechanisms)

INTRODUCCIÓN

Más de 40 géneros de fitonematodos actúan como parásitos obligados de plantas superiores. La mayoría de ellos pertenecen al orden Rhabditida (1). Dentro de este orden, los fitonematodos del género *Meloidogyne* son responsables de grandes pérdidas en cultivos de importancia económica (2). Entre las especies más importantes económicamente se encuentran *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood, *M. javanica* (Treub) Chitwood y *M. arenaria* (Neal) Chitwood (3, 4). *M. incognita* habita en climas tropicales y es posiblemente el parásito más dañino de los cultivos en el mundo (5). Este fitonematodo posee una amplia gama de hospedantes y provoca daños en cultivos, tales como tomate, papa, algodón y pimiento (6). En el caso del tomate, se presenta en la actualidad como plaga, tanto en plantaciones cultivadas por los métodos tradicionales, como en las cultivadas con tecnologías más modernas: sistemas de

cultivos protegidos, hidropónicos, huertos intensivos, invernaderos y organopónicos (7).

Las plantas infestadas muestran un desarrollo aberrado del sistema radical caracterizado por la formación de agallas (8). Las agallas pueden medir desde 1 o 2 milímetros de diámetro en las raíces pequeñas y hasta 1 cm o más en las raíces grandes. Las raíces altamente infestadas son mucho más cortas que las sanas, tienen menos raíces laterales y pelos radicales (9). En cuanto al sistema aéreo, los síntomas de una planta infestada por *Meloidogyne* son similares a los que presenta una planta con otro tipo de daño en las raíces. Estos pueden ser: inhibición de la brotación, disminución del crecimiento y deficiencias nutricionales que se manifiestan como clorosis del follaje, ya que los nematodos interfieren la producción y translocación de sustancias provenientes de las raíces, como las hormonas giberelinas y citoquininas, y también de sustancias que regulan la fotosíntesis. Otro síntoma

característico es la aparición de marchitez temporal a pesar de haber humedad adecuada en el suelo, debido al menor tamaño del sistema radical y a que los elementos vasculares en los nódulos se rompen y se deforman, interrumpiendo mecánicamente el flujo normal de agua y nutrientes (10). Como resultado, aparecen síntomas de deficiencia, los cuales conllevan a la disminución de los rendimientos, en dependencia de la severidad de la infestación del suelo (4).

El control de nematodos se realiza usualmente por la combinación de varias estrategias de manejo. El control cultural es una práctica extendida, pero la rotación de cultivos tiene valor limitado para nematodos del género *Meloidogyne*, por su amplia gama de hospedantes (11). El control químico se ha vuelto difícil debido a que los nematicidas efectivos, tales como el DBCP (dibromocloropropano) y EDB (ethylene dibromide), han sido proscritos por ser peligrosos para el ambiente y la salud humana. Algunos como el Bromuro de Metilo, uno de los fumigantes más ampliamente utilizado para el control de fitopatógenos del suelo, incluyendo los nematodos, ha sido eliminado en algunos países y lo será en un futuro próximo para otros. Es por esto que, además de nematicidas, las nuevas prácticas culturales, el empleo de variedades resistentes y otras medidas amigables al ambiente deben ser desarrolladas para el control de nematodos (12).

La resistencia a *Meloidogyne* spp. se encontró originalmente en formas silvestres de *Lycopersicon peruvianum* L. (P.I. 128657), y utilizando las técnicas de cultivo de embriones, se ha obtenido de forma exitosa un híbrido entre *L. peruvianum* L. y el tomate comercial *S. esculentum* L. (13). Watts en 1947 retrocruzó este híbrido con algunas líneas de *S. esculentum* y obtuvo un clon resistente a *Meloidogyne* (14). Estos estudios mostraron que la resistencia estaba determinada por un gen simple denominado "Mi", localizado en el cromosoma 6. Este gen confiere una resistencia efectiva al ataque de los nematodos agalladores *M. incognita*, *M. javanica* y *M. arenaria* (7), pero no a *M. hapla* Chitwood (14). Se plantea que el gen Mi en tomate suprime el desarrollo y reproducción de los nematodos formadores de agallas (15) y que en la actualidad, se encuentra presente en todas las variedades comerciales de este cultivo. Algunos autores plantean que las plantas de tomate portadoras de este gen pueden crecer en la mayoría de los suelos infestados con nematodos sin pérdidas significativas del rendimiento (16). Además, las variedades resistentes tienen el mismo precio que las susceptibles y no requieren prácticas de manejo suplementarias, sin embargo, no son usadas extensivamente, probablemente por la demanda en los mercados de frutos con características específicas y cualidades que no están en los cultivares resistentes (15). Otras de las desventajas de

la resistencia basada en este gen son la inactivación del mismo a temperaturas por encima de los 28°C (17) y la preocupación acerca de la durabilidad de la resistencia por el uso intensivo del gen Mi junto con la variabilidad patogénica de los nematodos formadores de agallas (3).

Aunque el gen Mi puede bloquear el desarrollo del nematodo en estados tempranos, la ocurrencia de variación en *Meloidogyne* spp. y su reproducción en plantas de tomates portadoras del gen ha sido bien documentada (18). Por otra parte se han encontrado biotipos virulentos del nematodo contra el gen Mi en zonas productoras de tomate en el mundo (19). En Cuba, existen evidencias de que la especie *M. mayaguensis* Rammah y Hirschmann fue capaz de vencer la resistencia conferida por dicho gen en diferentes variedades de tomate que eran portadoras del mismo (20).

Por estas razones se hace necesario profundizar en los estudios relacionados con la caracterización de las secreciones del nematodo, los factores de avirulencia y las respuestas de las plantas ante el ataque de los nematodos. El objetivo de esta reseña es lograr un mejor entendimiento de los procesos y mecanismos involucrados en la interacción *Meloidogyne incognita*-tomate.

PARTE ESPECIAL

¿Qué características diferencian a los fitonematodos del resto de los agentes causantes de enfermedades?

Los estreses biogénicos inducidos por nematodos parásitos tienen algunas características que los distinguen de las reacciones de estrés causadas por otros organismos. Estas diferencias se deben principalmente al alto nivel de desarrollo de los sistemas trófico, reproductivo, excretor y nervioso en los fitonematodos. Comparados con otros fitopatógenos, los nematodos tienen un alto grado de motilidad y un sistema sensorial más sensitivo y son capaces de seleccionar de forma activa las plantas necesarias para su alimentación y reproducción (21).

Las claves para el entendimiento de las señales del nematodo que desatan la respuesta de las plantas a la infección, están relacionadas con la biología de estos patógenos. Ellos tienen un particular comportamiento con respecto a la percepción del hospedante y el parasitismo. Como es típico del Phylum Nematoda, poseen un sistema nervioso central y órganos quimio-sensoriales complejos llamados anfidas. Las señales quimio-sensoriales parecen ser importantes para la atracción del nematodo a las raíces de su hospedante, así como para la identificación de los sitios apropiados para la penetración e iniciación de la alimentación

(22). Sin embargo, poco se conoce acerca de esta estimulación de la planta.

¿Cómo invaden los nematodos formadores de agallas a la planta hospedante y cuáles son los mecanismos involucrados en este proceso?

Los nematodos formadores de agallas son parásitos biótrofos que han evolucionado y desarrollado estrategias para infestar de manera exitosa diversas especies de plantas. La invasión de los tejidos de la planta involucra mecanismos comunes con bacterias y hongos fitopatógenos, tales como la producción de enzimas degradadoras de la pared celular. Sin embargo, las señales que inducen la diferenciación de las células de la planta en células especializadas como sitios de alimentación, aún no han sido determinadas.

Estos fitoparásitos tienen un ciclo de vida complejo (8). La planta es parasitada por el juvenil de segundo estado (J_2) o juvenil infestivo. Durante el parasitismo, el nematodo se establece y mantiene una estrecha relación con el hospedante. Los J_2 son atraídos a la zona de elongación, donde penetran la raíz y luego migran intercelularmente, separando las células por la lámina media en el tejido cortical. Este proceso parece incluir fuerzas mecánicas y secreciones enzimáticas del nematodo. En *Arabidopsis*, los juveniles infestivos usualmente migran hacia abajo en la raíz y circundan la misma en la región del meristemo apical. Luego se mueven hacia arriba y del centro de la raíz a la zona de diferenciación (22). Los J_2 sufren tres mudas hasta convertirse en adultos. Después del desarrollo de la hembra, que ocurre usualmente en tres semanas, los huevos son liberados a la superficie de la raíz en una matriz gelatinosa protectora. Los machos migran hacia el suelo y no se alimentan. Al ser parásitos obligados, el crecimiento de los nematodos y su reproducción dependen de los sitios de alimentación especializados en la raíz.

En el sitio de alimentación, los nematodos inducen un proceso de rediferenciación que conlleva a la formación de células de alimentación multinucleadas, llamadas células gigantes. La formación de las células gigantes es el resultado de divisiones nucleares repetidas de la célula nodriza inicial sin citoquinesis. Cada nematodo desencadena el desarrollo de hasta doce células gigantes, cada una conteniendo aproximadamente 100 núcleos (22). Los múltiples núcleos en las células gigantes resultan de la mitosis desacoplada de la citoquinesis. Además, los núcleos individuales tienen alto contenido de ADN, indicando que ha ocurrido la endoreduplicación. Las células gigantes son metabólicamente activas, con un citoplasma denso que contiene numerosas mitocondrias, plastidios, ribosomas, un aparato de Golgi y un retículo

endoplasmático liso bien desarrollados, generalmente organizados en remolinos. La vacuola central desaparece, dando lugar a pequeñas vacuolas. Además, se desarrolla el decrecimiento típico de la pared celular. Se piensa que este fenómeno aumenta la toma de solutos del sistema vascular. Cerca, las células de la corteza, el periciclo y el parénquima vascular aumentan de tamaño y se dividen, formando la agalla. La formación de la agalla puede ser vista bajo el microscopio entre las 12 y 24 horas, posteriores a la inoculación (23).

A pesar de que las señales moleculares para el desarrollo y mantenimiento de las células gigantes no han sido identificadas, se ha demostrado que el mantenimiento de su integridad depende de la continua estimulación del nematodo. Como se dijo anteriormente, en el proceso de migración del nematodo en la raíz y en la formación de las células gigantes intervienen diferentes enzimas y compuestos.

Los nematodos fitoparásitos poseen ciertas características estructurales que aseguran su existencia en el tejido vegetal. Estas incluyen el estilete, el cual es una adaptación para penetrar la pared celular de las plantas, las glándulas esofágicas (dorsal y subventral) y las fásmidas (21). Observaciones al microscopio electrónico muestran que para su alimentación, el nematodo perfora la pared celular con su estilete, con el cual alcanza la membrana plasmática de las células y se forman algunos tubos de alimentación. Estos tubos, al estar estrechamente asociados con el retículo endoplasmático, pueden traer los nutrientes desde partes distantes de la célula nodriza, o actuar como filtros moleculares para prevenir la obstrucción del estilete (24). Algunas estructuras de los nematodos pueden ser fuentes de moléculas secretadas involucradas en la interacción. La invasión a las plantas y la alimentación solo pueden tener lugar después que los nematodos cruzan la barrera de la pared celular. Los genes que codifican para las enzimas que facilitan el parasitismo dentro del tejido vegetal vía estilete son llamados genes de parasitismo o factores de patogenicidad (21, 23).

La mayoría de los trabajos se han focalizado en las proteínas secretadas por las anfidias y las glándulas esofágicas. Las anfidias son dos órganos sensoriales localizados bilateralmente en la región cefálica del nematodo y están en estrecho contacto con las células de la planta que diferencian a células nodrizas. Algunas glicoproteínas secretadas por las anfidias han sido aisladas y algunas de ellas están involucradas en la percepción de señales del ambiente (25). Las glándulas esofágicas son células especializadas capaces de exportar secreciones a través del estilete. La actividad esofageal varía durante el parasitismo

(26). Las glándulas subventrales son grandes y están llenas de vesículas, durante la fase migratoria del parasitismo. La glándula dorsal solo comienza la secreción activa de sustancias después de la sedentarización. Mientras los nematodos comienzan su alimentación, las glándulas subventrales se vuelven menos activas. Por lo tanto, las glándulas dorsales y subventrales parecen tener diferentes funciones en el parasitismo. Entre estas se encuentran, la proteína 14-3-3 y una Calreticulina, conocidas por sus múltiples funciones incluyendo la regulación de la señalización en las vías metabólicas y la regulación del ciclo y el crecimiento y diferenciación celular. Aunque su función en nematodos parásitos de animales no está clara, su implicación en muchas alteraciones da origen a la hipótesis de un papel importante de estas proteínas en la interacción con las plantas.

Los homogenados y exudados de nematodos contienen celulasas, amilasas y peptinasas. Las peptinasas, que atacan los polímeros de la pared celular y la lámina media, pueden ser de particular importancia en la patogénesis de las enfermedades inducidas por nematodos. Se ha sugerido que las diferencias entre los sistemas de peptinasas de varias especies de nematodos influyen en las características de la patogénesis de las correspondientes enfermedades (21). Las peptinasas de nematodos distintos, difieren tanto en el mecanismo de acción como en la especificidad por el sustrato.

Además, en las glándulas digestivas de *M. incognita*, fueron detectados genes que codifican para quitinasas, proteínas ligadas a celulosa y lipoproteínas (23). Otros genes importantes son aquellos que codifican para enzimas detoxificadoras que protegen al parásito de la respuesta defensiva oxidativa de las plantas. Tales genes se han aislado a través de su amplificación por PCR utilizando cebadores degenerados diseñados para los motivos conservados de estas proteínas. También se han identificado a partir de las secuencias blanco expresadas (ETS, del inglés Expressed Sequence Tags o Etiquetas de Secuencias Expresadas). Grandes juegos de ETS de nematodos han sido producidos en laboratorios y cerca de 36 000 ETS de *Meloidogyne* están disponibles en las bases de datos (27, 28). La estrategia candidata para los estudios de agresividad de las especies de *Meloidogyne* conlleva al aislamiento de genes que codifican para celulasas (β -1,4-endoglucanasas) y peptinasas (pectato liasas y poligalacturonasas) de *M. incognita* (29). La expresión específica de estos genes en las glándulas esofágicas ha sido demostrada por la hibridación *in situ*. Las ETS homólogas para detoxificar oxidoreductasas como la superóxido dismutasa están presentes en las bases de datos de

ETS de *Meloidogyne* spp. Dos genes expresados en las glándulas fueron identificados: uno codifica para una pectato liasa y el otro para una corimato mutasa (29, 30). El Corimatol es precursor para la síntesis de aminoácidos aromáticos y compuestos derivados del Corimato, relacionado con la formación de la pared celular, la síntesis de hormonas vegetales y de compuestos de defensa. Parece ser que el nematodo produce un panel de enzimas degradadoras de la pared celular, las cuales están potencialmente involucradas en la invasión de los tejidos de la raíz. El aislamiento de algunas isoformas de endoglucanasas y proteínas ligadas a la celulosa indica que las celulasas del nematodo pudieran actuar de manera sinérgica o estar asociadas a complejos multienzimáticos para producir una degradación eficiente de la celulosa.

Los carbohidratos, componentes lipídicos, amonio, amino ácidos, aminos, ácidos dicarboxílicos, aldehídos y otros materiales orgánicos han sido encontrados en excreciones de los nematodos, además de proteínas. Las sustancias excretadas por los nematodos pudieran, en muchos casos, unirse a receptores de las células vegetales y afectar, por la vía de su sistema de señalización, la expresión de genes que determinan la respuesta de la planta, actuando como inductores o elicitores de las reacciones de defensa. Los elicitores actúan como señales y están llamados a desempeñar una función dentro de la intrincada cadena de procesos inductores y reguladores de respuestas en las plantas (21).

Los nematodos no solo cuentan con enzimas y mecanismos para la degradación de las paredes celulares del hospedante y la formación de las células gigantes. Este grupo dispone además con mecanismos adecuados para poner a trabajar a su favor el metabolismo de la planta infestada. La identificación de los genes de la planta representa el mayor reto para entender como los nematodos alteran el desarrollo de la raíz para producir y mantener las células gigantes (23).

Los mecanismos a través de los cuales los nematodos influyen en el metabolismo de las plantas pudieran compartir características regulatorias en diferentes especies vegetales, teniendo en cuenta que las especies de *Meloidogyne* son capaces de desarrollar células gigantes en algunos miles de plantas hospedantes. La complejidad de los cambios morfológicos y fisiológicos que tiene lugar durante el establecimiento de las células gigantes son reflejados por la alteración que expresan las células de la raíz afectada (8).

Los análisis de proteínas y expresión diferencial de genes entre plantas sanas e infestadas, conducen a la identificación de genes en las agallas. La expresi-

sión de genes que codifican para la regulación del ciclo celular, reorganización de la pared celular, rutas metabólicas, osmoregulación y respuesta hormonal, han sido analizados durante la formación de células gigantes. El gen específico de raíz TobRB7, el cual codifica para la expresión de canales de agua en meristemos radicales y regiones del cilindro vascular inmaduras, es reactivado en células gigantes de tabaco inducidas por *M. incognita* (31). De igual forma, la activación transcripcional de marcadores del ciclo celular como la quinasa dependiente de ciclina CDC2a y la ciclina mitótica CYC1At, se ha observado durante los estados tempranos de la formación de las células nodrizas (32). Otros genes son regulados en el sitio de alimentación. Por ejemplo: el promotor del gen de la planta que codifica para la síntesis de la fenilalanina amonio liasa I que es altamente activo en raíces no infestadas, es silenciado dentro de los primeros días siguientes a la invasión con el nematodo (33).

Favery *et al.* (34), crearon en *Arabidopsis* un sistema de transformación que permitió elaborar la hipótesis de que en la planta las funciones bioquímicas normales son reclutadas para ocupar lugares claves, permitiendo el crecimiento del parásito y confirmaron los complejos cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en las células durante su modificación en los sitios de alimentación del nematodo. Esta estrategia fue validada por la caracterización molecular del gen RPE de la planta fuertemente sobre-expresado, involucrado en los pasos iniciales de la formación de las células gigantes. Este gen codifica para la D-ribulosa 5-fosfato 3-epimerasa, enzima clave en la vía de las pentosas. Esta vía es relevante en el crecimiento activo de las células produciendo el NADPH requerido en numerosas reacciones biosintéticas (ej. ácidos grasos y compuestos isoprenoides, tales como esteroides) y en la generación de intermediarios de carbohidratos para la síntesis de nucleótidos y polímeros de la pared celular.

Estos autores demostraron que el gen RPE es esencial para los primeros estadios de la formación de las células gigantes. La expresión de RPE en las células en proliferación en las raíces y en una pequeña porción de células involucradas en la iniciación de las raíces laterales indica, que el control genético de los sitios de alimentación del nematodo y la formación de raíces comparten pasos comunes.

Datos recientes sugieren que los procesos que conllevan a la endoreduplicación, regulación del ciclo celular, comunicación entre células y transporte de agua, son compartidos por el complejo proceso de desarrollo de organogénesis de los nódulos y la formación de las agallas (35, 36).

Mecanismos de resistencia de las plantas en su interacción con nematodos

Poco se conoce acerca de los cambios moleculares que ocurren en la raíz en la infección temprana, antes de la iniciación de las células gigantes o la inducción de la respuesta hipersensible. Los genes inducidos después de la infección pudieran potencialmente ocupar un lugar relevante en la defensa contra nematodos u otros patógenos de las raíces. De manera general, los mecanismos de defensa en las raíces son poco conocidos comparados con los de la parte aérea de la planta (37).

Los complejos cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren durante el establecimiento de los sitios de alimentación son reflejados por la alteración de la expresión de los genes en el hospedante. Las respuestas moleculares incluyen aquellas causadas por heridas o estrés provocadas por el nematodo tanto como perturbaciones dirigidas directamente hacia la iniciación y mantenimiento del sitio de alimentación. Debido a que muchos de los genes identificados son miembros de familias de genes con regulación compleja, estas respuestas son difíciles de interpretar. Las plantas son definidas como resistentes a los nematodos cuando estos tienen niveles reducidos de reproducción. Los genes de resistencia a nematodos están presentes en algunas especies y son componentes importantes de los programas de mejoramiento, incluyendo aquellos genes para tomate, papa, soya y cereales (22).

Las defensas de las plantas contra los nematodos involucran mecanismos específicos y no específicos. El sistema de resistencia vertical, tanto en la planta como en el patógeno, se basa en la presencia en ambos de genes particulares y metabolitos específicos que codifican y tienen relevancia en las cascadas de la respuesta inmune, la cual es preferencialmente inducida en plantas con un genotipo específico.

Según Van der Plank, en el sistema de resistencia horizontal, la interacción es determinada por mecanismos de defensa constitutivos que operan en la planta (21). Las primeras evidencias genéticas de resistencia a nematodos, fueron encontradas en la interacción tomate - *M. incognita* (38). Algunos genes de resistencia dominantes han sido identificados y mapeados ej: en tomate Mi, Mi-3 y Mi-9 (39), en pimiento Me3 (40) o en maní Mae y Mag (41). El gen Mi ha sido clonado y pertenece a la clase de genes NBS-LRR la cual también incluye genes que dan resistencia a virus, bacterias y hongos (42).

Estudios histológicos en raíces de plántulas de durazno de las variedades NemaGuard y GF-677 (alta-

mente resistente y susceptible a las especies de *Meloidogyne*, respectivamente), confirman que los nematodos penetran de igual forma en raíces de plantas susceptibles como resistentes y, sin embargo, la respuesta es diferente. Al analizar raíces de NemaGuard inoculadas con *M. incognita* se observó que varios juveniles y unos pocos adultos hembras de nematodos estuvieron presentes en el córtex de las raíces, a pesar de no presentar síntomas de ataque de nematodos (agallas). En cambio, las raíces de GF-677 mostraron una gran cantidad de agallas (43). En las raíces de las plantas susceptibles la formación de células gigantes es estimulada por la alimentación de la larva, la cual se desarrolla normalmente hasta la maduración, produciendo huevos de los cuales emergen las larvas viables (9). En plantas resistentes o con resistencia parcial se observa un desarrollo incompleto pero más o menos avanzado del nematodo acompañado desde un comienzo por la formación de agallas seguida de una necrosis de las células. Las células gigantes pueden no formarse o ser defectuosas; si esto ocurre, las larvas pueden fallar en su desarrollo como adultos y/o producir pocos huevos viables o ninguno. Una resistencia moderada también puede dar como resultado la evolución del ciclo de desarrollo hacia la formación de machos la que requiere menos energía que la de una hembra (9, 44).

¿Qué diferencia a las plantas susceptibles de las resistentes?

Los cambios histológicos observados en las raíces están apoyados por cambios en el metabolismo primario y secundario de las plantas ante el ataque de los nematodos. De esta forma hay cierto reconocimiento de señales que inducen a su vez la síntesis y acumulación de diferentes compuestos. Esta síntesis y acumulación debe ser analizada en tiempo y en magnitud, a fin de poder entender las diferencias entre genotipos de tomates resistentes y susceptibles.

Sistemas de señalización en la interacción

Los patógenos y sus elicitores provocan que las células de las plantas respondan a través de una cascada de reacciones antes que la sensibilidad o resistencia se establezca por completo. El proceso de discriminación involucra el llamado sistema de señales, el cual determina las respuestas de la célula a factores químicos o físicos. El funcionamiento del sistema de señales dentro de la célula es disparado por la unión del patógeno o del elicitador con receptores en la célula vegetal. La transducción de señales trae como resultado respuestas locales o sistémicas. Durante la infección se activan diferentes sistemas de señales, los cuales perciben, amplifican y transducen señales de los patógenos a la maquinaria genética de la célula.

La expresión de genes de defensa conduce a la plantas a organizar su defensa química y estructural contra los patógenos. Los sistemas de señalización identificados en las plantas incluyen la acetil quinasa, la proteína quinasa activada por mitógeno (MAP quinasa), fosfatidasa, calcio, lipoxigenasa, NADPH oxidasa, NO sintetasa y sistemas de protones. La transducción de señales activada en las plantas por los nematodos involucra a la MAP quinasa, calcio, NADPH oxidasa, y posiblemente lipoxigenasa (LOX). En estudios realizados en el laboratorio de Fitopatología del CENSA se ha encontrado que esta enzima es importante en la interacción tomate- *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout (45). Los niveles de actividad específica y la intensidad de las bandas obtenidas con la LOX fueron mayores en las variedades resistentes que en las susceptibles, por lo que se sugirió que esta proteína podía estar relacionada con los mecanismos de defensa en esa interacción y constituir un posible indicador de resistencia inducida. Los sistemas enzimáticos pueden actuar de forma aislada o unidos, posibilitando a las células vegetales construir sus defensas estructurales o químicas contra los fitonematodos (21).

Una de las respuestas de defensa más rápidas que ocurren a continuación del reconocimiento del patógeno es la llamada explosión oxidativa, la cual consta de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Intermediates o Intermediarios de Oxígeno Reactivo) en el sitio de invasión del nematodo. A menudo, esta respuesta de defensa rápida ocasiona la muerte de las células hospedantes retadas, produciendo una visible área de muerte celular, llamada respuesta hipersensible (HR, del inglés Hypersensitive Response o Respuesta Hipersensible). En un estudio en raíces de tomate resistente a estados tempranos de la infección con patotipos virulentos y avirulentos de *M. incognita*, se encontró que la alta acumulación de ROS está estrechamente ligada a depósitos de perhidróxido de cerio en los espacios intercelulares, pared celular, membrana plasmática y vacuolas de las células de las raíces dañadas por el patotipo avirulento. Estos autores sugieren que por esta localización apoplástica, tanto la membrana plasmática como la pared celular son los sitios primarios de generación de superóxido y H_2O_2 y pueden servir como elementos integradores en el circuito de señalización de las respuestas de resistencia para el control del nematodo (46).

Proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs), enzimas e inhibidores de proteasas

La producción de PR proteínas es una importante respuesta defensiva de las plantas a los patógenos. Se ha sugerido que este grupo de proteínas inducibles está relacionada a formas específicas de resistencia

a los patógenos. Las PRs de los grupos 2 y 3 tienen, al menos, dos funciones en el control de las enfermedades en las plantas. Primero, son capaces de catalizar la degradación de la pared celular de los patógenos, debido a que los β -1,3-glucanos y la quitina son componentes esenciales de las paredes de estos. Segundo, estas enzimas catalizan la hidrólisis de sus correspondientes sustratos y por tanto liberan oligosacáridos biológicamente activos (elicitors o supresores) capaces de regular el nivel de inmunidad de los tejidos vegetales. El contenido de PR en los tejidos de las plantas sanas es insignificante, encontrándose solo en ciertos estados del desarrollo de las mismas. 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 (46).

La información acerca de la función de las PRs en la interacción nematodo - planta es escasa y ambigua. En algunos casos no se asocia la invasión con la inducción de PRs, en otros, falla la correlación con la resistencia. Sin embargo, hay evidencias que indican que la relación de las PRs en la defensa no se limita a su inducción. Estudios en dos cultivares de soya con diferentes grados de susceptibilidad a *M. incognita* demostraron que altos niveles de actividad de quitinasas y la inducción temprana de estas enzimas, confiere resistencia a nematodos formadores de agallas. Zinoveva *et al.* (47), demostraron que la invasión de los nematodos a la planta resultó en la inducción de PRs. En plantas inmunizadas de pepino, la invasión provocó incrementos de la actividad de ambas enzimas. En raíces de tomate resistentes, se incrementó significativamente la actividad de la enzima, β -1,3 -glucanasa (no quitinasa). Según los autores, esto puede deberse, a diferencias en el metabolismo de plantas que pertenecen a distintas familias. Los incrementos observados excedieron los mostrados por las plantas susceptibles bajo las mismas condiciones lo cual indica su función en la interacción. La actividad protectora de las quitinasas puede estar relacionada con los constituyentes de quitina de la cutícula que protege a los huevos y la pared celular de los nematodos. No obstante, es importante no solo conocer la magnitud de los niveles de actividad enzimática alcanzados durante la interacción, sino también, la aparición o sustitución de una isoforma en específico por otra nueva.

Diferentes investigadores que han trabajado también en la detección de PRs encontraron que de los casos examinados las PRs inducidas en la raíz durante la patogénesis son similares a las proteínas antimicrobianas encontradas en hojas, tales como quitinasas, glucanasas, osmotina, proteína inactivadora del ribosoma (37, 48, 49). Otro grupo de autores desarrollaron una técnica para obtener raíces infestadas sin-

crónicamente y luego producir una librería genómica de ellas (50, 51) y encontraron que algunos genes que incrementaron su expresión 12 horas después de la infección fueron identificados por "screening" diferencial. La mayoría de estos genes parecen ser igualmente inducidos en las plantas independientemente de la presencia del gen Mi en el genoma. Algunos genes mostraron homología a los genes de defensa conocidos, incluyendo aquellos que codifican para peroxidasa, quitinasas, lipoxigenasas e inhibidores de proteínas (52). El clon 23 de la librería obtenida presentó similitud de secuencia con la Miraculina. La Miraculina altera la percepción humana del sabor, convirtiendo lo agrio en dulce (53). Debido a la homología del gen de tomate con la Miraculina fue nombrado *LeMir* (*L. esculentum* miraculin). La secuencia también tiene homología con la familia del inhibidor de tripsina. Algunos miembros de esta familia tienen actividad anti insecto/anti patógenos (54), sugiriendo que *LeMir* puede tener una función en la defensa contra nematodos u otros patógenos. Posteriormente, *LeMir* mostró gran similitud a TID91, un gen de función desconocida altamente expresado en tumores genéticos de tabaco (55).

Además de las quitinasas y glucanasas, existen otro grupo de enzimas que sufren cambios durante la patogénesis en la interacción planta - nematodo. En paralelo se produce el incremento en la actividad de ciertas enzimas, las cuales incluyen peroxidasa (PO, EC 1.11.1.7), polifenol oxidasa (PPO, EC 1.10.3.1), fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), y lipoxigenasa (LOX, EC 1.13.11.12). El incremento de actividad PO en cultivares resistentes puede deberse a la formación de nuevas isoformas de esta enzima. Algunas isoformas son capaces de suprimir a las enzimas hidrolíticas de los nematodos y oxidar a las toxinas derivadas de los mismos a compuestos neutrales, facilitando la formación de barreras mecánicas que impiden la diseminación de la infección, o activando otros procesos de defensa. La PAL está involucrada en la regulación de la biosíntesis de fenoles que controlan la interacción planta - nematodo (21).

Mohamed y Abd-Elgawad (56) realizaron experimentos donde usaron tres cultivares de tomate con diferente reacción a *M. incognita*. Nematode-1400 y Bark fueron resistentes, pero GS-12 fue susceptible. La infección con el nematodo produjo la inducción diferencial de siringaldazina oxidasa, ascorbato peroxidasa y peroxidasa, en raíces de tomate. La dinámica de la infección demostró que siringaldazina oxidasa y peroxidasa fueron altamente inducidas después de los ocho días de la inoculación en los cultivares resistentes, mientras que la ascorbato peroxidasa fue altamente inducida en el susceptible, a los 45 días después de la inoculación. El mayor porcentaje de in-

cremento de las peroxidasa y ascorbato peroxidasa por encima del control, fueron encontradas en la fracción citoplasmática de los cultivares resistentes y susceptibles. Diferencias en los patrones de isoenzimas de PO y siringaldazina oxidasa se detectaron al comparar raíces infectadas y no infectadas de los cultivares resistentes. Tales diferencias pueden ser usadas como un marcador bioquímico rápido para el monitoreo de susceptibilidad/resistencia a *M. incognita*.

En raíces de tomate infestadas con nematodos formadores de agallas, los genes con homología a algunos genes de defensa en plantas, incluyendo peroxidasa, quitinasa, lipoxigenasa, y inhibidores de proteinasas, son inducidos localmente dentro de las 12 horas posteriores a la inoculación (52). Un gen codificador para una catalasa, el cual se expresa después de la infección con bacterias en la raíz, es inducido tanto sistémicamente como localmente en papa después de la infección con *M. incognita* y con *Globodera pallida* (Stone) Mulvey y Stone (50).

Los niveles de la actividad de las enzimas PAL y PO aniónicas, las cuales son inducidas tempranamente en respuestas resistentes a otros patógenos, también aumentan en tomate resistentes después de la infección con el nematodo, Brueske (1980); Zacheo *et al.* (1993), citados por Moroz y Husseyb (22). El screening diferencial de una librería de ápices de raíces infectadas por una hora con nematodos formadores de agallas conllevó a la identificación de algunos genes de defensa homólogos. Sin embargo, la mayoría de ellos fueron también inducidos en las plantas susceptibles, aunque hubo diferencias en la extensión y tiempo de inducción (50, 51).

Algunos autores han estudiado la naturaleza de la resistencia a los nematodos del género *Meloidogyne* en plantas de tomate, concluyendo que la alta cantidad de compuestos fenólicos sintetizados en la planta y traslocados hacia las raíces, confieren resistencia a la infección del nematodo. En general, las plantas resistentes a los nematodos tienen un mayor nivel de fenilalanina amonio liasa (PAL), enzima clave del metabolismo fenólico, conocida por estar relacionada con la resistencia de las plantas a las enfermedades. Otros estudios demuestran que la actividad de las peroxidases (PO) se incrementa en cultivares de tomate resistentes luego del ataque del nematodo, mientras que en los cultivares susceptibles no se observan cambios en el nivel de PO. Las peroxidases, sin embargo, tienen muchas isoenzimas que están relacionadas con diferentes procesos fisiológicos, y su papel en los mecanismos de defensa son aún desconocidos (57). Con respecto a la función de PO y PAL en el mecanismo de resistencia a los nematodos, Zacheo *et al.* (58), supusieron que el incremento de la actividad de PO en cultivares de toma-

te resistentes podría inducir un incremento de la producción de superóxidos y sus derivados, por medio de los cuales las células contrarrestan la acción de los patógenos. Estos resultados son coherentes con la observación histológica que indica que previo al rompimiento de las células gigantes, existe un gran número de ciertos materiales engrosando la pared celular (59).

El uso práctico de los estudios de PR proteínas se sustenta en la relativa facilidad de ejecución de las determinaciones y los experimentos de dinámica en condiciones controladas. Son especialmente rápidas de detectar tanto las isoformas como la actividad enzimática de las enzimas peroxidases, polifenol-oxidasas y fenilalanina amonio liasas. Sus niveles de actividad o la aparición de nuevas isoformas en materiales resistentes pueden ser en ocasiones vinculados a incrementos en los niveles de otros compuestos del metabolismo secundario que más adelante se detallarán, como son las fitoalexinas y otros compuestos fenólicos. En estudios sobre las interacciones de tomate y *A. solani*, así como de arroz y *Stenotartarsonemus spinki* (Smiley), se encontró que estos tres sistemas enzimáticos fueron muy importantes en los mecanismos de defensa estudiados (45, 60).

En específico, la enzima lipoxigenasa (LOX) como posible indicador de resistencia, pudiera permitir evaluaciones en condiciones controladas e inoculaciones artificiales con el patógeno y la diferenciación de variedades resistentes y susceptibles en etapas tempranas después de la inoculación. En este caso, las determinaciones de actividad enzimática e isoformas, pueden realizarse incluso previas a las 24 horas después de inoculadas las plantas (45). Esto abre nuevas perspectivas en el perfeccionamiento de los programas de mejoramiento genéticos tradicionales en Cuba al brindar una herramienta para la selección, con reducción de tiempo, recursos y esfuerzos necesarios para el logro de variedades con resistencia a *Meloidogyne* spp.

Los inhibidores de proteasas tienen múltiples funciones en la planta. Recientes avances en la fisiología de inhibidores en plantas sugieren que los mismos pueden tener funciones fundamentales como agentes reguladores en el control de proteasas endógenas, así como de proteínas de almacenamiento y como agentes protectores dirigidos contra proteasas de insectos y de microorganismos. Ellos evitan la invasión de los tejidos de las plantas, probablemente por la hidrólisis de proteínas en y entre las paredes celulares. Es posible, por lo tanto, que grandes cantidades de inhibidores de proteasas en tejidos vegetales contra proteasas de patógenos puedan retardar la proteólisis de la pared celular de la planta y de proteínas de membrana, reduciendo la destrucción de la organización de la célula vegetal. En el caso de los microorganismos, cuando muchas de sus enzimas con

actividad proteolítica se enfrentan a inhibidores de proteasas, resultan fuertemente inhibidas, por lo tanto se puede considerar que estos inhibidores son un mecanismo de la planta para el secuestro de proteasas extracelulares. Resulta muy interesante su papel contra insectos a partir de la inhibición de las proteasas digestivas, tanto en estado larval como ya una vez adultos. Este mecanismo a través del cual los inhibidores de proteasas disminuyen el crecimiento y causan la muerte en insectos, involucra probablemente la creación de una deficiencia en uno o más aminoácidos esenciales para el desarrollo. Otro posible mecanismo es la inducción de una superproducción de proteasas digestivas, lo cual junto a una dieta insuficiente puede concluir también en la inhibición del crecimiento (61). Se supone que en nematodos, los mecanismos de acción son similares a los antes referidos. Por lo tanto este tipo de proteína es un factor clave a estudiar en esta interacción.

Los niveles de ARNm de extensina, una familia de genes que codifica para glicoproteínas que forman el principal componente de la pared celular y son inducidas en las plantas como respuestas de defensa, se incrementan significativamente en las agallas provocadas por *M. javanica* una semana después de la infección, así como es significativo su incremento en las zonas de elongación radical en tomate después de 12 horas de la infección (52). Una fuerte inducción de extensinas fue observada en la infección con nematodos formadores de agallas. Las extensinas pueden ser importantes en las alteraciones inducidas por los nematodos en el sitio de alimentación o durante el desarrollo de las agallas. La deposición de calosa alrededor de la punta del estilete en la célula parasitada puede ser también reflejo de la respuesta a heridas, debido a que las células de las plantas comúnmente responden a daños mecánicos o infecciones por hongos con una rápida deposición de calosa a lo largo de la superficie interna de la pared afectada, Aist (1976) citado por Moroz y Husseyb (22).

Compuestos del metabolismo secundario

Algunos compuestos procedentes del metabolismo secundario de la planta, resultan también importantes en el estudio de esta interacción, por ejemplo las fitoalexinas y fitoanticipinas. Se cree que las fitoanticipinas incluyen fenoles, terpenoides, glicósidos y otros compuestos formados como resultado del metabolismo específico de las plantas. Los compuestos fenólicos tienen un lugar significativo en los mecanismos de la interacción planta – nematodo. Un incremento en sus contenidos se asocia con resistencia a nematodos migratorios y sedentarios. El ácido salicílico (AS) está entre los primeros compuestos fenólicos que han atraído la atención de los investigadores, debido

a la función que desempeña en la inmunidad inducida contra enfermedades y nematodos y en los eventos de señalización como una de las moléculas candidatas, similar al ácido jasmónico. El AS se acumula en los sitios de localización del nematodo, mientras que el contenido de esta sustancia fenólica en los órganos de la planta no afectados por la infección puede incrementarse en varias veces (incremento sistémico). El AS es capaz de migrar a través de los tejidos principalmente vía floema; además esta sustancia sirve como un elicitador que dispara los sistemas de señales de las células vegetales. El AS endógeno induce la expresión de genes que trae como resultado la formación de una serie de PR proteínas y la producción de fitoalexinas. Un orden de diferencia en la magnitud del contenido de AS en raíces y hojas de tomate fue detectado en plantas resistentes y susceptibles a *M. incognita*, respectivamente. Estas diferencias se volvieron más pronunciadas durante la invasión, lo cual da soporte a la idea de la inmediata relación del AS en la resistencia del tomate a nematodos (47).

Se cree que los isoprenoides pueden ser otro grupo de compuestos que median la resistencia de las plantas a los nematodos (62). Ciertas propiedades de los isoprenoides capacitan a las plantas para sobrevivir al estrés causado por nematodos parásitos. Los isoprenoides pueden ser tóxicos para los nematodos (risitin, gossypol, odoracin, tomatina, y chaconina); tienen propiedades antialimento y afectan el crecimiento y el apareamiento (azadiractin, fitoecdysone, saponinas y lactosas sesquiterpenoides); afectan la eclosión del nematodo (glycinoeclepin A); inhiben la colinesterasa (asparagus glicósido) y bloquean la habilidad de reconocer la planta hospedante (cital y mentol). La estructura química de las fitoalexinas es dependiente del genotipo de la planta. Como regla, algunos tipos de fitoalexinas (que comparten la vía de síntesis), se forman en un espécimen infectado de una especie particular de planta y no en otras. Por ejemplo, las fitoalexinas sesquiterpenoides se forman en solanáceas, dos de ellas, risitina y lubimina, son encontradas en tomate y papa infectados con *M. incognita* y *Ditylenchus destructor* (Thorne) y *D. dipsaci* (Kuhn) Filipjev, respectivamente. En tejidos de algodón infestados con *M. incognita*, cinco compuestos (sesqui- y triterpenoides) fueron detectados. En plantas infectadas con nematodos sedentarios, el comienzo de la formación de fitoalexinas coincide con el momento de localización del nematodo y dura 72 horas aproximadamente.

Los datos sobre la toxicidad de fitoalexinas, sitios de formación y cinética de acumulación brindan evidencias sobre su función protectora en la inmunidad de la planta. La habilidad de especies o variedades de plantas para producir fitoalexinas en respuesta a la

infección con nematodos es directamente correlacionada con la resistencia. Otras sustancias vitales para el nematodo pero que no son sintetizadas en su propio tejido son de particular importancia. Los nematodos son incapaces de sintetizar esteroides y usan los de la planta. En la interacción tomate - *M. incognita*, se demostró que el efecto de la invasión de la raíz sobre la cantidad y composición de los esteroides era contraria dependiente de la resistencia o susceptibilidad de las plantas. El contenido total e individual de esteroides disminuyó en los cultivares resistentes como regla y en los susceptibles fue lo opuesto. La diferencia fue más pronunciada en el caso del estigmasterol, el cual es particularmente preferido por los nematodos. Su contenido en la variedad resistente disminuyó en dos veces, mientras en la susceptible aumentó de dos a cuatro veces. El estigmasterol predomina en huevos y hembras adultas por lo que se piensa que su cantidad determina su actividad vital (21).

En la interacción arroz - *S. spinki* estudiada en el laboratorio de Fisiopatología del CENSA, se detectó por cromatografía, una banda específica presente solamente en las variedades resistentes al ácaro y no en las susceptibles (60). Esta banda fue encontrada a nivel constitutivo, lo cual pudiera estar relacionado con ciertas características organolépticas repelentes para el ácaro y que hacen que prefiera a otros materiales para desarrollar su ciclo de vida o para alimentarse. En el caso de los nematodos esta misma situación puede ser importante, teniendo en cuenta que para estos organismos, los exudados de las plantas son muy importantes para la detección del hospedante adecuado y por otra parte por la necesidad de señales una vez dentro de la raíz que los guíen en la selección del lugar propicio para el desarrollo del sitio de alimentación.

Hormonas

De forma no sorprendente, los niveles de las fitohormonas también son anormales en raíces infectadas con nematodos formadores de agallas, lo cual da un nivel de complejidad adicional para comprender las respuestas de la planta a la infección (22). Se ha encontrado que las secreciones de los nematodos formadores de agallas contienen niveles importantes de citoquininas (específicamente zeatina) y que además producen la enzima corismato mutasa, la cual está involucrada en el proceso de síntesis de las auxinas. Ambos tipos de hormonas a menudo actúan juntas. La acción de la corismato mutasa de los nematodos conlleva a la presencia de compuestos que interfieren con el transporte normal de auxinas, por lo que varían los niveles de esta enzima dentro o en las cercanías del precursor del sitio de alimentación. Por su parte, se sabe que la zeatina influye en la transición de la fase G2 a la fase M en el ciclo celular y que la forma-

ción de las células gigantes depende de este proceso donde se manifiesta una división nuclear sin división celular. Por lo tanto el balance de estos dos tipos de hormonas en la raíz es fundamental para el desarrollo o no del sitio de alimentación del nematodo (63).

CONCLUSIONES

La resistencia de las plantas es, en la actualidad, una alternativa atractiva para el manejo de cualquier enfermedad y en el caso específico de la interacción *Meloidogyne* spp. - hospedante, adquiere singular importancia debido a las particularidades de dicha interacción. Se hace necesario abordarla a partir del estudio de una mayor gama de factores que puedan contribuir a la resistencia, teniendo en cuenta que el conocimiento más profundo de la reacción de los genotipos resistentes dará elementos para trazar estrategias más consistentes. Entre tales estrategias pudieran incluirse:

- El uso de marcadores moleculares a fin de acelerar la selección de los genotipos resistentes en un esquema basado en las técnicas de mejoramiento tradicional o biotecnológicas.
- Obtención de transgénicos encaminados a la expresión de genes que depriman el desarrollo del nematodo, ya sea por una detección rápida y precoz del nematodo o rompiendo pasos determinantes de su ciclo como la formación del sitio de alimentación y su desarrollo a la madurez.
- Aplicar este conocimiento como base para la utilización del fenómeno de la resistencia inducida, teniendo en cuenta que aunque para esta interacción se plantea que el proceso está regido por el ácido salicílico, esta aseveración aún dista de ser contundente.

REFERENCIAS

1. Perry RN, Moens M. Plant Nematology. 1ra edición. CABI, UK. 2006.
2. Sasser JN, Hartmen KM, Freckman DW. Summary of Preliminary Crop Germplasm Evaluation for Resistance to Root-Knot Nematodes. Raleigh NC, Editor. North Carolina State University and US Agency for International Development. 1987. pp.1-88.
3. Castagnone-Sereno P. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes? Euphytica. 1999;124:193-199.
4. Jacquet M, Bongiovanni M, Martinez M, Verschave P, Wajnberg E, Castagnone-Sereno P. Variation in

- resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. *Plant Pathol.* 2005;54:93-99.
5. Trudgill DL, Blok VC. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 2001;39:53-77.
 6. Devran Z. The Screening of F₂ Plants for the Root-Knot Nematode Resistance Gene, *Mi* by PCR in Tomato. *J Agric For.* 2004;28:253-257.
 7. Cuadra R, Cruz Xiomara, Ortega J, Shagarodsky T, González Maribel. Respuesta de *Lycopersicon* spp. frente al ataque del nematodo de las agallas (*Meloidogyne incognita*). *Rev Protección Veg.* 2005;20(2):114-121.
 8. Williamson VM, Hussey RS. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *Plant Cell.* 1996;8:1735-1745.
 9. Taylor L, Sasser JN. Biología, identificación y control de los nematodos de nódulo de la raíz. Proyecto Internacional de *Meloidogyne*. Publicación Cooperativa entre el Departamento de Fitopatología de la Universidad del Estado de Carolina del Norte y la agencia de EEUU para el Desarrollo Internacional. Carolina del Norte. 1983.
 10. Mella Isabel Paula. Evaluación de la resistencia a nematodos *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. en nuevos portainjertos para duraznero. Proyecto de título presentado como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Departamento de Fruticultura y Enología. 2004.
 11. Trudgill DL. Parthenogenetic root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.); how can these biotrophic endoparasites have such an enormous host range? *Plant Pathol.* 1997;46:26-32.
 12. Yuji Oka, Yigal Cohen. Induced resistance to cyst and root-knot nematodes in cereals by DL-aminobutyric acid. *Eur J Plant Pathol.* 2001;107:219-227.
 13. Smith PG. Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proc. Amer Soc Hort Sci.* 1944;44:413-416.
 14. Taylor DP. Observations on a resistant and a susceptible variety of tomato in a field heavily infested with *Meloidogyne* in Senegal. *Cah ORSTOM, SER. Biol., X.* 1975;(3):239-245.
 15. Verdejo-Lucas S, Sorribas FJ. Resistance response of the tomato rootstock SC 6301 to *Meloidogyne javanica* in a plastic house. *Eur J Plant Pathol.* 2007;7:9243-9244.
 16. Sorribas FJ, Ornat C, Verdejo-Lucas S, Galeano M, Valero J. Effectiveness and profitability of the *Mi* resistant tomatoes to control root-knot nematodes. *Eur J Plant Pathol.* 2005;111:29-38.
 17. Jablonska BA, Jetty SSB, Kishor KM, Martinez De Ilarduya Sophie, Roberts Oscar, Kaloshian I. The *Mi-9* Gene from *Solanum arcanum* Conferring Heat-Stable Resistance to Root-Knot Nematodes Is a Homolog of *Mi-1*. *Plant Physiol.* 2007;143(2):1044-1054.
 18. Roberts PA, Thomason IJ. A review of variability in four *Meloidogyne* spp. measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agricultural Zoology Reviews.* 1989;3:225-52.
 19. Ornat C, Verdejo-Lucas S, Sorribas FJ. A population of *Meloidogyne javanica* from Spain virulent to the *Mi* resistance gene in tomato. *Plant Dis.* 2001;85:271-276.
 20. Rodríguez Mayra, Gómez Lucila, Peteira Belkis. *Meloidogyne mayaguensis* Rammah y Hirschmann, plaga emergente para la agricultura tropical y subtropical. *Rev Protección Veg.* 2007;22(3):183-198.
 21. Zinoveva SV, Vasyukova NI, Ozeretskovskaya OL. Biochemical Aspects of Plant Interactions with Phytoparasitic Nematodes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2004;(40):111-119.
 22. Moroz Valerie W, Husseyb RS. Nematode Pathogenesis and Resistance in Plants. *The Plant Cell.* 1996;1735-1745.
 23. Abad P, Favery B, Rosso Marie-Noelle, Castagnone-Sereno P. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Mol Plant Pathol.* 2003;4(4):217-224.
 24. Hussey RS, Mims CW. Ultrastructure of feeding tubes formed in giant-cells induced in plants by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma.* 1991;162(2-3):99-107.
 25. Stewart GR, Perry RN, Wright DJ. Studies on the amphid specific glycoprotein gp32 in different life-cycle stages of *Meloidogyne* species. *Parasitology.* 1993;107:573-578.

26. Hussey RS, Mims CW. Ultrastructure of esophageal glands and their secretory granules in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma*. 1990;156(1-2):9-18.
27. Dautova M, Rosso MN, Abad P, Gommers FJ, Bakker J, Smant G. Single pass cDNA sequencing a powerful tool to analyse gene expression in preparasitic juveniles of the southern root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Nematology*. 2001;3:129-139.
28. McCarter J, Abad P, Jones JT, Bird D. Rapid gene discovery in plant parasitic nematodes via Expressed Sequence Tags. *Nematology*. 2000;7:719-731.
29. Jaubert S, Laffaire JB, Abad P, Rosso MN. A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *FEBS Letters*. 2002;522(1-3):109-112.
30. Doyle EA, Lambert KN. Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific pectate lyase from the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Mol Plant Microbe Interact*. 2002;15:549-556.
31. Opperman CH, Taylor CG, Conkling MA. Root-knot nematode-directed expression of a plant root-specific gene. *Science*. 1994;263:221-223.
32. De Almeida Engler J, De Vleeschauwer V, Burssens S, Celenza JL, Inzé D, Van Montagu M *et al*. Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of the cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. *Plant Cell*. 1999;11:793-807.
33. Goddijn OJM, Lindsey K, Van der Lee FM, Klap JC, Sijmons PC. Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harbouring promoter-gusA fusion constructs. *Plant J*. 1993;4:863-873.
34. Favery B, Lecomte P, Gil N, Bechtold N, Bouchez D, Dalmaso D, *et al*. RPE, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. *EMBO J*. 1998;17(23):6799-6811.
35. Favery B, Complainville A, Vinardell JM, Lecomte P, Vaubert D, Mergaert P *et al*. The endosymbiosis-induced genes ENOD40 and CCS52a are involved in endoparasitic-nematode interaction in *Medicago truncatula*. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2002;15:1008-1013.
36. Koltai H, Dhandaydham M, Opperman C, Thomas J, Bird D. Overlapping plant signal transduction pathways induced by a parasitic nematode and a rhizobial endosymbiont. *Mol Plant-Microbe Interact*. 2001;14:1168-1177.
37. Brenner ED, Lambert KN, Kaloshian I, Williamson VM. Characterization of *LeMir*, a root-knot nematode-induced gene in tomato with an encoded product secreted from the root. *Plant Physiol*. 1998;118:237-247.
38. Ho JY, Weide R, Ma HM, Wordragen MF, Lambert KN, Koornneef M, *et al*. The root-knot nematode resistance gene (Mi) in tomato: construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. *Plant J*. 1992;2:971-982.
39. Ammiraju S, Veremis C, Huang X, Roberts A, Kaloshian I. The heat-stable root-knot nematode resistance gene Mi-9 from *Lycopersicon peruvianum* is on the short arm of the chromosome 6. *Theor Appl Genet*. 2003;106:478-484.
40. Djian-Caporalino C, Pijarowski L, Fazari A, Samson M, Gaveau L, O'Byrne C, *et al*. High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci Me3 and Me4 conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). *Theor Appl Genet*. 2001;103:592-600.
41. Garcia GM, Stalker HT, Shroeder E, Kochert G. Identification of RAPD, SCAR and RFLP markers tightly linked to nematode resistance genes introgressed from *Arachis cardenasii* into *Arachis hypogaea*. *Genome*. 1996;39:836-845.
42. Hwang CF, Bhakta AV, Truesdell GM, Pudlo WM, Williamson VM. Evidence for a role of the N terminus and leucine-rich repeat region of the Mi gene product in regulation of localized cell death. *Plant Cell*. 2000;12:1319-1329.
43. Simeone M, Di Vito M. Reactions to nematodes of selections of peach rootstock. *Acta Horticulturae*. 1992;315:197.
44. Esmenjaud D, Minot JC, Voisin R, Salesse G, Simard MH, Pinochet J. Portainjertos resistentes a nematodos. *Aconex*. 1996;51:28-32.
45. Solórzano Ernestina, Fernández Arais, León Ondina, Peteira Belkis. Evaluación de indicadores bioquímicos en variedades de tomate resistentes al

- tizón temprano. *Rev Protección Veg.* 2006;21(2):101-108.
46. Melillo MT, Veronico P, Castagnone-Sereno P, Bleve-Zacheo T. Oxidative bursa in tomato-*Meloidogyne incognita* interaction. (Consultada: 23 abr 2008). Disponible en: <http://www.esn-symposium.ba.cnr.it/postsymposium/pdf/143.pdf>
47. Zinoveva SV, Perekhod EA, Il'ina AV, Udalova ZhV, Gerasimova NG, Vasyukova NI, *et al.* PR Proteins in Plants Infested with the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid et White, 1919) Chitwood 1949. *Doklady Biological Sciences.* 2001;379:393-395.
48. Savary BJ, Flores HE. Biosynthesis of defense-related proteins in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* Maxim var. *Japonicum* (Kitam). *Plant Physiol.* 1994;106:1195-1204.
49. Savary BJ, Flores HE, Hill JJ. Isolation of a class III chitinase produced in root cultures of *Trichosanthes kirilowii* and assessment of accumulation patterns and antifungal activity. *Plant Physiol Biochem.* 1997;35:543-551.
50. Lambert KN, Williamson VM. cDNA library construction from small amounts of RNA using paramagnetic beads and PCR. *Nucleic Acids Res.* 1993;21:775-776.
51. Williamson VM, Lambert KN, Kaloshian I. Molecular biology of nematode resistance in tomato. En F Lamberti, CD Giorgi, DM Bird, eds, *Advances in Molecular Plant Nematology.* Plenum Press, New York. 1994. pp. 211-219.
52. Lambert KN. Isolation of genes induced early in the resistance response to *Meloidogyne javanica* in *Lycopersicon esculentum*. PhD thesis. University of California, Davis. 1995.
53. Theerasilp S, Hitotsuya H, Navajo S, Nakaya K, Nakamura Y, Kurihara Y. Complete amino acid sequence and structure characterization of a taste-modifying protein, miraculin. *J Biol Chem.* 1989;264:6655-6659.
54. Ryan CA. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1990;8:425-449.
55. Fujita T, Kouchi H, Ichikawa T, Syono K. Cloning of cDNAs for genes that are specifically or preferentially expressed during the development of tobacco genetic tumors. *Plant J.* 1994;5:645-654.
56. Mohamed MA, Abd-Elgawad MM. Differential induction of peroxidases in tomato roots in response to *Meloidogyne incognita* invasion. *Internat J Nematol.* 2003;3(1):20-26.
57. Yongbing Y, Cappellini P, Simeone AM. Phenolic metabolism in resistant and susceptible peach rootstocks to nematode after inoculation with *Meloidogyne incognita*. *Acta Horticulturae.* 1996;374:141-150.
58. Zacheo G, Arrigoni-Liso R, Heo T, Lamberte F, Arrigoni O. Mitochondrial preoxidase and superoxide dismutase activities during the infection by *Meloidogyne incognita* of susceptible and resistant tomato plants. *Nematologia Mediterránea.* 1983;11:107-114.
59. Malo SE. Nature of resistance of "Okinawa" and "Nemaguard" peach to the rootknot nematode *Meloidogyne javanica*. In: *Proceeding of the American Society for Horticultural Science.* 1967;90:69-46.
60. Peteira Belkis, Fernández Arais, Rodríguez H, González E. Efecto del BION y del fitomas como inductores de resistencia en plantas de arroz infestadas con *Steneotarsonemus spinki*. *Rev Protección Veg.* 2008;23(1):32-37.
61. Solórzano Ernestina, Peteira Belkis. Inhibidores de proteasas en plantas. *Rev Protección Veg.* 2000;15(1):7-15.
62. Abawi G, Van Etten H, Mai W. Phaseollin production induced by *Pratylenchus penetrans* in *Phaseolus vulgaris*. *J Nematology.* 1971;3:301.
63. Gheysen G, Jones JT. Molecular aspects of plant-nematode Interaction. Chapter 9. En: *Plant nematology.* Perry RN, Moens M, Editors. CABI, UK. 2006.

(Recibido 3-5-2008; Aceptado 25-8-2008)