



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**PARASITISMO Y PATOGÉNESIS DE *Meloidogyne enterolobii* EN  
RAÍCES DE PEPINO (*Cucumis sativus* L.)**

---

Por:

**Guillermo Gómez González**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE  
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

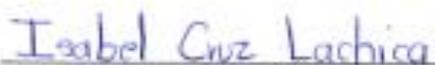
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Guillermo Gómez González, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias



---

Dr. Raymundo Saúl García Estrada  
Director de tesis



---

Dra. Isabel Cruz Lachica  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. José Ángel Martínez Gallardo  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Parasitismo y Patogénesis de *Meloidogyne enterolobii* en Raíces de Pepino (*Cucumis sativus* L.)" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Guillermo Gómez González, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela Caire Juvera", written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera  
Directora General

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente al Consejo Nacional en Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo prestado durante el Doctorado en Ciencias en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Así mismo, reitero mi agradecimiento por el apoyo brindado en el curso de la Maestría e incluso en la Licenciatura donde también recibí de manera indirecta el cobijo de esta tan importante institución.

Agradezco también al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) una extraordinaria institución rica en recursos humanos, ética, líneas de investigación y sobre todo rica en su trato humano a estudiantes internos, externos, y al público en general. En esta institución encontré conocimientos, experiencias, amistades, y figuras ejemplares tanto el ámbito de la investigación como el humano.

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Raymundo Saúl García Estrada quien me aceptó para mi formación como doctor en ciencias y nunca dejó de apoyarme, le agradezco también por su asesoría durante mis experimentos en laboratorio. Al Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, por sus asesorías y observaciones puntuales sobre mis experimentos, así como sus enseñanzas sobre fitopatología en general. Al Dr. José Ángel Martínez Gallardo, por su apoyo en mi formación en el área de nematodos, así como por su asesoría y consejos desde la maestría. A la Dra. Isabel Cruz, al Ing. Luis Osuna, y al MC. Isidro Márquez por su apoyo en laboratorio y en campo. A la Dra. Josefina León Felix por haberme enseñado biología molecular y por sus valiosos consejos. A Yadira Ramos y Magdalena Rivera con quienes compartí actividades y experiencias en laboratorio con mucho agrado. A todos los Doctores docentes de quienes tuve la fortuna de ser su alumno en clases. A todo el personal del CIAD por su trabajo. A todo el alumnado de los posgrados CIAD.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>CONTENIDO</b> .....	5
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	7
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	8
<b>RESUMEN</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	14
2.1. Importancia Económica y Clasificación Taxonómica del Pepino.....	14
2.2. Nematodos que Afectan al Cultivo de Pepino.....	14
2.3. Clasificación Taxonómica y Especies de Importancia de <i>Meloidogyne</i> .....	15
2.4. Ciclo Parasitológico de <i>Meloidogyne</i> spp.....	16
2.5. Efectores Patogénicos de <i>Meloidogyne</i> spp.....	18
2.6. Análisis de Expresión Génica.....	20
2.6.1. Genes de Referencia.....	20
2.6.1.1. Genes de referencia en <i>Meloidogyne</i> spp.....	22
2.6.2. El Método MCMC.qpcr para el Análisis de Información de qRT-PCR .....	21
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2. Objetivos específicos.....	25
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	26
5.1. Extracción de Huevos de <i>M. enterolobii</i> en NaOCl versus Infectividad del Inóculo en Pepino.....	26
5.1.1. Inóculo de <i>Meloidogyne enterolobii</i> .....	26
5.1.2. Establecimiento de los Experimentos.....	26
5.1.2.1. Extracción de huevos.....	26
5.1.2.2. Eclosión de huevos.....	27
5.1.2.3. Reproducción.....	27
5.1.2.4. Pruebas de infectividad.....	27
5.1.3. Análisis estadístico.....	28
5.2. Periodos de los Estadios de <i>M. enterolobii</i> en Raíces de Pepino.....	28
5.2.1. Tinción de <i>Meloidogyne enterolobii</i> con Fucsina Ácida en Raíces de Pepino .....	28
5.2.1.1. Establecimiento de experimentos.....	29
5.2.1.2. Tinción con fucsina ácida.....	29

## CONTENIDO (continuación)

5.2.1.3. Análisis estadístico.....	29
5.2.2. Estudio Histopatológico de <i>Meloidogyne enterolobii</i> en Raíces de Pepino.....	29
5.2.2.1. Establecimiento de experimentos.....	30
5.2.2.2. Procesamiento del tejido.....	30
5.3. Análisis de Expresión Génica de <i>M. enterolobii</i> en Raíces de Pepino.....	31
5.3.1. Establecimiento de Experimentos.....	31
5.3.2. Extracción de ARN Total y Síntesis de ADN Complementario.....	31
5.3.3. Diseño de Oligonucleótidos.....	32
5.3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.....	33
5.3.5. Análisis de Datos.....	34
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
6.1. Extracción de Huevos de <i>M. enterolobii</i> en NaOCl versus Infectividad del Inóculo en Pepino.....	35
6.2. Periodos de los Estadios de <i>M. enterolobii</i> en Raíces de Pepino.....	39
6.3. Análisis de Expresión Génica de <i>M. enterolobii</i> en Raíces de Pepino.....	42
6.3.1. Amplificación del ARN Total Extraído.....	42
6.3.2. Eficiencia de Amplificación de la qRT-PCR.....	43
6.3.3. Evaluación de RG y Análisis de Expresión con el Método MCMC.qpcr.....	45
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Estadios de desarrollo de <i>Meloidogyne enterolobii</i> .....	17
2	Ciclo patogénico de <i>Meloidogyne incognita</i> en <i>A. thaliana</i> .....	18
3	Efecto de combinaciones de concentraciones de NaOCl y períodos de agitación de raíces de pepino, en la extracción de huevos, en la eclosión, y en la reproducción de <i>Meloidogyne enterolobii</i> .....	37
4	Conteo de estadios de desarrollo de <i>Meloidogyne enterolobii</i> teñidos con fucsina ácida en raíces de pepino.....	39
5	Tinción de <i>Meloidogyne enterolobii</i> con fucsina ácida durante el ciclo parasitológico en raíces de pepino.....	40
6	Cortes histológicos de raíces de pepino parasitadas por <i>Meloidogyne enterolobii</i> . ....	41
7	Gel de agarosa mostrando la típica doble banda del ARN extraído a los 5, 8, 12 y 17 dpi de tres réplicas biológicas de plántulas de pepino infectadas con <i>Meloidogyne enterolobii</i> .....	43
8	Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos empleados.....	44
9	Análisis comparativo sobre viabilidad de genes de <i>Meloidogyne enterolobii</i> para ser empleados como genes de referencia.....	45
10	Los tres criterios para el enfoque de modelado lineal.....	46
11	Análisis de niveles de expresión de genes de <i>Meloidogyne enterolobii</i> en estudio durante el parasitismo en raíces de pepino sin incluir genes de referencia, modelo “ingenuo”.....	47

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Clasificación taxonómica del pepino.....	14
2	Clasificación taxonómica del género <i>Meloidogyne</i> .....	16
3	Efectores involucrados en la supresión de defensas en planta por <i>Meloidogyne</i> spp.....	19
4	Genes efectores relacionados a la supresión de defensas seleccionados para su estudio.....	33
5	Oligonucleótidos específicos de <i>Meloidogyne enterolobii</i> para el análisis cuantitativo de los genes seleccionados.....	34

## RESUMEN

El cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.) es de importancia alimenticia a nivel mundial; sin embargo, entre los factores que limitan la producción de este cultivo se encuentran los nematodos del género *Meloidogyne*. La especie *M. enterolobii* se ha reportado previamente afectando al cultivo de pepino en Sinaloa. La patogenicidad de este nematodo sobre el tejido vegetal depende de la secreción de efectores proteicos durante el ciclo de parasitismo. Se evaluó primeramente la técnica de NaOCl para estimar el efecto sobre la viabilidad del inóculo. Posteriormente, se estudió el ciclo parasitológico de *M. enterolobii* en el pepino para determinar los periodos de cada estadio por medio de tinciones e histología. Finalmente, se evaluó la expresión de genes efectores relacionados a la supresión de defensas en distintas etapas del parasitismo, así como genes potenciales para emplearse como referencia en el análisis de expresión. Nuestros resultados mostraron que la estimación más precisa y rápida de huevos de *M. enterolobii* en raíces de pepino se obtuvo con concentraciones de 0.5 a 0.75% de NaOCl con periodos de agitación de 8 minutos; mientras que, el inóculo con mayor viabilidad se obtuvo con la concentración de NaOCl de 0.3%. A partir de la invasión de las raíces, el periodo a la eclosión de los primeros J2 engendrados fue de alrededor de 20 días. Los periodos de los estadios J2, J3 y J4 parasíticos fueron de 4 a 5 días. El estadio adulto hembra ocurrió entre los 13 y 14 días. El sitio de alimentación comenzó su formación tan pronto como el nematodo inició la infección de las células por lo que se encontró diferenciado desde etapas tan tempranas como 5 días posteriores a la inoculación; mientras que, el juvenil J2 se desarrolló al estadio J3 durante este periodo. La hembra adulta tardó alrededor de tres días en madurar tomando la forma redonda. El gen *RSP6* no mostró ser útil en *M. enterolobii* como referencia; no obstante, los genes *SP12* y *TTL5*, relacionados a la patogenicidad en otras especies de *Meloidogyne*, se utilizaron adecuadamente para este fin. El gen *TCTP* tampoco mostró regulación durante el ciclo parasitológico.

**Palabras clave:** *Meloidogyne enterolobii*, *Cucumis sativus* L., expresión génica, gen de referencia, ciclo parasitológico, histología.

## ABSTRACT

The cultivation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) is of world food importance; however, among the factors that limit the production of this crop are the nematodes of the genus *Meloidogyne*. The species *M. enterolobii* has been previously reported to affect cucumber cultivation in Sinaloa. The pathogenicity of this nematode on plant tissue depends on the secretion of protein effectors during the parasitism cycle. NaOCl technique was first evaluated to estimate the effect on inoculum viability. Subsequently, the parasitological cycle of *M. enterolobii* was studied in the cucumber to determine the periods of each stage through staining and histology. Finally, it was evaluated the expression of effector genes related to the suppression of defenses at different stages of parasitism, as well as the potential reference genes for expression analysis. Our results showed that the most accurate and fast estimation of *M. enterolobii* eggs in cucumber roots was obtained with concentrations of 0.5 to 0.75% of NaOCl with 8 min agitation periods; while the inoculum with greater viability was obtained with the NaOCl concentration of 0.3%. From the invasion of the roots, the period to the hatching of the first J2 engendered was around 20 days. The periods of the J2, J3, and J4 stadiums were 4 to 5 days. The female adult stadium occurred between 13 and 14 days. The food site began its formation as soon as the nematode initiated the infection of the cells so it was differentiated from early stages as 5 dpi; the J2 juvenile developed to the J3 stadium during this period. The adult female took about three days to mature taking the round shape. The *RSP6* gene did not be useful in *M. enterolobii* as a reference; however, *SP12* and *TTL5* genes, related to pathogenicity in other *Meloidogyne* species, were used properly for this purpose. The TCTP gen also was not regulated during the parasitological cycle.

**Keywords:** *Meloidogyne enterolobii*, *Cucumis sativus* L., gene expression, reference gene, parasitological cycle, histology.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de pepino (*Cucumis sativus* L.) es de importancia económica a nivel mundial, nacional y local, siendo la hortaliza más sembrada en Sinaloa después de la papa (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y chile (*Capsicum annuum* L.), (SIAP, 2023). Entre los principales factores que reducen la producción de esta cucurbitácea se encuentran los nematodos fitoparásitos que provocan pérdidas cercanas a los 78 mil millones de dólares de la producción agrícola a nivel mundial (Ravichandra, 2014). Dentro de estos patógenos resalta el género *Meloidogyne* spp., conocido como nematodo agallador/nodulador de la raíz (RKN, por sus siglas en inglés). En el cultivo de pepino, se ha observado hasta 49% de daño en raíces (Gómez-González *et al.*, 2020). Una de las principales especies de este grupo taxonómico es *M. enterolobii*, caracterizada por su extensa distribución, amplio rango de hospedantes, elevado nivel de patogenicidad y su capacidad de parasitar cultivos que poseen genes de resistencia a otras especies del género. Actualmente ningún cultivar comercial posee resistencia genética a *M. enterolobii*, por lo que el manejo de este RKN se limita en mantener las poblaciones del nematodo por debajo del umbral económico (Rashidifard *et al.*, 2018).

Entre las técnicas de laboratorio más empleadas en el estudio de *Meloidogyne* spp., se encuentra la técnica de NaOCl, que consiste en la extracción de huevos de las masas adheridas a la superficie de la raíz por medio de agitación en NaOCl (Hussey y Barker, 1973). Esta técnica se ha empleado en la investigación con fines tales como obtención de especímenes, obtención de inóculo y cuantificación de poblaciones. Por su naturaleza práctica, la técnica es adaptada a cada necesidad del investigador tanto en la concentración de NaOCl empleada como el método de licuado o agitado. Así mismo, dentro del estudio de *Meloidogyne* spp., el análisis del desarrollo del ciclo parasitológico de las distintas especies, permite la generación de información novedosa y valiosa sobre la interacción planta-patógeno. Este tipo de análisis puede realizarse mediante tinción del nematodo dentro del tejido vegetal y por medio de análisis histopatológico. En este sentido, se ha mostrado que el ciclo parasitológico de *M. enterolobii* comprende alrededor de 35 días después de inocular suelo con J2 en plantas de tomate desarrolladas a 26°C; mientras que, los estadios J3 y J4 se observan a los 15 días y las hembras a los 25 días (Costa *et al.*, 2020).

La inducción y mantenimiento de las células gigantes especializadas durante el ciclo parasitológico

depende por completo de diversas familias de proteínas que son secretadas dentro de la planta, en su mayoría, a través del estilete del RKN. Estas células se asemejan en fenotipo a células de transferencia debido a que el citoplasma se torna granular, denso y sus procesos metabólicos se vuelven hiperactivos (Jones y Payne, 1978; Ding *et al.*, 1998). Los efectores proteicos se producen principalmente en la glándula esofágica del RKN, compuestas por dos glándulas subventrales y una glándula dorsal. Las primeras regulan la producción de las proteínas durante las etapas tempranas de invasión-alteración del tejido; mientras que, la glándula dorsal regula a su vez los productos secretados durante los estadios parasitarios tardíos (Nguyen *et al.*, 2018). La mayoría de las proteínas efectoras del RKN son pioneras y sin dominios funcionales conocidos; no obstante, los efectores caracterizados incluyen celulasas, xilanasas, anexinas, expansinas, calreticulina, proteína de unión de retinol y corismato mutasa (Huang *et al.*, 2005; Jaubert *et al.*, 2005; Haegeman *et al.*, 2013; Jaouannet *et al.*, 2013; Truong *et al.*, 2015). Además de la reprogramación celular, las principales funciones patogénicas de las secreciones del RKN son: facilitar la invasión del tejido por digestión enzimática de células y evadir respuestas inmunes de la planta por supresión directa o indirecta de las defensas (Vieira y Gleason, 2019). La identificación de los genes que codifican estos efectores es posible gracias a los avances en tecnologías de secuenciación y métodos bioinformáticos, particularmente los análisis transcriptómicos generados sobre la glándula esofágica. Además, estos permiten la comparación de la regulación de los genes en diferentes estadios de desarrollo del RKN (Mejias *et al.*, 2019; Vieira y Gleason, 2019). La evaluación de los perfiles de expresión de estos genes también es posible por medio de la técnica de la reacción en cadena de la transcriptasa-polimerasa inversa cuantitativa (qRT-PCR, por sus siglas en inglés). Su aplicación permite analizar si determinado gen cumple una función específica sobre el hospedero durante las etapas del parasitismo (Rutter *et al.*, 2014). Cabe mencionar que un gran número de los efectores se clasifican en familias de genes compartidos entre especies de *Meloidogyne*, lo cual propone un rol importante del efector en las especies en cuestión.

El potencial patogénico de *M. enterolobii* sobre cultivos de importancia es una amenaza alimentaria debido a la falta de estrategias efectivas en la erradicación de este fitoparásito una vez que se establece en el suelo, por lo que las pérdidas en la producción y el incremento en los costos derivados del manejo de este patógeno pueden superar el beneficio económico de un sistema agrícola.

Así mismo, con el objetivo de salvaguardar la salud humana, animal y ambiental, el empleo de

sustancias tóxicas no debe ser desmesurado ni arraigado en el control del nematodo. Diversos estudios han explorado las proteínas responsables del éxito del proceso de parasitismo dentro de las células vegetales. Además de la caracterización funcional de los efectores patogénicos, estos estudios han buscado determinar si la expresión de los genes involucrados en la producción de estas proteínas está relacionada a etapas tempranas o tardías del parasitismo, o bien, durante diferentes estadios de desarrollo del nematodo. No obstante, la mayoría de los enfoques para los análisis de efectores e investigaciones histológicas suelen limitarse al estudio de *M. incognita* en cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*) en suelo o en *Arabidopsis thaliana* en condiciones *in vitro*. Por lo tanto, aún es escasa la información sobre el parasitismo y patogénesis de una especie tan agresiva como *M. enterolobii* en otros cultivos hortícolas de importancia como el pepino.

Al considerar la elevada patogenicidad de *M. enterolobii* y la actual falta de técnicas de control efectivas, el mejor entendimiento de la biología y del proceso de parasitismo del nematodo podrá utilizarse en un futuro cercano para el desarrollo de técnicas de control con el uso de nematicidas y materiales vegetales resistentes. Así mismo, la información generada sobre una técnica clave como la extracción de huevos en NaOCl tiene el potencial de permitirnos una mejor cuantificación de poblaciones, una mayor viabilidad del inóculo extraído, lo cual reduciría la variabilidad en respuestas observadas en experimentos. Con base en lo anterior, se propone llevar a cabo estudios para evaluar el efecto del método de NaOCl en la extracción y viabilidad de huevos de *M. enterolobii*. Así mismo, analizar el proceso del desarrollo de *M. enterolobii* y de las alteraciones histológicas causadas en las raíces de pepino. Finalmente, se propone estudiar la expresión de genes actualmente relacionados a la patogenicidad durante su ciclo de parasitismo en raíces de pepino. Este escenario, tiene la capacidad de elucidar factores determinantes para la patogénesis de *M. enterolobii* en el pepino, mejorando la descripción y el entendimiento de los mecanismos de interacción y de la variabilidad en las respuestas involucradas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Importancia Económica y Clasificación Taxonómica del Pepino

En México, en el año 2021 se produjeron 1 millón 39 mil t de pepino, con un rendimiento promedio de 49 t ha<sup>-1</sup>. El 30% de esta producción (314,150 t) provino de Sinaloa. En este año, la superficie sembrada con el cultivo de pepino en el estado de Sinaloa fue de 3,985 ha, un 6% de la superficie dedicada a hortalizas, con un rendimiento de 63 t/ha. El valor de la producción fue de 2,420 millones de pesos, alrededor del 11% del valor de producción de hortalizas (SIAP, 2023).

La familia Cucurbitaceae consiste en cerca de 120 géneros y más de 800 especies, todas las plantas comestibles corresponden a la subfamilia Cucurbitoideae y se dividen en dos tribus: la Sicyoideae y Cucurbiteae, a esta última pertenece el género *Cucumis*, siendo *C. sativus*, la especie conocida como pepino (Cuadro 1) (Welbaum, 2015).

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica del pepino.

Clasificación	Nombre
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Cucurbitales
Familia	Cucurbitaceae
Subfamilia	Cucurbiteae
Tribu	Cucurbiteae
Género	<i>Cucumis</i>
Especie	<i>sativus</i>

(Welbaum, 2015).

### 2.2. Nematodos que Afectan al Cultivo de Pepino

El cultivo de pepino es afectado por distintos géneros y especies de nematodos fitoparásitos como *Ditylenchus destructor*, *Heterodera trifolii*, *Hoplolaimus indicus*, *Longidorus africanus*, *Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis* y *Tylenchorhynchus vulgaris*. El daño ocasionado por

estos nematodos puede reducir severamente su crecimiento y rendimiento, además, algunas de estas especies pueden desarrollar relaciones sinérgicas con otros microorganismos patógenos en complejos de enfermedades (Ravichandra, 2014).

La mayoría de los cultivares comerciales de pepino presentan mayor susceptibilidad a *M. incognita* y *M. enterolobii*. El daño ocasionado por *M. incognita* se ha observado en hasta 100% de raíces agalladas con consecuente reducción del crecimiento (Mukhtar *et al.*, 2013). El daño ocasionado por *M. enterolobii* en el pepino se ha descrito en un 49% de raíces agalladas (Gómez-González *et al.*, 2020). Si bien algunos materiales han demostrado cierto grado de resistencia a *M. incognita*, actualmente no existen materiales comerciales con resistencia a *M. enterolobii* (Rashidifard *et al.*, 2018). El primer reporte de *M. enterolobii* parasitando el cultivo de pepino se realizó en Suiza por Kiewnick en el 2008; en México, fue reportada en el año 2020 por Gómez-González *et al.*,

### 2.3. Clasificación Taxonómica y Especies de Importancia de *Meloidogyne*.

En 1949, Chitwood redescubrió y clasificó dentro del género *Meloidogyne* (propuesto por Göldy en 1887) a las cuatro especies más comunes y ampliamente distribuidas: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*, que aún eran consideradas como *Heterodera radicícola* o *Heterodera marioni* (Cuadro 2); así mismo introdujo el concepto de diferenciación de especies con base al patrón anular de la región perineal de la hembra, herramienta básica en la diferenciación de especies de *Meloidogyne* previo a la identificación molecular. Actualmente se conocen más de 100 especies de *Meloidogyne*, y la mayoría de las hortalizas de importancia pueden ser hospederas de algunas de éstas (Ravichandra, 2014). La mayoría de las poblaciones de nematodo de nódulo se componen por *M. incognita*, *M. javanica*, *M. enterolobii*, *M. arenaria*, y *M. hapla*. Las primeras tres son ampliamente distribuidas en regiones tropicales, subtropicales y climas templados cálidos, mientras que *M. arenaria* también es encontrada en tales climas, pero es relativamente menos frecuente. Se han descrito cuatro razas de *M. incognita*, designadas como raza 1, raza 2, raza 3 y raza 4; mientras que, en *M. arenaria* se han descrito la raza 1 y raza 2, no obstante, las razas 1 y 2 en *M. incognita* y la raza 2 de *M. arenaria* son las más ampliamente distribuidas (Ravichandra, 2014). Por su parte, *M. enterolobii* fue considerada una especie emergente; pero en la actualidad, se cataloga como una de las más importantes dentro del género debido a su amplia distribución

geográfica, amplio rango de hospedantes y su habilidad para superar la resistencia de cultivos importantes que poseen genes de resistencia a *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. incognita* (Sikora y Fernández, 2005).

**Cuadro 2.** Clasificación taxonómica del género *Meloidogyne*.

Clasificación	Nombre
Reino	Animalia
Phylum	Nematoda
Clase	Secernentea
Orden	Tylenchida
Súper familia	Tylenchoidea
Familia	Heteroderidae
Subfamilia	Meloidogyninae
Género	<i>Meloidogyne</i>

(Maggenti, 1981).

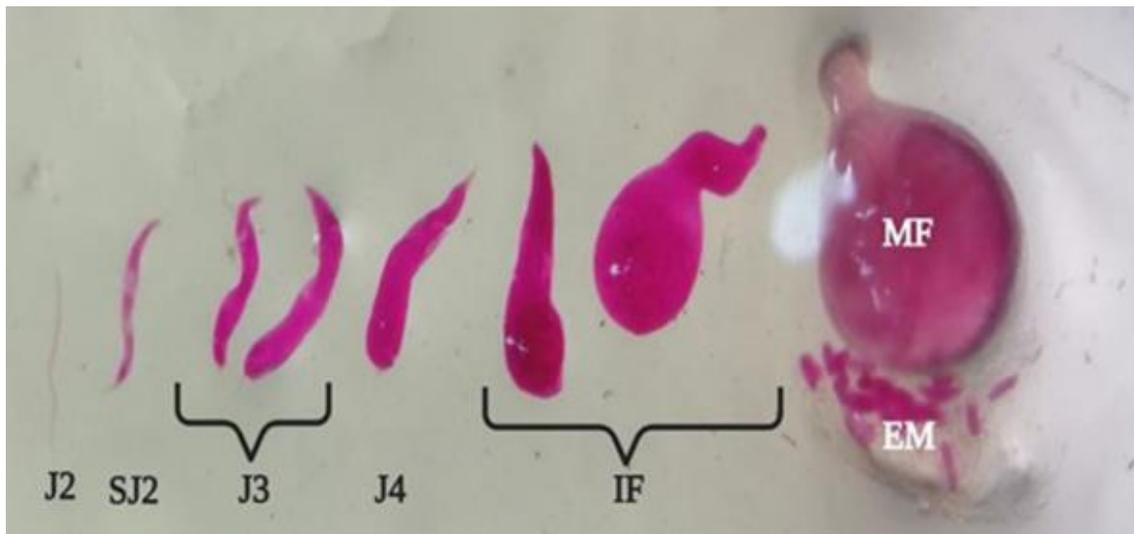
Se considera que *M. enterolobii* es una especie que muestra poca variabilidad genética, por lo que no se han descrito razas o subespecies. No obstante, *M. enterolobii* posee la mayor cantidad de genes expresados (37,000), así como la mayor cantidad de proteínas secretoras predichas. Lo anterior se refleja en la competitividad de esta especie en las células vegetales, en su sistema inmune único, su capacidad de superar la resistencia en planta, su amplio espectro de hospederos, su elevado nivel de patogenicidad, y su respuesta al estrés (Li *et al.*, 2016; Shao *et al.*, 2020).

#### 2.4. Ciclo Parasitológico de *Meloidogyne* spp.

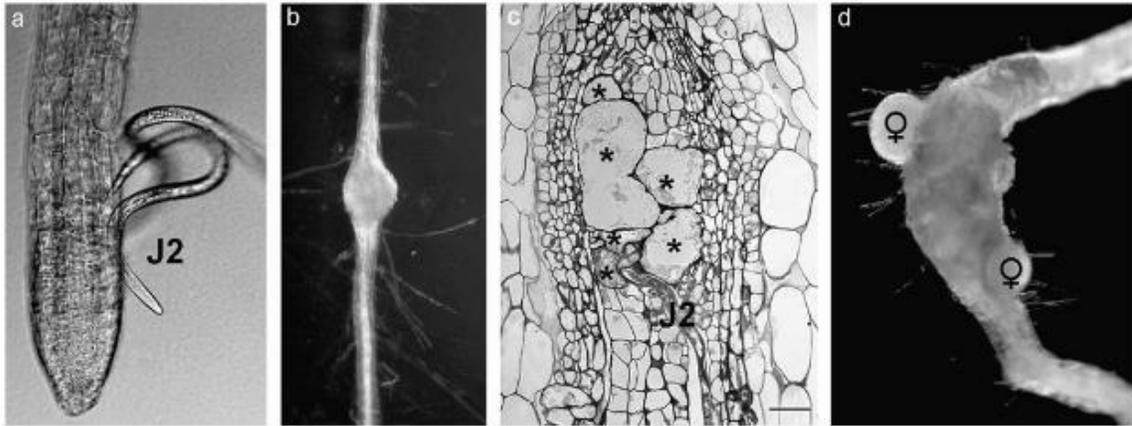
El ciclo de parasitismo del RKN involucra el desarrollo de cuatro estadios juveniles (J1-J4) y un estadio adulto reproductivo (Figura 1). El J2 es la única etapa infecciosa y puede desplazarse hasta 100 cm en el suelo en busca de un hospedante susceptible cuando la humedad del suelo es óptima. Cada transición entre estadios es precedida por una muda de cutícula. El J2 se forma dentro del huevo, eclosiona y migra en el suelo para localizar tejido susceptible a la invasión. Para penetrar la raíz, el J2 rompe células epidérmicas ubicadas cerca de la zona de elongación por medio de fuerza mecánica ejercida con el estilete y por digestión enzimática. Una vez dentro del tejido

cortical, el J2 se mueve intercelularmente hacia el punto de crecimiento, donde gira para alcanzar el cilindro vascular en diferenciación en las células parenquimáticas del xilema. Después de situar su cabeza en el tejido vascular, el J2 comienza a modificar y regular el fenotipo, función y metabolismo de alrededor de seis células para formar un sitio de alimentación especializado, del cual dependerá para alimentarse, desarrollarse y reproducirse (Ding *et al.*, 1998). El núcleo de estas células en alteración se divide extensivamente en numerosos núcleos poliploides (>100) sin constituir nuevas paredes celulares, por lo que aumentan su tamaño en alrededor de 300 veces, mientras que algunas paredes adyacentes colapsan y desaparecen (Caillaud *et al.*, 2008).

Después de la cuarta y final muda puede emerger el macho adulto que de nuevo posee forma de gusano, aunque ya no es capaz de alimentarse; por su parte, la hembra permanece sedentaria, continúa su alimentación, crecimiento en grosor y un poco en longitud, por lo que toma una forma de pera (Figura 2). La hembra puede producir huevos con o sin fertilización de un macho, ésta deposita los huevos en una cubierta protectora gelatinosa dentro o fuera del tejido vegetal dependiendo de la ubicación de la misma (Ravichandra, 2014). El ciclo de *M. enterolobii* en el cultivo de tomate se ha descrito en alrededor de 21 días desde la inoculación hasta la invasión de la segunda generación (Costa *et al.*, 2020).



**Figura 1.** Estadios de desarrollo de *Meloidogyne enterolobii*. J2: segundo estadio juvenil pre-parasítico. SJ2: segundo estadio juvenil hinchado. J3: tercer estadio juvenil. J4: cuarto estadio juvenil. IF: estadio adulto (hembras inmaduras). MF: estadio adulto (hembra madura). EM: masa de huevos (Collet *et al.*, 2023).



**Figura 2.** Ciclo patogénico de *Meloidogyne incognita* en *A. thaliana*. Segundo estadio juvenil infectivo (J2) penetrando detrás del ápice (a). Típica formación de agalla (b). Corte de agalla mostrando las células gigantes (\*) (c). Hembra adulta en forma de pera (♀) (d) (Caillaud *et al.*, 2008).

## 2.5. Efectores Patogénicos de *Meloidogyne* spp.

Con el propósito de identificar genes con potencial para utilizarse en la selección de resistencia vegetal, en los últimos años se ha realizado esfuerzos para identificar las funciones de las proteínas efectoras responsables del éxito del parasitismo del RKN (Mejias *et al.*, 2019). Los efectores del RKN son proteínas secretadas a través del estilete, anfidias o cutícula, las cuales son dirigidas a componentes/rutas moleculares del hospedante que son importantes para el desarrollo de interacciones compatibles, en parte, imitando la expresión de los genes del hospedante y favoreciendo así el parasitismo (Ali *et al.*, 2017).

La acción de estos efectores proteicos del RKN, se clasifica en aquellos empleados para facilitar la invasión de raíces, evitar las respuestas de defensa de la planta, reprogramación de las células de la raíz para formar los sitios de alimentación especializados y promoción de la supervivencia y reproducción del nematodo. Una gran cantidad de los efectores caracterizados han sido relacionados a la supresión de las defensas de hospedante (Cuadro 3).

La mayoría de las proteínas efectoras son pioneras y sin dominios funcionales conocidos, no obstante, la identificación de estas moléculas es posible gracias a los avances en tecnologías de secuenciación y métodos bioinformáticos que representan la aproximación más conveniente para la identificación de genes putativos codificantes de proteínas efectoras secretadas. Así mismo, los

análisis transcriptómicos generados, particularmente sobre la glándula esofágica, considerada como uno de los sitios principales de producción de efectores, hacen posible la identificación de nuevos genes y permiten la comparación de la regulación de estos en diferentes estadios de desarrollo (Mejias *et al.*, 2019; Vieira y Gleason, 2019). Además, el repertorio de secreciones para alterar las funciones de la planta puede incluir moléculas tales como metabolitos secundarios, glucolípidos, hormonas análogas y pequeños ARNs (Mejias *et al.*, 2019).

**Cuadro 3.** Efectores involucrados en la supresión de defensas en planta por *Meloidogyne* spp.

Nombre	Anotación de proteína	EP	Referencia
Mc-1194	NA	Temprana	Davis <i>et al.</i> , 2015
Me-TCTP	Proteína tumoral controlada por traducción	Temprana	Zhuo <i>et al.</i> , 2017
Mg-01965	Dominio lectina tipo C	Temprana	Zhuo <i>et al.</i> , 2018
Mg-16820	NA	Temprana	Naalden <i>et al.</i> , 2018
Mg-GPP	NA	Temprana	Chen <i>et al.</i> , 2017
Mg-PEL1	Pectato liasa	Temprana	Chen <i>et al.</i> , 2021
Mh-265	NA	Temprana	Gleason <i>et al.</i> , 2017
Mi-03329	Dominio lectina tipo C	Temprana	Zhou <i>et al.</i> , 2023
Mi-CM3	Corismato mutasa	Temprana	Wang <i>et al.</i> 2018
Mi-CTL1	Dominio lectina tipo C	Temprana	Zhao <i>et al.</i> 2021
Mi-ISE5	NA	Temprana	Shi <i>et al.</i> , 2018
Mi-ISE6	NA	Temprana	Shi <i>et al.</i> , 2018
Mi-MSP40	Toxina putativa Shkt C-terminal	Temprana	Niu <i>et al.</i> , 2016
Mi-SGCR1	Pequeña proteína rica en glicina y cisteína	Temprana	Nguyen <i>et al.</i> , 2018
Mi-VAP2	Proteína veneno tipo alergenico	Temprana	Wang <i>et al.</i> , 2007
Mj-2G02	Dominio ShKT	Temprana	Huang <i>et al.</i> , 2003; Song <i>et al.</i> , 2021
Mj-TTL5*	Proteína TipoTranstiretin 5	Temprana	Lin <i>et al.</i> , 2016
Mg-MO237	NA	Tardía	Chen <i>et al.</i> , 2018
Mi-PDCD6	NA	Tardía	Kamaruzzaman <i>et al.</i> , 2022
Mi-PDI1	Proteína disulfido isomerasa	Tardía	Zhao <i>et al.</i> 2020
Mi-SP12	NA	Tardía	Xie <i>et al.</i> , 2016
Mi-TSP_c	NA	Tardía	Pu <i>et al.</i> , 2022
Mj-FAR-1	Ácido graso y unión de retinol	Tardía	Iberkleid <i>et al.</i> , 2013
Ma-DnaJ	NA	Ambas	Grijalva-Mañay <i>et al.</i> , 2019
Mg-PDI	Proteína disulfido isomerasa	Ambas	Tian <i>et al.</i> , 2019
Mi-ACPS	NA	Ambas	Pu <i>et al.</i> , 2022
Mi-CRT	Calreticulina	Ambas	Jaubert <i>et al.</i> , 2002a, 2005; Jaouannet <i>et al.</i> , 2013
Mi-EFF18	NA	Ambas	Mejias <i>et al.</i> , 2020
Mi-EFh	NA	Ambas	Pu <i>et al.</i> , 2022
Mi-GST_N_4	NA	Ambas	Pu <i>et al.</i> , 2022
Mi-GSTS1	Glutation-S-transferasa	Ambas	Dubreuil <i>et al.</i> , 2007
Mi-ISC-1	Isocorismatasa	Ambas	Qin <i>et al.</i> , 2022

NA=Proteína no anotada, EP= Etapa del parasitismo.

## 2.6. Análisis de Expresión Génica

Con el fin de conocer el nivel de expresión de un gen en cuestión, la técnica PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo-real (qRT-PCR, por sus siglas en inglés) es empleada debido a que permite la detección de los pequeños cambios dinámicos en los transcritos del ARN mensajero (ARNm) de un gen candidato entre muestras (Heid *et al.*, 1996; Ginzinger, 2002). El punto final cuantitativo para la PCR en tiempo real es el ciclo umbral (Ct o Cq). El Ct se define como el ciclo de PCR en el que la señal del tinte fluorescente reportero cruza un umbral colocado arbitrariamente. Al presentar datos como Ct, se asegura que la PCR esté en la fase exponencial de la amplificación. El valor numérico del Ct está inversamente relacionado con la cantidad de amplicón en la reacción (es decir, cuanto menor sea la Ct, mayor es la cantidad de amplicón) (Schmittgen y Livak, 2008). Respecto al cálculo de la eficiencia de la amplificación de la qRT-PCR, el estándar es el uso de la estimación por medio de un conjunto de diluciones seriadas de las muestras de ADNc (Hellemans *et al.*, 2007). Sin embargo, distintas fuentes de error como el pipeteo deficiente y la presencia de inhibidores de la PCR en el ADNc, pueden llevar a una estimación errónea comúnmente observada como una sobreestimación con valores superiores al 100% (Robledo *et al.*, 2014). Entre los métodos que permiten una fácil estimación de la eficiencia se encuentra LinRegPCR, este algoritmo estima la línea base por reconstrucción de la fase log lineal hacia abajo desde la fase inicial de meseta de la reacción de la PCR. Así, los valores de eficiencia de la PCR se determinan por muestra ajustando una línea de regresión a un subconjunto de puntos de datos en la fase log-lineal. Como resultado, la variabilidad y el sesgo en los resultados de la PCR cuantitativa son reducidos (Ruijter *et al.*, 2009).

### 2.6.1. Genes de Referencia (RG)

Las principales características de un RG son: una expresión constante y que no sea afectado por los factores experimentales ni por los estadios biológicos bajo investigación. El RG seleccionado es utilizado como un control interno para normalizar las concentraciones de ARNm en las muestras y controlar las variaciones ocasionadas en su extracción, retrotranscripción hacia ADN

complementario (ADNc), y en la eficiencia de amplificación de la PCR. Se ha manifestado que una normalización respecto a un RG individual es aceptable si se presenta evidencia clara que confirme su expresión invariable bajo las condiciones experimentales descritas (Bustin *et al.*, 2009). En consecuencia, se han propuesto herramientas que utilizan distintos RG para la normalización (Ling, 2012; Ballester *et al.*, 2013). Así mismo, con el objetivo de perfilar a los mejores candidatos como genes de referencia estables, se han propuesto algunos métodos como son geNorm, NormFinder, BestKeeper, y RefFinder. Este último integra a los anteriores y al método comparativo de Ct (Vandesompele *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2004; Pfaffl *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2012).

2.6.1.1. Genes de referencia en *Meloidogyne* spp. Dada la importancia de la descripción de expresión de genes patogénicos en *Meloidogyne* spp., Wu *et al.* (2019); así como, Hu y DiGennaro (2019), evaluaron distintos RG en *M. incognita* y *M. hapla*. Estos estudios incluyeron distintos genes candidatos, así como RG comúnmente utilizados (*Actin1*, *EF1- $\alpha$* , *GAPDH* y  *$\alpha$ -Tub*). No obstante, sus resultados demostraron que estos RG no fueron adecuados en la normalización de los niveles de expresión en *M. hapla*. Los autores expusieron que los genes malato deshidrogenasa (*MDH*), complejo succinato deshidrogenasa subunidad A (*SDHA*), y proteína *S6* ribosomal 40S (*RPS6*) fueron los más estables. Los dos últimos, particularmente estables durante los estadios de desarrollo, mientras que *MDH* y *RPS6* fueron apropiados para tratamientos con temperatura y compuestos inorgánicos. En *M. incognita*, también se determinó que el gen *Actin1* no fue adecuado como RG durante el ciclo de vida del nematodo, mientras que los genes proteína disulfuroisomerasa (*DISU*), proteína unión poliadenilato (*POLY*), proteína de transporte (*PTP*), y quinasa serina/treonina-proteína (*SK*) fueron los genes que se expresaron de forma estable.

## **2.6.2. El Método MCMC.qpcr para el Análisis de Información de qRT-PCR**

El enfoque MCMC.qpcr puede tratar adecuadamente las más altas variaciones de muestreo asociadas con objetivos bajos en abundancia; así mismo, proporciona una forma natural de

incorporar supuestos sobre la estabilidad de los genes de control directamente en el proceso de ajuste del modelo. En el método MCMC.qpcr, los datos de qPCR sin procesar se representan como recuentos de moléculas y se describen utilizando modelos lineales generalizados mixtos bajo el error Poisson-lognormal. Se utiliza un algoritmo de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) para probar desde la unión posterior de la distribución sobre todos los parámetros del modelo, estimando así los efectos de todos los factores experimentales en la expresión de cada gen. El modelo basado en Poisson permite la especificación correcta de la relación de varianza media del proceso de amplificación de la PCR, y también puede obtener información de instancias sin amplificación (recuentos cero) (Matz *et al.*, 2013). Este método es muy flexible con respecto a los genes de control: cualquier conocimiento previo sobre el grado esperado de su estabilidad puede ser directamente incorporado en el modelo. Sin embargo, el método proporciona respuestas sensatas sin tales suposiciones, o incluso en la completa ausencia de genes de control. También presenta un análogo bayesiano natural del análisis que utiliza pasos estándar de preprocesamiento de datos (transformación logarítmica y normalización múltiple de gen) pero estima todos los cambios de expresión génica conjuntamente dentro de un solo modelo. Estos métodos son considerablemente más flexibles y potentes que el análisis estándar delta-delta Ct basado en pruebas t por pares. Los modelos completos Bayesianos "informado" e "ingenuo" representan un enfoque conservador para inferir cambios de pliegue en el análisis de datos qRT-PCR; sin embargo, el modelo "clásico" (análogo bayesiano) lo hace con intervalos de confianza más estrechos. Además, se recomienda el modelo clásico para enfrentar las variaciones sistemáticas de las condiciones experimentales (Matz *et al.*, 2013).

La estructura del modelo toma la forma:

$$\Psi_{gijk} = \log(\lambda_{gijk}) = I_g + B_{ig} + t_k + a_{jg} + S_{kg}$$

Donde:

$I_g$  es una intersección específica del gen. Representa el nivel de línea de base de expresión de

cada gen bajo la "referencia" o combinación de tratamientos experimentales (factores fijos), a los que todos los demás efectos del tratamiento se compararán.

$B_{ig}$  es el efecto fijo del tratamiento  $i$  en el gen  $g$ . Este término deriva de la matriz de diseño experimental, y consiste en una serie de efectos fijos específicos del gen de principal relevancia biológica del estudio.

$t_k$  es un efecto aleatorio destinado a capturar la carga de plantilla desigual (por lo tanto,  $t$ ) en réplica biológica  $k$ . Intuitivamente, esto explica la realidad de que, todo lo demás siendo igual, las réplicas biológicas pueden todavía diferir sistemáticamente en los números de copias de transcripción a través de todos los genes debido a la variación en la cantidad bruta y/o calidad de ARN entre muestras. Estos efectos se modelan con un supuesto Gaussiano, donde la varianza específica del gen es común a todas las réplicas.

$a_{jg}$  es el efecto aleatorio específico del gen asociado con el nivel  $j$ ésimo de alguna variable de agrupación, como bloque, parcela, o colonia, dependiendo del diseño experimental. Estos efectos son modelados con un supuesto Gaussiano cuya varianza puede ser específica del gen.

$S_{kg}$  captura la variación residual en diferentes muestras biológicas, suponiendo que algunos genes puedan variar más que otros. Estos efectos se modelan con un supuesto Gaussiano cuya varianza también puede ser específica del gen.

### **3. HIPÓTESIS**

1. Se aumentará o se reducirá el nivel de extracción y la viabilidad de huevos de *M. enterolobii* al modificar los periodos de agitación y concentraciones de NaOCl.
2. Se observarán los periodos de los diferentes estadios de desarrollo de *M. enterolobii* durante el parasitismo en raíces de pepino.
3. El nivel de expresión de los genes evaluados mostrará uniformidad durante el ciclo patogénico de *M. enterolobii* en las raíces de pepino.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Describir el Parasitismo y la Patogénesis de *Meloidogyne enterolobii* en Raíces de Pepino.

### 4.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar la viabilidad de huevos de *M. enterolobii* extraídos por periodos agitación de 8, 12, 16, y 20 minutos y concentraciones de NaOCl de 0.3, 0.5, 0.75, y 1.0%.
2. Describir el periodo de los estadios de *M. enterolobii* en raíces de pepino mediante tinción del nematodo en la raíz con fucsina ácida y análisis histopatológico con tinción diferencial.
3. Evaluar mediante qRT-PCR la expresión de los genes *SDHA*, *RPS6*, *MDH*, *POLY*, *SMG1*, *SP12*, *TCTP*, *PDCD6*, *CRT*, *TTL5*, y *DISU* de *M. enterolobii* durante el parasitismo en pepino.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Extracción de Huevos de *M. enterolobii* en NaOCl versus Infectividad del Inóculo en Pepino

#### 5.1.1. Inóculo de *Meloidogyne enterolobii*

Se sembraron semillas de pepino cv. Espada en macetas de plástico conteniendo 3,000 cm<sup>3</sup> de una mezcla de arena y sustrato (1:2 v/v). Cada maceta se inoculó en la etapa de desarrollo de la planta de dos hojas verdaderas con una masa de huevos de *M. enterolobii* previamente aislada e identificada molecularmente (Gómez-González *et al.*, 2020). Se permitió la reproducción del nematodo durante 50 días en invernadero.

#### 5.1.2. Establecimiento de los Experimentos

El diseño experimental fue de dos factores (nivel de NaOCl y periodo de agitación) con 4 niveles cada uno. Las variables de respuesta fueron: la extracción de huevos, eclosión de huevos, huevos producidos, y agallamiento.

5.1.2.1. Extracción de huevos. Las raíces infectadas se lavaron y se cortaron en segmentos de 1 cm para ser mezcladas para su homogenización en agua destilada. Después de un drenado corto, muestras de raíz de 20 g fueron seleccionadas para cada extracción. Una solución de hipoclorito de sodio 6% A.I. (ICR, México) fue diluida con agua destilada (pH 7.0) para obtener las concentraciones finales de: 0.3, 0.5, 0.75 y 1.0%. La agitación se realizó con un agitador magnético Hanna HI322 (Smithfield, RI) a 400 rpm en Matraces de 500 mL. Los periodos de agitación fueron: 8, 12, 16, y 20 minutos. El arreglo experimental fue completamente aleatorizado con seis réplicas. Después de agitar, se vertieron diluciones sobre tamices anidados de 75, 45 y 25 µm de malla de

poro y se lavaron varias veces con agua destilada para eliminar residuos de NaOCl. Se recogieron los huevos en agua del grifo esterilizada y fueron contados para evaluar el nivel de la extracción. Inmediatamente después de contar, los huevos de cada réplica se usaron como inóculo en las pruebas adicionales.

5.1.2.2. Eclosión de huevos. Se estableció una capa de tejido Kimwipe en tamices de nylon en bandejas llenas de agua del grifo esterilizado (técnica de Baermann modificada). Alícuotas de cada replicación de los tratamientos de extracción conteniendo  $1,000 \pm 10$  huevos se extendieron en el tejido Kimwipe para permitir la eclosión y migración de los J2. Se usaron tamices de nylon con muestras de tejido agallado como control. Las bandejas se colocaron en un arreglo aleatorizado en el laboratorio a  $26^{\circ} \text{C}$  durante cinco días (Hooper *et al.*, 2005). Las larvas se recolectaron y se contaron diariamente.

5.1.2.3. Reproducción. Se trasplantaron individualmente en macetas de 1.6 litros plántulas de pepino cv. Espada de dos semanas después de la siembra (WAP). Las macetas fueron llenadas de suelo (7% de arena, 60% de limo, 33% de arcilla; pH 6.8). pasteurizado ( $100^{\circ}\text{C} \times 45$  minutos). Dos agujeros de 4 cm de profundidad y 1 cm de ancho fueron hechos en el suelo que rodea cada plántula con el uso de una pipeta. Luego, cada maceta fue inoculada con una alícuota de 10 mL que contenía  $1,500 \pm 15$  huevos de cada replicación de tratamientos de extracción. La inoculación con  $300 \pm 6$  J2 se usó como control (Dong *et al.*, 2007). Las macetas se establecieron en un arreglo de bloques completos aleatorizados con seis repeticiones. Las plántulas se desarrollaron durante cinco semanas después de la inoculación (WAI) en un invernadero a 21 a  $33^{\circ}\text{C}$ . Las macetas fueron regadas diariamente. Finalmente, las raíces se lavaron en agua del grifo, y luego cada sistema de raíz completo se agitó durante 10 minutos con NaOCl al 0.5% para determinar la producción de huevos (Stetina *et al.*, 1997).

5.1.2.4. Pruebas de infectividad. Se trasplantaron dos plántulas de pepino de tres WAP en macetas de 15 litros llenas de tierra como se describió anteriormente. Luego, cada maceta se inoculó con una alícuota de 20-mL conteniendo  $6,000 \pm 30$  huevos de cada replicación de tratamientos de

extracción. La inoculación con agua o  $1,200 \pm 12$  J2 se usaron como controles negativos y positivos (Dong *et al.*, 2007). Se usó un arreglo de bloques completos con cuatro réplicas. Se permitió que las plántulas se desarrollaran durante 17 WAI en un invernadero con temperatura que oscilaba de 14 a 29°C y riego diario. Más tarde, las raíces de pepino se extrajeron y se lavaron. Los porcentajes de daño se consideraron visualmente al comparar los sistemas de raíz de los tratamientos de huevos con contra raíces sanas del tratamiento de control. Finalmente, se cortaron las raíces y se tomaron las muestras como se describe anteriormente para determinar las cantidades de huevos por gramo de raíz.

### **5.1.3. Análisis Estadístico**

Antes del análisis estadístico, los datos de ambos ensayos de cada experimento se combinaron. Entonces, los datos a partir de los recuentos de huevos se transformaron por logaritmo natural. Los datos de J2 se ajustaron primero restando la cantidad promedio de J2 obtenida en el control y luego transformados a raíz cuadrada. Los datos se analizaron utilizando el procedimiento GLM para un ANOVA bidireccional para determinar la importancia de ambos factores. Se usó la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) ( $\alpha = 0.05$ ) para determinar el efecto principal (SAS v.9.1) (SAS Instituto, Cary, NC). De la misma manera, se utilizó una prueba de coeficiente de correlación de Pearson para establecer relaciones entre el número de huevos producidos y la eclosión de J2. Además, estos datos también fueron analizado por regresión con números de J2 como la variable independiente (Sigmaplot v.14) (Systat Software, San José, CA).

## **5.2. Periodos de los Estadios de *M. enterolobii* en Raíces de Pepino**

### **5.2.1. Tinción de *Meloidogyne enterolobii* con Fucsina Ácida en Raíces de Pepino**

El diseño experimental fue de un factor (periodo) con 20 niveles (días). La variable de respuesta fue el estadio de desarrollo del nematodo.

5.2.1.1. Establecimiento de experimentos. Se sembraron semillas de pepino cv. Centenario en una charola de 120 cavidades. En etapa de dos hojas verdaderas, se inoculó cada plántula con una alícuota de 1 mL conteniendo 5,000 huevos de *M. enterolobii* usando una micropipeta. Inmediatamente se trasplantaron por triplicado en macetas de 1 L llenadas con una mezcla esterilizada de arena y sustrato a razón 1:1 v/v. Se establecieron 40 macetas dispuestas en arreglo completamente al azar en invernadero. Las macetas se regaron diariamente.

5.2.1.2. Tinción con fucsina ácida. A partir del primer día posterior a la inoculación (dpi), se tomaron diariamente las raíces de dos macetas. Éstas se lavaron cuidadosamente con agua, se cortaron en segmentos de alrededor de 2 cm, y se colocaron en solución de NaOCl al 1.5% durante 5 minutos para el aclaramiento del tejido previo a la tinción. Posteriormente, se enjuagaron con agua y se dejaron remojar en 200 mL de agua limpia en vaso de precipitados de 500 mL de capacidad por 15 minutos. La tinción de fucsina ácida se preparó con 3.5 g de fucsina ácida, 250 mL de ácido acético y 750 mL de agua destilada, mezclando al agregar cada componente (Shukla *et al.*, 2018). Después del remojo, se agregó 1 mL de la tinción de fucsina ácida por cada 10 mL de agua en el vaso de precipitados. Se colocó el vaso sobre una placa calefactora a 300°C hasta el punto de ebullición y 30 segundos adicionales. Se permitió que la solución se enfriara a temperatura ambiente para su posterior drenado. Las raíces teñidas se colocaron en porta objetos y se analizaron en un microscopio CARL ZEISS (Axio Imager A2) utilizando microscopía en campo oscuro.

5.2.1.3. Análisis estadístico. Durante el análisis por microscopía, se identificaron y cuantificaron los nematodos según su estadio de desarrollo. Se graficaron los valores de cada estadio agregando  $\pm$  la desviación estándar. Se utilizó el programa SigmaPlot versión 14.5 (Systat Software, San José, CA).

## **5.2.2. Estudio Histopatológico de *Meloidogyne enterolobii* en Raíces de Pepino**

El diseño experimental fue de un factor (periodo) con 5 niveles (3, 5, 8, 12 y 17 días). Se describió el estado del tejido.

5.2.2.1. Establecimiento de experimentos. Se sembró una charola de 120 cavidades con semillas de pepino cv. Centenario. En etapa de dos hojas verdaderas, se inoculó cada plántula con una alícuota de 1 mL conteniendo 5,000 huevos de *M. enterolobii* con ayuda de una micropipeta. Inmediatamente se trasplantaron por triplicado en macetas de 1 L llenadas con una mezcla esterilizada de arena y sustrato a razón 1:1 v/v. Se establecieron 20 macetas dispuestas en arreglo completamente al azar en invernadero. Las macetas se regaron diariamente.

5.2.2.2. Procesamiento del tejido. Se tomaron raíces de dos macetas a los 3, 5, 8, 12 y 17 dpi. Éstas se lavaron cuidadosamente y se colocaron durante al menos 12 h en solución fijadora: de 2% de paraformaldehído y 1% de glutaraldehído en 0.5 x de solución tampón fosfato salino (pH 7.2) (Nguyễn *et al.*, 2014). El tejido se colocó en casetes histológicos y se deshidrató en soluciones seriadas de alcohol del 10-100% durante una hora c/u. Posteriormente, los casetes se colocaron en alcohol absoluto y xileno a razón 1:1 v/v líquida a 60°C durante 2 h en tres ocasiones. Finalmente, se colocaron en moldes de acero, se cubrieron con abundante parafina y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Después de retirar los casetes de los moldes, se colocaron en microtomo y se procedió a realizar cortes de 10 µm de grosor. Los cortes se colocaron flotando en un baño maría a 30°C y fueron recolectados manualmente con porta objetos impregnados con adhesivo Haupt (12% glicerol y 1% grenetina). Los porta objetos se colocaron sobre placa caliente (50°C) por alrededor de 2 h o hasta secar. Una vez secos, se colocaron en una gradilla de acero para plato de tinción. Se sumergió la gradilla en xileno durante 5 minutos en tres ocasiones y 5 minutos en alcohol absoluto. Se rehidrató el tejido en soluciones al 96, 70 y 50% de alcohol durante 3 minutos c/u. Se tiñeron durante dos horas en safranina al 1% en solución de 50% de alcohol. Posterior a la tinción con safranina, se procedió a deshidratar el tejido en soluciones al 60, 80 y 96% de alcohol durante 3 minutos c/u. A continuación, se tiñeron durante 90 s en solución de 96% de alcohol con verde rápido al 1% (Cruz-Lachica *et al.*, 2018). Se retiró el exceso de tinción en alcohol absoluto y en xileno durante 5 minutos c/u. El montaje se realizó con resina Entellan y se observaron en un microscopio CARL ZEISS (Axio Imager A2) utilizando microscopía en campo claro.

### 5.3. Análisis de Expresión Génica de *M. enterolobii* en Raíces de Pepino

El diseño experimental fue de un factor (periodo) con 5 niveles (3, 5, 8, 12 y 17 días). La variable de respuesta fue el nivel expresión génica.

#### 5.3.1. Establecimiento de Experimentos

Se dispusieron 25 macetas de 1,000 cm<sup>3</sup> y 50 plántulas de pepino cv. Centenario como se describió anteriormente. Se inocularon a 40 plántulas con 2 mL de una suspensión acuosa conteniendo 1,000±50 huevos de *M. enterolobii*. Los huevos fueron extraídos por agitación de raíces en 0.3% de NaOCl durante 20 minutos. En el resto de las plántulas se empleó 2 mL de agua destilada estéril como testigos. En cada maceta se sembraron dos plántulas de pepino. Se permitió el desarrollo de las plántulas en invernadero con manejo convencional del cultivo.

En los puntos de muestreo a los 3, 5, 8, 12, y 17 días posteriores a la inoculación (dpi) se lavaron las raíces cuidadosamente y se cortaron segmentos apicales de 1 cm (o agallas cuando se presentaron) para su posterior análisis.

#### 5.3.2. Extracción de ARN Total y Síntesis de ADN Complementario

Se maceró 0.1 cm<sup>3</sup> de raíz de cada muestra en 1 mL de Trizol (Sigma Aldrich, EE. UU.) con ayuda de un mortero. Se recuperó la mezcla en tubo de 2 mL y se dejó reposar 5 minutos. A continuación, se agregó 0.2 mL de 1-bromo- 3-cloropropano, se mezcló con agitador vortex y se dejó reposar 2 minutos. Se sometió el tubo a centrifugado a 12,000 × g durante 15 minutos a 4°C. Se transfirió la fase acuosa a tubo limpio, se agregó 0.5 mL de isopropanol, se mezcló gentilmente y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 12,000 × g durante 10 minutos a 4°C para decantar el sobrenadante y posteriormente resuspender la pastilla en 1 mL

de etanol al 75% y se mezcló con agitador vortex. Finalmente, se centrifugó a  $7,500 \times g$  durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se decantó el etanol y se dejó secar el pellet de ARN a temperatura ambiente y se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua inyectable. Previo a los siguientes análisis, se cuantificó la cantidad de ARN en la muestra con ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, EE. UU.).

Adicionalmente se corrió un gel de agarosa al 1% en buffer MOPS 1X bajo condiciones de desnaturalización con 37% formaldehído a 50 V por 90 minutos. Para la eliminación de ADN genómico, el ARN total fue tratado con DNasa (Turbo DNA-free kit, Invitrogen, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de la primera hebra de ADN complementario (ADNc), se utilizó el kit comercial SuperScript™ III (Thermo Scientific, EE. UU.); en cada muestra se utilizaron 5  $\mu\text{g}$  de ARN total, 1  $\mu\text{L}$  de Oligo(dT)<sub>20</sub>, 1  $\mu\text{L}$  10 mM dNTP Mix y agua tratada con DEPC para un volumen final de 10  $\mu\text{L}$ . Entonces se continuó según las instrucciones del fabricante.

### 5.3.3. Diseño de Oligonucleótidos

Se realizó un análisis *in silico* para la identificación de distintos genes referenciados tanto en la traducción de proteínas efectoras para la supresión de defensas en planta, como aquellos útiles como genes de referencia dentro de las diferentes especies de RKN. Posteriormente, las secuencias fueron alineadas utilizando BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) sobre el genoma de *M. enterolobii* para corroborar la identificación (<https://meloidogyne.inrae.fr/>).

Se seleccionaron genes efectores involucrados tanto en etapas tempranas como tardías en el ciclo parasitológico. Los genes seleccionados en etapas tempranas fueron *TTL5* y *TCTP*. Los genes seleccionados involucrados en etapas tardías fueron *SP12* y *PDCD6*. Así como el gen efector *CRT* involucrado en etapas tardías y tempranas del parasitismo de *Meloidogyne* spp. El mecanismo de supresión de defensa de estos efectores se describe en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Genes efectores relacionados a la supresión de defensas seleccionados para su estudio.

Gen efector	Mecanismo	Etapa
<i>TTL5</i>	Activador de sistema antioxidante	Temprana
<i>SP12</i>	Regulación de los ácidos jasmónico y salicílico	Tardía
<i>PDCD6</i>	Supresión del ácido salicílico	Tardía
<i>CRT</i>	Supresión de respuesta de defensa	Temprana y tardía
<i>TCTP</i>	Supresión de muerte celular	Temprana

El diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo con el uso de programa Primer Blast en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Todos los oligonucleótidos fueron analizados con el programa OligoAnalyser 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>) para discriminar oligonucleótidos formadores de dímeros y estructuras secundarias. Las características de los mismos se describen en el Cuadro 5.

#### 5.3.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real se realizó en un termociclador CFX96 (Bio-Rad, EE. UU.) utilizando tubos de 200  $\mu$ L de tapa ultra clara (Bio-Rad, EE. UU.). Cada reacción incluyó 1  $\mu$ L del ADNc, 1  $\mu$ L de cada oligonucleótido, 7.5  $\mu$ L de iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, EE. UU.) a una concentración de 2x, y agua para un volumen final de 15  $\mu$ L. El programa fue: 95°C por 30 s y 40 ciclos de 95°C por 5 s y 60°C por 30 s. Posterior a la amplificación, las reacciones fueron sometidas a un gradiente de temperatura de 65°C a 95°C para generar las curvas de disociación y asegurar una amplificación específica de productos (Rutter *et al.*, 2014). Se realizaron tres réplicas técnicas por cada réplica biológica.

**Cuadro 5.** Oligonucleótidos específicos de *Meloidogyne enterolobii* para el análisis cuantitativo de los genes seleccionados

Nombre	Secuencia 5'->3'	Tamaño (pb)	GC (%)	Tm (°C)	Producto (pb)
RPS6-F	GTATGGCTCAGGAAGTTGAA	20	45	55.1	109
RPS6-R	ACTCCTTGCTTCATTGGAAA	20	40	55.1	
SDHA-F	TACAGAGAGCGGCAAGATTT	20	45	56.9	144
SDHA-R	TGAAGCGAGGCTCCATATAA	20	45	56.1	
DISU-F	GGTAAACCCAGCGAATATGG	20	50	56.3	104
DUSU-R	TCATCGGCAGAAGTGAGTT	19	47	56.4	
POLY-F	GTCTGCCGTGATGCAATTA	19	47	56	100
POLY-R	CGAAGTTCATCGTATCGAGAG	21	78	56.1	
SMG1-F	CCTAAACTTGTGATGCGTGT	20	45	56.4	118
SMG1-R	TATGAGTTCGTTCCACCAA	20	45	56.5	
MDH-F	ACGGTTGCTATGATCCAAAA	20	40	55.3	146
MDH-R	CACAATAGTCACGCCAGAAT	20	45	55.9	
CRT-F	TAAGGACAAGAACCAGCTCAT	21	43	56.6	136
CRT-R	CTCTCCACTTTCTGCCTTCT	20	50	56.9	
TTL5-F	TCCAGACGATACTTTGGATGA	21	43	56.2	105
TTL5-R	CAAACATAAAGAACGGGGTCTA	22	41	56.1	
TCTP-F	GGATCGTTTCAAACCTTTGC	21	43	56.1	106
TCTP-R	TTCCTCATCACCTCTTGAC	20	50	56.2	
SP12-F	ATTGCTATGACCGAGGGAG	19	53	56.3	180
SP12-R	ATTGCTAAACGTAGCCCA	19	47	56.7	
PCD6-F	GTCTAATGGAAGTTGGCGAC	20	50	56.5	136
PCD6-R	GTTGCTCCAATCGTTGATGT	20	45	56.7	

### 5.3.5. Análisis de Datos

Los datos crudos de amplificación se extrajeron del equipo de PCR en tiempo real. A partir de éstos, se calculó la línea base, los valores Cq/Ct y la eficiencia de amplificación con ayuda del programa LinRegPCR (Ruijter *et al.*, 2009). A continuación, se realizó el análisis para determinar su idoneidad como genes de referencia con ayuda del programa RefFinder en la plataforma en línea <https://blooge.cn/RefFinder/> (Xie *et al.*, 2023). Posteriormente se analizaron con el método comparativo delta-delta Ct (Schmittgen y Livak, 2008). Finalmente, los datos se analizaron empleando el paquete MCMC.qpcr en R (Matz *et al.*, 2013).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Extracción de Huevos de *M. enterolobii* en NaOCl versus Infectividad del Inóculo en Pepino

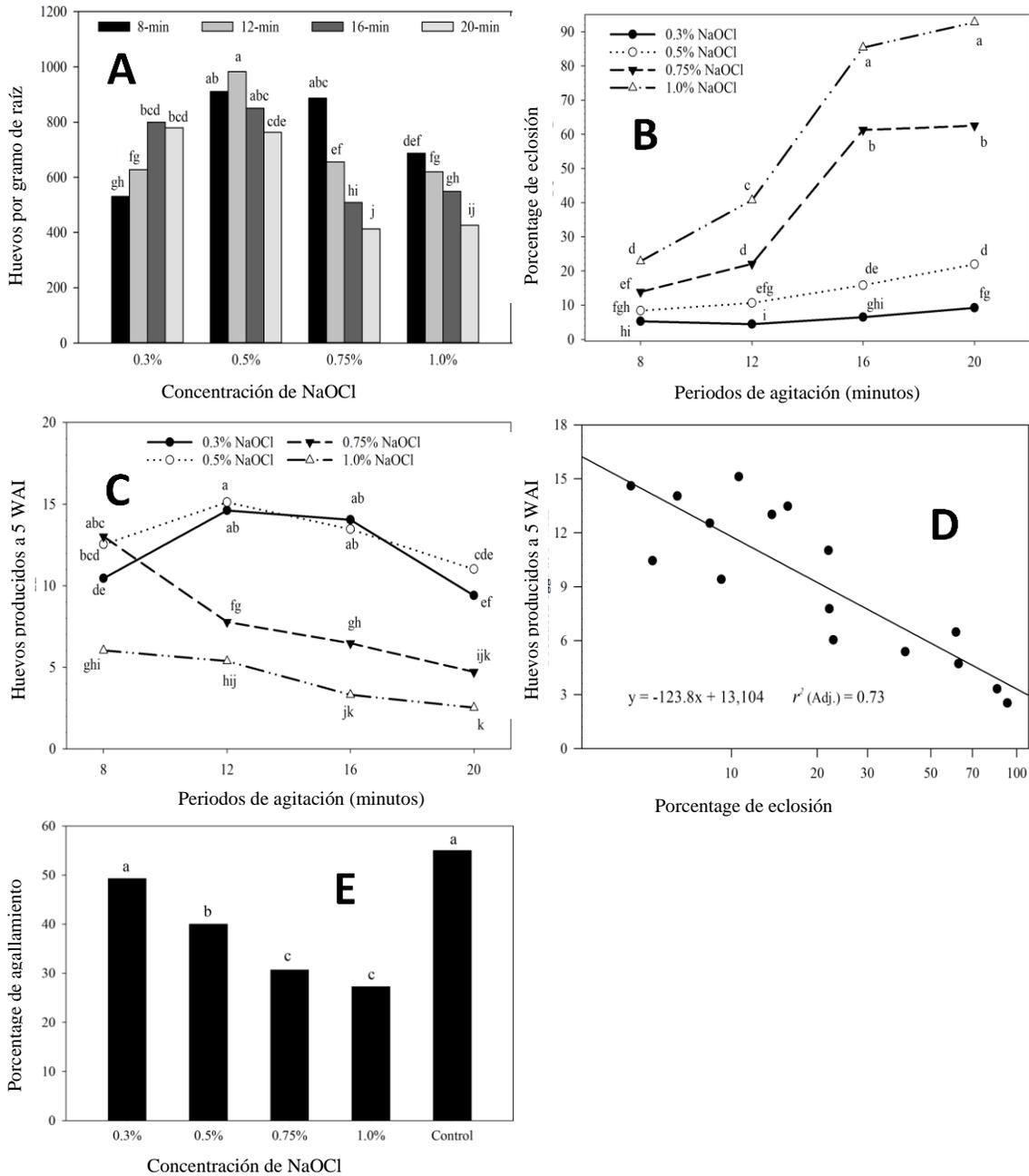
A baja concentración de NaOCl (0.3%) con agitación por 16 a 20 minutos, el nivel de extracción fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) en comparación con la agitación durante 8 a 12 minutos. A concentración de NaOCl de 0.5%, el nivel de extraído de los huevos fue similar ( $P > 0.05$ ) entre los períodos de agitación por 8 a 16 minutos. Sin embargo, al 0.75% de NaOCl sólo el período de agitación de 8 minutos observó un similar ( $P > 0.05$ ) nivel de extracción en comparación con el NaOCl al 0.5%. El nivel de extracción inferior ( $P \leq 0.05$ ) fue observado con tratamientos de 0.3% NaOCl con agitación por 8 a 12 minutos y 0.75 a 1.0% NaOCl con agitación por 12 a 20 minutos (Figura 3A). Las combinaciones de las concentraciones de NaOCl 0.75 y 1.0% con períodos de agitación durante 16 a 20 minutos dio como resultado una inducción más alta ( $P \leq 0.05$ ) de la eclosión en comparación con los tratamientos restantes (Figura 3B). Este efecto varió del 61 al 93% de la eclosión de larvas. Los tratamientos de 0.5 y 0.3% NaOCl mostraron un rango más corto de eclosión que varió de 5 a 22%. Vale la pena señalar que la eclosión inducida en todos los tratamientos de NaOCl combinados con el período de agitación de 8 minutos también varió en un rango de 5 al 23%. Los tratamientos NaOCl al 0.3% indujeron un menor ( $P \leq 0.05$ ) nivel de eclosión en comparación con el resto de tratamientos de NaOCl dentro de cada período de agitación de 12 a 20 minutos (Figura 3B).

En las pruebas de reproducción en 5 WAI, el tratamiento de larvas (control) dio como resultado un recuento más alto de 16,836 huevos por sistema de raíz, en comparación con los huevos como inóculo ( $P \leq 0.05$ ). Aunque el peso de los sistemas de raíz de pepino (variable concomitante) a las 5 WAI varió de 10 a 22 g entre los tratamientos, el nivel de la extracción de los huevos de *M. enterolobii* no se vio afectado ( $P > 0.05$ ). Por otro lado, a las 17 WAI la extracción de huevos de las muestras fue inútil para estimar la población a partir de los sistemas radical completos. Sin embargo, en las pruebas de reproducción en 5 WAI, el tratamiento de 0.75% NaOCl con agitación durante 8 minutos observó un ( $P \leq 0.05$ ) mayor nivel de reproducción en comparación con tratamientos con 0.3% NaOCl con agitación por 8 y 20 minutos (Figura 3C). Además, el 0.75% NaOCl con agitación por 8 minutos observó un nivel de reproducción más alto ( $P \leq 0.05$ ) en

comparación con los tratamientos con NaOCl a 1.0 y 0.75% NaOCl (agitación de 12 a 20 minutos). El 0.75% NaOCl con agitación durante 8 minutos dio como resultado un similar ( $P > 0.05$ ) nivel de reproducción en comparación con todos los tratamientos de 0.5% NaOCl. Por otro lado, la reproducción con los tratamientos de 0.3 y 0.5% NaOCl fue similar ( $P > 0.05$ ) dentro de cada período de agitación. Los tratamientos de 1.0% mostraron la reproducción más baja ( $P \leq 0.05$ ) dentro de períodos de agitación durante 8 a 16 minutos. Con el período de agitación de 20 minutos, el nivel de reproducción observado fue similar ( $P > 0.05$ ) entre los tratamientos de 0.75 y 1.0% NaOCl (Figura 3C). Finalmente, la regresión mostró un coeficiente de correlación negativo ( $R = -0.86$ ); es decir, la producción de huevos disminuyó conforme la eclosión aumentó (Figura 3D).

A las 5 WAI, a pesar de las diferencias significativas en el conteo de huevos, los niveles de agallamiento eran estadísticamente inapropiados para el análisis. A las 17 WAI, solo la concentración de NaOCl fue un factor significativo en el agallamiento. Aquí, el tratamiento con 0.3% NaOCl resultó en porcentajes más altos ( $P \leq 0.05$ ) de agallas en comparación con el resto de los tratamientos NaOCl (Figura 3E). Los tratamientos de 0.75% y 1.0% NaOCl mostraron los niveles más bajos de agallamiento ( $P \leq 0.05$ ). El tratamiento de control de  $1.500 \pm 15$  J2 dio como resultado un nivel de agallamiento similar en comparación con  $6,000 \pm 60$  huevos del 0.3% NaOCl a 17 WAI ( $P > 0.05$ ) (Figura 3E).

Para extraer huevos de *Meloidogyne* spp., las raíces agalladas pueden tratarse directamente con hipoclorito de sodio a través de agitación, licuado o sacudido para liberar los huevos de la matriz gelatinosa unida a la superficie de la raíz (Stetina *et al.*, 1997). Sin embargo, el NaOCl potencialmente daña la estructura del huevo al contacto. En consecuencia, NaOCl también es potencialmente perjudicial para las larvas. La reducción de la viabilidad de los huevos extraídos con NaOCl se ha informado previamente en comparación con J2 o masas de huevo extirpadas sin tratamiento de NaOCl (Bird, 1968; Di Vito *et al.*, 1986; McClure *et al.*, 1973; Vrain, 1977).



**Figura 3A-E)** Efecto de combinaciones de concentraciones de NaOCl y períodos de agitación de raíces de pepino, en la extracción de huevos, en la eclosión, y en la reproducción de *Meloidogyne enterolobii*, respectivamente. Los datos son medias de 12 réplicas (seis réplicas/prueba). Cantidades de los huevos producidos se presentan en miles. D) Efecto de la eclosión de *M. enterolobii* en la reproducción del inóculo. Ecuación derivada de regresión lineal ( $P \leq 0.05$ ). E) Efecto de las concentraciones de NaOCl en la infectividad de *M. enterolobii* en las raíces de pepino. Densidades de inóculo de  $6,000 \pm 60$  huevos y  $1,500 \pm 15$  J2 para el tratamiento control. Los datos son medias de 32 réplicas (16 réplicas/prueba). Las barras o símbolos con la misma letra no son significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ) mediante la prueba LSD de Fisher.

Diferentes concentraciones de NaOCl y períodos de agitación fueron usados para extraer huevos de *M. enterolobii*. Aquí la estimación de la población de huevos en el pepino se logró por varios tratamientos. Sin embargo, se demostró que el nivel de extracción de los huevos de *M. enterolobii* se redujeron al combinar bajo concentraciones de NaOCl con breves períodos de agitación. Además, los huevos se desintegraron al combinar altas concentraciones de NaOCl con largos períodos de agitación. Durante el desarrollo embrionario de *Meloidogyne* spp., la cáscara de huevo ofrece protección contra compuestos tóxicos a través de la membrana lipídica interna, que es degradada a través de la actividad enzimática inmediatamente antes de la eclosión del J2 (Curtis *et al.*, 2009). Un retraso en la eclosión o la reducción de los juveniles infecciosos del segundo estadio se ha descrito previamente con concentraciones de NaOCl de 0.5 a 1.0% (Di Vito *et al.*, 1985, 1986; Vrain, 1977).

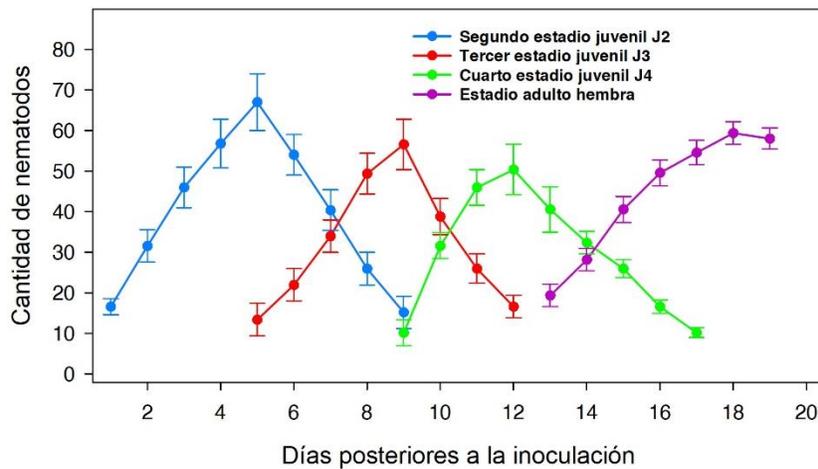
En nuestros resultados, una mayor eclosión fue inducida por efecto del incremento en la concentración de NaOCl o en el período de agitación. Desafortunadamente, la eclosión más alta inducida dio como resultado la mayoría de las larvas incapaces para sobrevivir e infectar las raíces de pepino, esto fue parcialmente demostrado por la correlación negativa entre datos de eclosión y reproducción. Mientras que todos los tratamientos de 0.1 y 0.75% NaOCl observaron niveles más altos de eclosión, solo el 0.7% NaOCl con agitación de 8 minutos también mostró un mayor número de huevos producidos en comparación con el 0.3% de tratamientos NaOCl (dentro de cada agitación período). Lo anterior significa que, a pesar de la relación negativa entre la eclosión y la producción de huevos, una inducción moderada de la eclosión dio como resultado una infección más rápida. De la misma manera, se sabe que hay una relación entre el número de RKN infectado las raíces y el tamaño de las agallas (Vovlas *et al.*, 2005). En nuestros experimentos a 17 WAI, el nivel de mayor agallamiento correspondió al tratamiento con la inferior concentración de NaOCl. Esto indicó que el tratamiento 0.3% de NaOCl dio como resultado un mayor número de nematodos infectando las raíces. Por lo tanto, un mayor número de las larvas sobrevivieron con los tratamientos con NaOCl al 0.3% en comparación con el 0.5, 0.75 y 1.0% NaOCl.

Tanto la eclosión y los niveles de reproducción (a 5 WAI) del tratamiento de 0.3% de NaOCl con agitación de 8 minutos fueron más bajos en comparación con los de 0.75% NaOCl con agitación de 8 minutos. Aquí, esto evidencia que el proceso de eclosión no se vio afectado por concentración de 0.3% de NaOCl. La producción de huevos inferior (observada a las 5 WAI) a pesar del mayor número de nematodos que infectan las raíces (demostradas en 17 WAI) fue causado por la

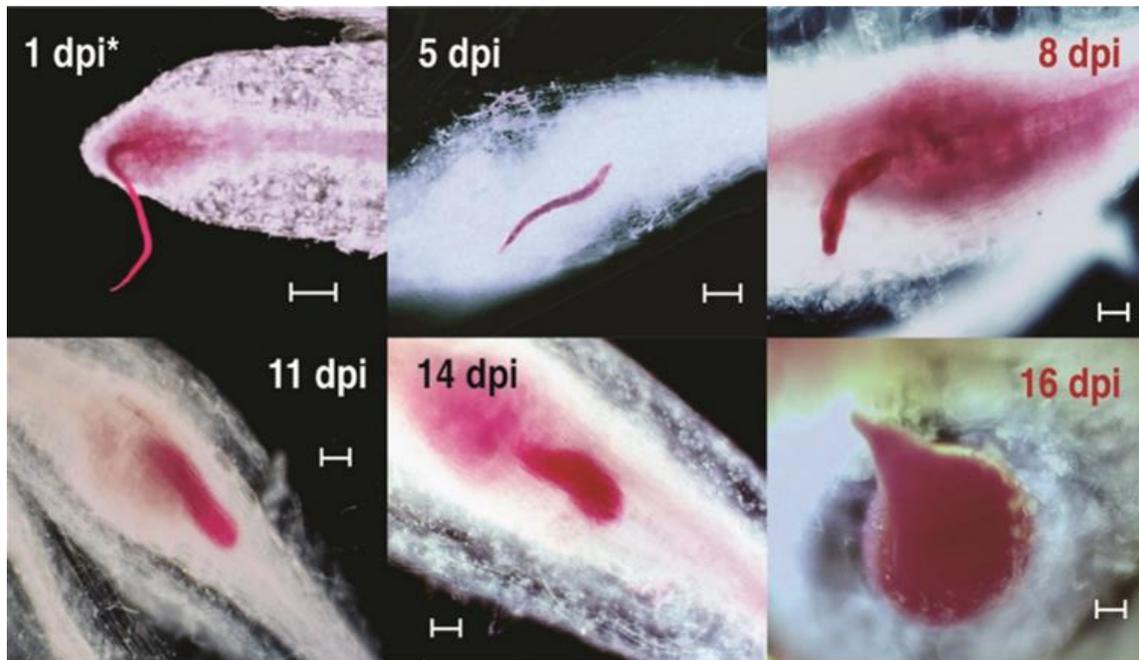
asincronía natural en el desarrollo biológico de larvas dentro de los huevos. En turno, los procesos de eclosión e invasión (de huevos extraídos con 0.3% NaOCl con agitación de 8 minutos) ocurrieron en un período de tiempo más amplio, en comparación con el resto de los tratamientos.

## 6.2. Periodos de los Estadios de *M. enterolobii* en Raíces de Pepino

Los conteos de los diferentes estadios de *M. enterolobii* mostraron que los J2 se observaron desde el primer dpi. La invasión de la segunda generación se observó a partir del dpi 21. Además, se encontró que la mayor cantidad de cada estadio en la raíz fue a los 5, 9, 12, y 18 dpi para J2, J3-J4, y hembras, respectivamente (Figura 4). En nuestros experimentos, se observó que a alrededor de los 5 dpi el J2 ya se había desarrollado a su estadio J3, el cual a su vez se desarrolló y pasó el cuarto estadio en alrededor de cuatro días. Este periodo de desarrollo mostró ser similar entre J3 y J4. La hembra inmadura y madura reproductiva fueron observadas alrededor de los 13 y 16 dpi (Figura 5). Las agallas y masas de huevos pudieron observarse a simple vista a los 12 y 26 dpi.

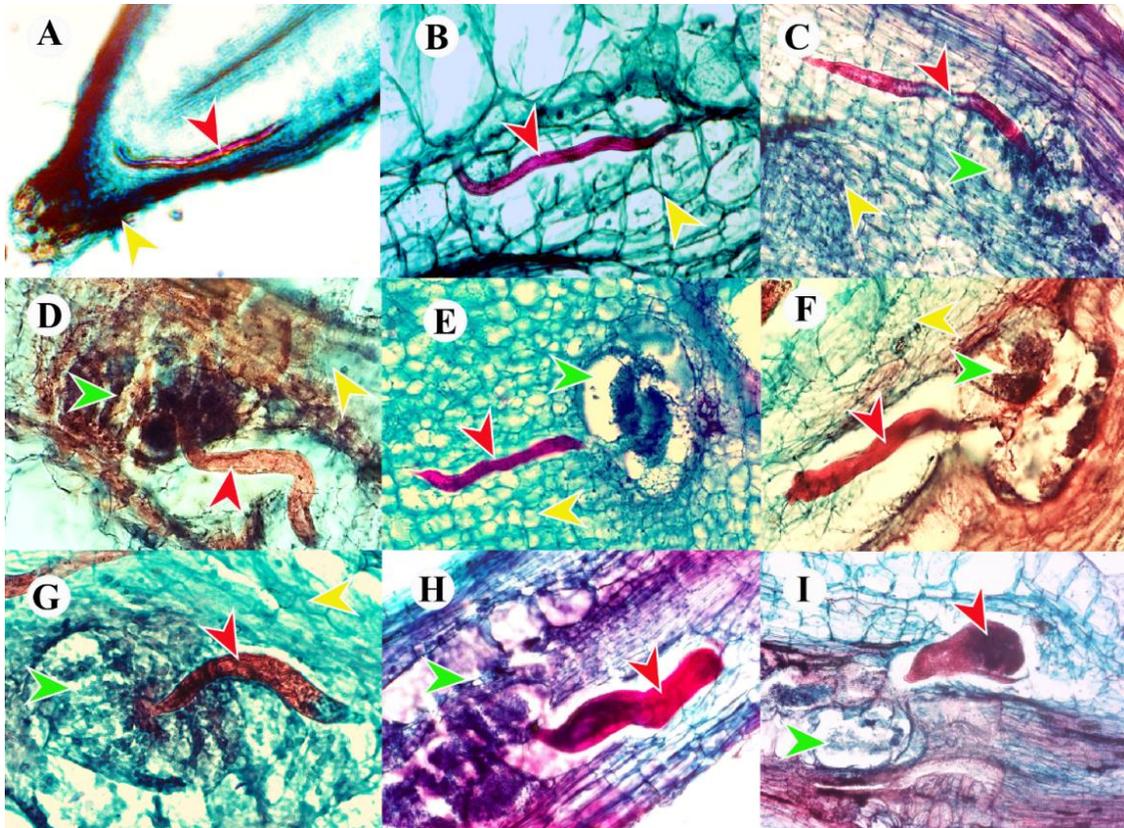


**Figura 4.** Conteo de estadios de desarrollo de *Meloidogyne enterolobii* teñidos con fucsina ácida en raíces de pepino. dpi: días posteriores a inoculación. Los puntos representan las medias de los conteos, las barras de error en cada punto indican  $\pm$  la desviación estándar.



**Figura 5.** Tinción de *Meloidogyne enterolobii* con fucsina ácida durante el ciclo parasitológico en raíces de pepino. dpi: días posteriores a la inoculación. Las barras de escala representan 50  $\mu$ m.

Las especies de *Meloidogyne* causan poco daño en etapas de invasión y migración dentro del tejido (Caillaud *et al.*, 2008); no obstante, la respuesta de defensa de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se ha observado en *S. lycopersicum* desde 12 h posteriores a la inoculación con *M. incognita* (Melillo *et al.*, 2006). En *Arabidopsis thaliana*, se han observado células gigantes multinucleadas en expansión a 7 dpi con *Meloidogyne* spp; así como una reducción de la síntesis de ADN a los 14 dpi; sin embargo, las células gigantes y las agallas continuaron expandiéndose, considerando la formación de la agalla madura a los 21 dpi (Wiggers *et al.*, 1990). En esta misma especie vegetal, se ha observado la presencia de agallas desde los 3 dpi con *M. incognita*, así como la presencia del promotor de actividad del gen *WEE1* quinasa, el cual es esencial cuando la planta experimenta problemas durante la fase de replicación del ADN. En este trabajo se determinó la presencia de agallas maduras a 21 dpi (Cabral *et al.*, 2020).



**Figura 6.** Cortes histológicos de raíces de pepino parasitadas por *Meloidogyne enterolobii*. A y B: a los 3 días posteriores a la inoculación (dpi) el nematodo (flechas rojas) se encontró migrando en el tejido vegetal (flechas amarillas) y/o ubicándose en donde establecería el sitio de alimentación. C y D: a los 5 dpi el nematodo (flechas rojas) ya había comenzado a establecer el sitio de alimentación. Las células afectadas (flechas verdes) mostraron incremento considerable en su tamaño por efecto de la inducción de la infección respecto al tejido sano (flechas amarillas). E-G: 8 dpi, en esta etapa se observó al nematodo (flechas rojas) en su tercer estadio juvenil. Las células afectadas (flechas verdes) siguieron aumentando su tamaño y se distinguieron claramente del resto del tejido (flechas amarillas). G y H: a los 12 dpi el nematodo se encontró en su cuarto estadio juvenil (flechas rojas). Las células afectadas (flechas verdes) formaron la característica agalla dentro del tejido. La alteración se mostró de forma más clara también en las células adyacentes al sitio de alimentación (flechas amarillas). I: finalmente, a los 17 dpi, el nematodo se observó en su estadio adulto hembra. Las células gigantes se mostraron aún más evidentes (flecha verde).

En la interacción *M. incognita*-*O. sativa*; se observaron hinchazones de raíz en etapas tan tempranas como 2-dpi con agallamiento obvio a 4-dpi. Tanto las células de xilema, floema y circundantes parinquemáticas se observaron en multiplicación por efecto del nematodo en dicha etapa (Nguyễn *et al.*, 2014). El periodo del ciclo de *M. enterolobii* en *S. lycopersicum* bajo condiciones controladas en incubadora, fue descrito en alrededor de 20 dpi (Costa *et al.*, 2020).

En *Zea mays*, *Glycine max* y *S. lycopersicum*, bajo condiciones de invernadero, también se ha

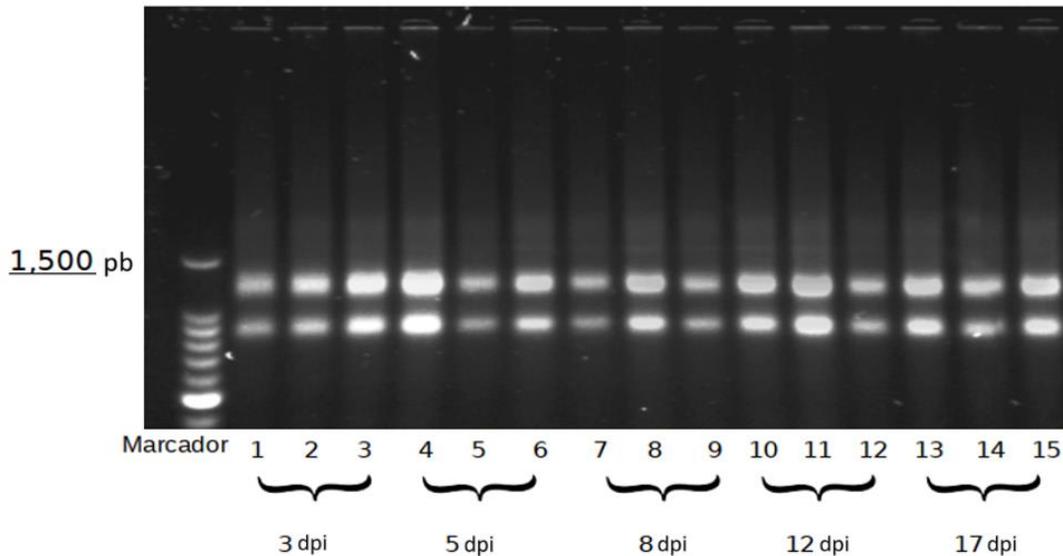
determinado en 20 dpi (Collet *et al.*, 2023). No obstante, en genotipos de *Capsicum* spp., las hembras completamente desarrolladas se han observado a los 28 dpi (Marques *et al.*, 2020). El periodo del J2 dentro de la raíz o bien el periodo a aparición del J3 observado en *Z. mays*, *G. max* y *S. lycopersicum*, fue de alrededor de los 5 dpi (Collet *et al.*, 2023). No obstante, se ha observado en *Capsicum baccatum* a los 14 dpi (Marques *et al.*, 2020) y a los 7 dpi en *S. lycopersicum* (Velloso *et al.*, 2022).

En el presente estudio, el periodo a la eclosión de los primeros J2 engendrados fue de alrededor de 20 días. Los periodos de los estadios J2, J3 y J4 parasíticos fueron de 4 a 5 días. El estadio adulto hembra ocurrió entre los 13 y 14 días. En nuestro análisis histopatológico, observamos que *M. enterolobii* indujo un sitio de alimentación diferenciado desde la etapa tempranas a 5 dpi durante su estadio juvenil J2 en las raíces de pepino. Mientras que, la agalla madura se observó desde los 17 dpi. El tejido circundante prolífero también fue evidente durante el proceso parasitológico de *M. enterolobii* en las raíces de pepino en estudio.

### 6.3. Análisis de Expresión Génica de *M. enterolobii* en Raíces de Pepino

#### 6.3.1. Análisis de Integridad del ARN Total Extraído

La pureza y concentración de cada extracción de ARN se determinó con ayuda del espectrofotómetro en un rango no menor a 1.9  $A_{260}/A_{280}$  y 80 ng/ $\mu$ l, respectivamente en las muestras. Las muestras de ARN se visualizaron correctamente en el gel de agarosa al 1% y buffer MOPS 1X (Figura 7).

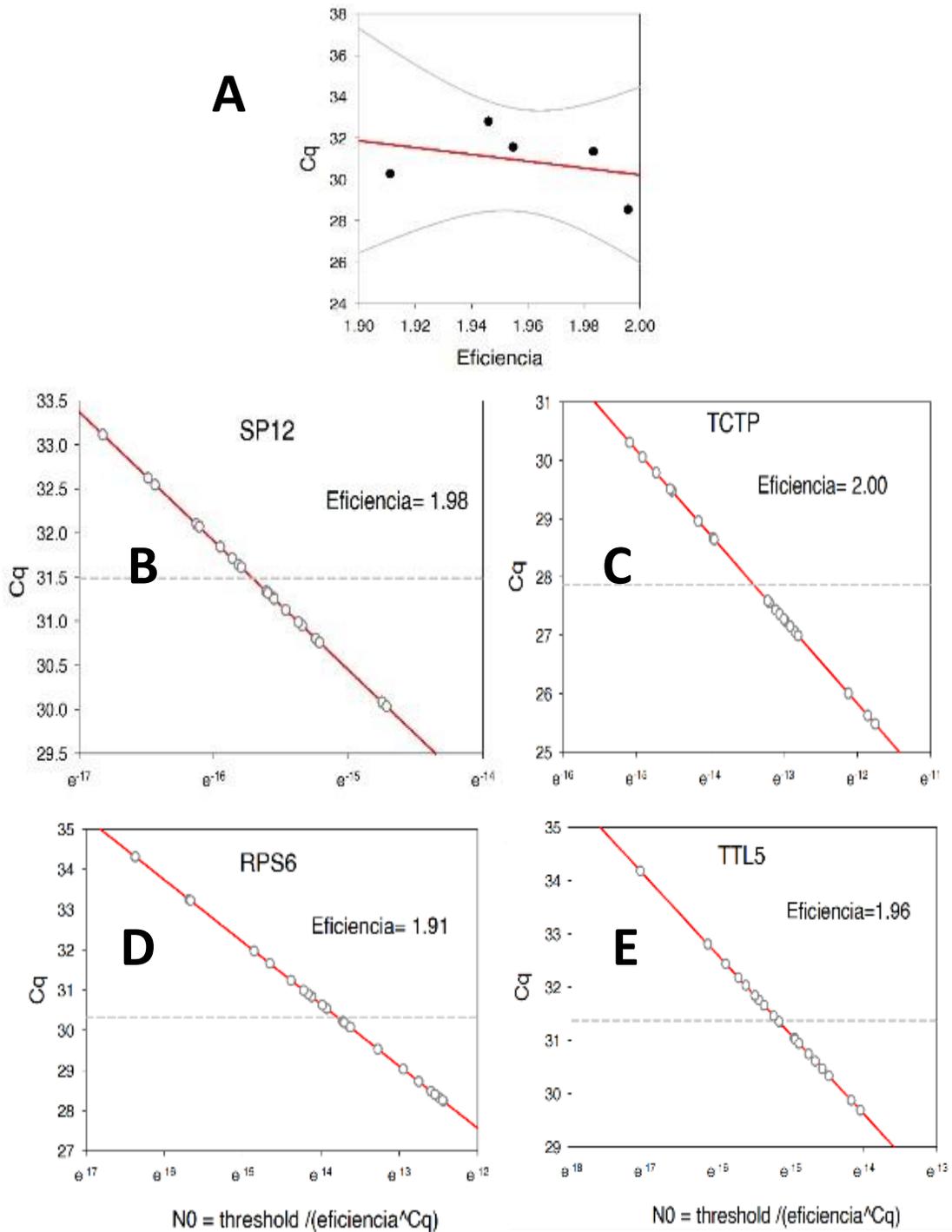


**Figura 7.** Gel de agarosa mostrando la típica doble banda del ARN extraído a los 5, 8, 12 y 17 dpi de tres réplicas biológicas de plántulas de pepino infectadas con *Meloidogyne enterolobii*.

### 6.3.2. Eficiencia de Amplificación de la qRT-PCR

Los genes relacionados a la patogenicidad *TCTP*, *SP12*, y *TTL5* amplificaron de manera correcta durante la qRT-PCR. La muestra tomada a los 3 dpi no permitió la amplificación de ningún gen, por lo que fue descartada. La eficiencia de amplificación de las muestras mostró un valor más alto de 2.00 (100%) alrededor del ciclo 28, mientras que la menor eficiencia 1.91 (91%) alrededor de 30 ciclos (Figura 8). Estos valores de eficiencia se consideraron adecuados en todos los casos al indicar una eficiencia del 91% y superiores, sin haber sido sobre estimados por encima de 100% de eficiencia.

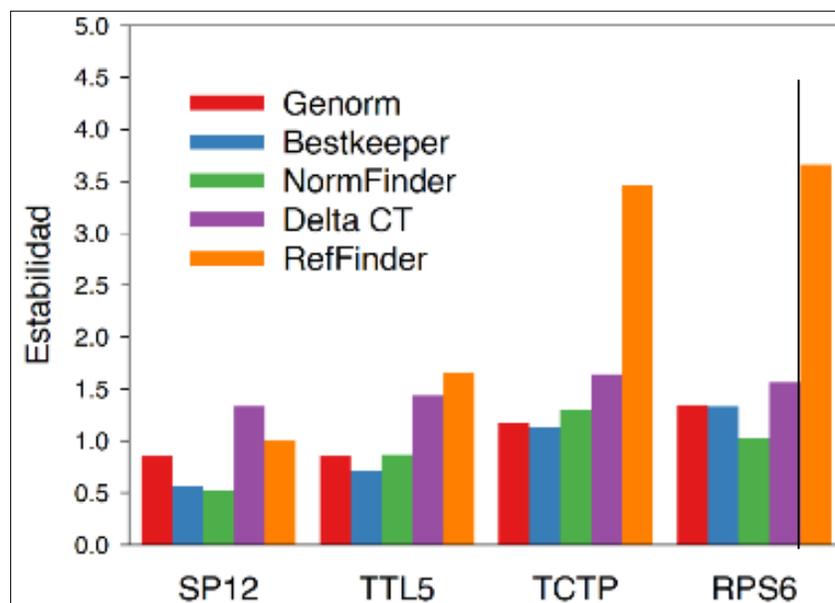
La eficiencia de cada oligonucleótido fue de 1.98, 2.0, 1.91 y 1.96 para *SP12*, *TCTP*, *RPS6* y *TTL5*, respectivamente. Los datos de eficiencia se muestran graficados en regresión lineal entre el  $N_0$  ( $\text{umbral}/\text{eficiencia}^{C_q}$ ) y el valor de  $C_q$  ajustado, obtenidos con el programa LinRegPCR v.2021.2 (Figura 8).



**Figura 8.** Eficiencia de amplificación de los oligonucleótidos empleados. A) Cada punto representa un par de oligonucleótidos. La línea roja representa la regresión lineal mientras que las líneas grises muestran el intervalo de confianza de 95%. B-E) regresión lineal entre el  $N0$  y el valor de  $Cq$  ajustado. La línea punteada color gris muestra la media del  $Cq$ . Los valores de la eficiencia,  $N0$ , y del  $Cq$  ajustado se obtuvieron con el programa LinRegPCR v.2021.2.

### 6.3.3. Evaluación de RG y Análisis de Expresión con el método MCMC.qpcr

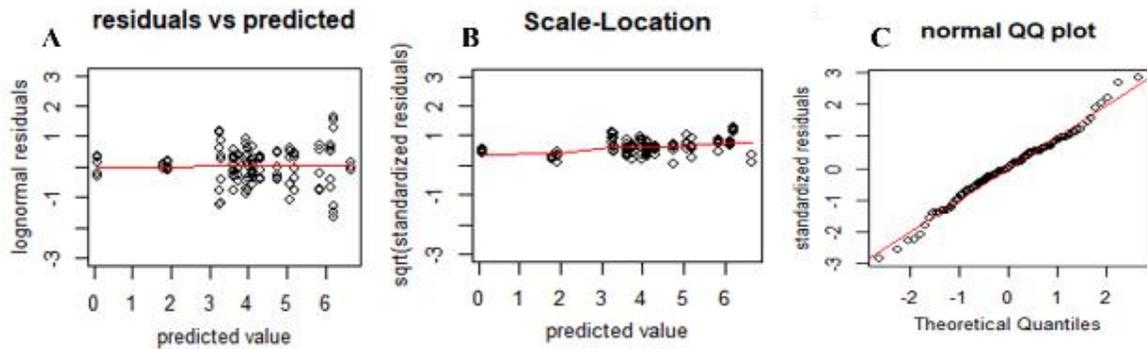
Al analizar todos los genes empleados en este estudio, se observó que los genes *SP12* y *TTL5* mostraron la mayor estabilidad que se consideró por los valores más bajos en los cinco métodos de análisis. Contradictoriamente, el gen *RPS6* no mostró ser adecuado e incluso fue el segundo gen con mayor variabilidad del estudio (Figura 9). Por lo anterior, el gen *SP12* fue utilizado para normalizar la expresión del resto de los genes en estudio con ayuda de la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , utilizando el periodo 5-dpi como referencia. A continuación, se realizó un mapa de calor con dichos valores donde se mostró cómo los genes *TTL5* y *TCTP* experimentaron una variación menor durante los periodos de 8-, 12- y 17-dpi.



**Figura 9.** Análisis comparativo sobre viabilidad de genes de *Meloidogyne enterolobii* para ser empleados como genes de referencia. Los valores más bajos significan una menor variabilidad en su expresión durante el ciclo parasitológico. Todos los análisis fueron realizados en la plataforma RefFinder (<http://bloege.cn/RefFinder/>) (Xie *et al.*, 2023).

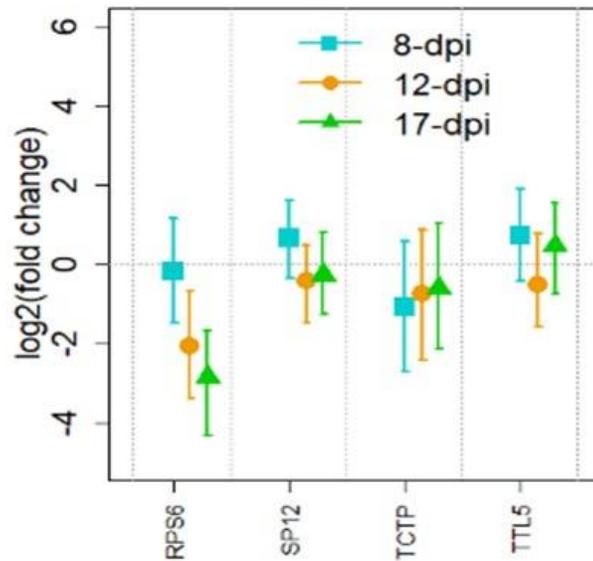
Previo al análisis de expresión génica con el método de MCMC.qpcr, los datos fueron analizados con el fin de determinar si cumplían con los tres principales criterios para el enfoque de modelado lineal, es decir, que no muestren tendencia respecto al valor predicho (Figura 10A), que no

muestran cambio en su tamaño respecto al valor predicho (Figura 10B), y que muestren una tendencia aproximada a la normalidad (Figura 10C). La prueba de diagnóstico mostró que el conjunto de datos qRT-PCR fue válido para el enfoque de modelado lineal.



**Figura 10.** Los tres criterios para el enfoque de modelado lineal. A) residuales lognormales sobre el valor predicho. B) cuadrado de residuos estandarizados sobre el valor predicho. C) residuales estandarizados sobre cuantiles teóricos.

Una vez satisfechos los tres criterios, se procedió al análisis de todos los genes. El período de evaluación 5-dpi se empleó como el punto de referencia para evaluar los niveles de expresión (el periodo 3-dpi fue descartado desde la amplificación con PCR punto final). En el modelo bayesiano "ingenuo" sin genes de control (Figura 11), la expresión del gen *RPS6* de *M. enterolobii* a 17-dpi mostró una regulación negativa con respecto a 8-dpi. Los datos de expresión de los genes *SPI2* y *TTL5* no mostraron regulación al igual que el gen *TCTP*, no obstante, este último experimentó una alta variabilidad como se observa en los intervalos de confianza calculados (Figura 11).



**Figura 11.** Análisis de niveles de expresión de genes de *Meloidogyne enterolobii* en estudio durante el parasitismo en raíces de pepino sin incluir genes de referencia, modelo “ingenuo”. Los bigotes muestran intervalos de confianza de 95%. dpi: días posteriores a la inoculación.

Los efectores patogénicos son responsables del éxito de *Meloidogyne* spp., parasitando las plantas (Ali *et al.*, 2017). Así mismo, el establecimiento exitoso de la infestación de RKN se asocia con la supresión de las respuestas de defensa de las plantas (Jammes *et al.*, 2005). La evaluación de los perfiles de expresión de los genes efectores es posible a través de la técnica de qRT-PCR. Su aplicación permite analizar si un gen patogénico está involucrado durante etapas particulares de parasitismo, donde, el efector cumple una función específica en el hospedante (Rutter *et al.*, 2014). Entre los supresores de defensas relacionados a etapas tempranas del parasitismo de *Meloidogyne* spp., únicamente el efector Me-TCTP ha sido descrito en *M. enterolobii* (Zhuo *et al.*, 2017).

Los genes *SP12* y *TTL5* se caracterizaron por primera vez en *M. incognita* y *M. javanica*, respectivamente. Ambos se determinaron como genes de efectores patogénicos involucrados en la supresión de defensa en etapas posteriores y tempranas del parasitismo, respectivamente (Lin *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2016). No obstante, en nuestro análisis de expresión, la regulación de los genes *SP12* y *TTL5* no se vio afectada durante el ciclo parasitológico, lo que sugiere una ausencia de sus funciones específicas en las interacciones *M. enterolobii*-pepino bajo las condiciones estudiadas.

El gen *RPS6* fue evaluado y propuesto previamente como un gen de referencia durante las etapas de desarrollo en *M. javanica* con resultados prometedores (Wu *et al.*, 2019). Así mismo, en *Macrobrachium olfersii* desde el desarrollo embrionario hasta estadio adulto (Jaramillo *et al.*,

2017). Lo anterior difiere a lo observado en el presente estudio; donde el *RPS6* fue regulado negativamente en etapas tardías del parasitismo. Estos resultados indicaron un probable papel del gen *RPS6* en el desarrollo de *M. enterolobii* en las primeras etapas y, por lo tanto, inadecuado como gen de referencia.

## 7. CONCLUSIONES

Concluimos que ambos factores (NaOCl y periodo de agitación) afectaron directamente el grado de extracción de huevos de *M. enterolobii*, mientras que las mayores concentraciones de NaOCl resultaron en reducción de las larvas infectivas. La estimación más precisa y rápida se obtuvo con concentraciones de 0.5 a 0.75% de NaOCl con periodos de agitación de 8 minutos. El inóculo de mayor viabilidad se obtuvo con la concentración de NaOCl de 0.3% sin efecto del periodo de agitación. Se concluye también, que, bajo las condiciones establecidas en este estudio, el periodo a la eclosión de los primeros J2 concebidos fue de alrededor de 20 días en *M. enterolobii* en el cultivo de pepino. Los periodos de los estadios J2, J3 y J4 parasíticos fueron de 4 a 5 días. Por otra parte, concluimos que los genes de referencia estudiados no mostraron ser útiles para el análisis de expresión en *M. enterolobii* y que el gen *RSP6* es regulado a la baja durante el ciclo. Adicionalmente, los genes *TCTP*, *TTL5* y *SP12*, relacionados a la patogenicidad en otras especies de *Meloidogyne*, mostraron poca regulación y por tanto adecuados como referencias en *M. enterolobii*, excepto por el gen *TCTP*.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, C. L., Jensen J. L., y Orntoft T. F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64(15), 5245–50.
- Ali, M. A., Azeem F., Li H., y Bohlmann H. 2017. Smart parasitic nematodes use multifaceted strategies to parasitize plants. *Frontiers in plant science.* 8, 1699.
- Bird, A. F. 1968. Changes associated with parasitism in nematodes, iii. ultrastructure of the egg shell, larval cuticle and contents of the subventral glands in *Meloidogyne javanica*, with some observations on hatching. *J. Parasitol.* 54:475-489.
- Bustin, S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., *et al.* 2009. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments. *Clin Chem.* 55 (4), 611–22.
- Cabral, D., Banora, M. Y., Antonino, J. D., Rodiuc, N., Vieira, P., Coelho, R. R., ... & de Almeida Engler, J. 2020. The plant WEE1 kinase is involved in checkpoint control activation in nematode-induced galls. *New phytologist*, 225(1), 430-447.
- Caillaud, M. C., Dubreuil G., Quentin M., Perfus-Barbeoch L., Lecomte P., de Almeida Engler J., ... Favery B. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology.* 165(1), 104–113.
- Chen, J., Lin B., Huang Q., Hu L., Zhuo K., y Liao J. 2017. A novel *Meloidogyne graminicola* effector, MgGPP, is secreted into host cells and undergoes glycosylation in concert with proteolysis to suppress plant defenses and promote parasitism. *PLoS Pathog.* 13: e1006301.
- Chen, J., Li Z., Lin B., Liao J., y Zhuo K. 2021. A *Meloidogyne graminicola* pectate Lyase is involved in virulence and activation of host Defense responses. *Front. Plant Sci.* 12, 401.
- Chen, J., Hu L., Sun L., Lin B., Huang K., Zhuo K., *et al.* 2018. A novel *Meloidogyne graminicola* effector, MgMO237, interacts with multiple host defence-related proteins to manipulate plant basal immunity and promote parasitism. *Mol. Plant Pathol.* 19, 1942–1955.
- Collett, R. L., Rashidifard M., Marais M. *et al.* 2024. Insights into the life-cycle development of *Meloidogyne enterolobii*, *M. incognita* and *M. javanica* on tomato, soybean and maize. *Eur J Plant Pathol.* 168, 137–146.
- Costa, M. G. S., Garcia M J. D. M., y Perdoná M. J. 2020. Resistance of macadamia walnut against *Meloidogyne enterolobii* and *Meloidogyne javanica*. *Phytoparasitica* 48, 397–405
- Cruz-Lachica, I., Marquez-Zequera I., Allende-Molar R., Leon-Felix J., Sañudo-Barajas J. A., Ley-Lopez N., y Garcia-Estrada, R. S. 2018. Infection process of *Gilbertella persicaria* in papaya (*Carica papaya* L.) fruits. *Journal of General Plant Pathology*, 84(5), 339-342.
- Curtis, R. H., Robinson, A. F., y Perry, R. N. 2009. Hatch and host location. *Root-knot nematodes*, 139-162.
- Davies, L. J., Zhang, L., y Elling, A. A. 2015. The *Arabidopsis thaliana* papain-like cysteine

- protease RD21 interacts with a root-knot nematode effector protein. *Nematology* 17, 655–666.
- Ding, X., Shields, J., Allen, R., y Hussey, R. S. 1998. A secretory cellulose-binding protein cDNA cloned from the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(10), 952-959.
- Di Vito, M., Greco, N. y Carella, A. 1986. The effect of *Meloidogyne incognita* and importance of the inoculum on yield of eggplant. *Journal of Nematology*. 18, 487–90.
- Dong, W., Holbrook, C. C., Timper, P., Brennenman, T. B. y Mullinix, B. G. 2007. Comparison of methods for assessing resistance to *Meloidogyne arenaria* in peanut. *Journal of Nematology* 39, 169–75.
- Dubreuil, G., Magliano, M., Deleury, E., Abad, P., y Rosso, M. N. 2007. Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. *New Phytol.* 176, 426–436.
- Gerdol, M., Cervelli, M., Mariottini, P., Oliverio, M., Dutertre, S., y Modica, M. V. 2019. A recurrent motif: diversity and evolution of ShKT domain containing proteins in the vampire snail *Cumia reticulata*. *Toxins*, 11(2), 106.
- Ginzinger, D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 30(6), 503–12.
- Gleason, C., Polzin, F., Habash, S.S., Zhang, L., Utermark, J., Grundler F.M., y Elashry A. 2017. Identification of two *Meloidogyne hapla* genes and an investigation of their roles in the plant–nematode interaction. *Mol Plant Microbe Interact*, 30, 101-112.
- Gómez-González, G., Márquez-Zequera, I., Cruz-Lachica, I., Osuna-García, L. A., and García-Estrada, R. S. 2020. First Report of *Meloidogyne enterolobii* Parasitizing Cucumber in Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*. 104(4), 1260-1260.
- Grijalva-Mañay, R., Dorca-Fornell, C., Enríquez-Villacreses, W., Miño-Castro, G., Oliva, R., Ochoa, V., ... y Armijos-Jaramillo, V. 2019. DnaJ molecules as potential effectors in *Meloidogyne arenaria*. An unexplored group of proteins in plant parasitic nematodes. *Communicative & Integrative Biology*, 12(1), 151-161.
- Haegeman, A., Bauters, L., Kyndt, T., Rahman, M. M. y Gheysen, G. 2013. Identification of candidate effector genes in the transcriptome of the rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Mol. Plant Pathol.* 14, 379–390.
- Heid, C. A., Stevens J., Livak K.J., y Williams, P. M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-994.
- Hellemans, J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8(2).
- Hooper, D. J., Hallmann, J. y Subbotin, A. S. 2005. “Extraction, processing and detection of plant and soil nematodes”, In Luc, M., Bridge, J. and Sikora, R. A. (Eds), *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture* 2nd ed, *CAB International*, Oxfordshire, pp. 53–86.
- Hu, W, y DiGennaro, P. M. 2019. Identification of Suitable *Meloidogyne* spp. Housekeeping

Genes. *J Nematol.* 51: e2019-55.

- Huang, G., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J., y Hussey, R. S. 2006. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 14302–14306.
- Huang, G., Dong, R., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J., y Hussey, R. S. 2005. Developmental expression and molecular analysis of two *Meloidogyne incognita* pectate lyase genes. *International journal for parasitology*, 35(6), 685-692.
- Huang, G., Gao, B., Maier, T., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J., et al. 2003. A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 376–381.
- Hussey, R.S., and Barker K.R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp. including a new technique. *Plant Dis Rep.* 57, 1025-1028.
- Iberkleid, I., Vieira, P., de Almeida Engler, J., Firester, K., Spiegel, Y., y Horowitz, S. B. 2013. Fatty acid-and retinol-binding protein, Mj-FAR-1 induces tomato host susceptibility to root-knot nematodes. *PloS one*, 8(5), e64586.
- Jammes F., Lecomte, P., de Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M. L., Renou, J. P., et al. 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *Plant J*, 44, 447–58.
- Jaouannet, M., Magliano, M., Arguel, M. J., Gourgues, M., Evangelisti, E., Abad, P., y Rosso, M. N. 2013. The root-knot nematode calreticulin Mi-CRT is a key effector in plant defense suppression. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 26(1), 97-105.
- Jaramillo, M. L., Ammar, D., Quispe, R. L., Guzman, F., Margis, R., Nazari, E. M., et al. 2017. Identification and evaluation of reference genes for expression studies by RT-qPCR during embryonic development of the emerging model organism, *Macrobrachium olfersii*. *Gene*, 598, 97–106.
- Jaubert, S., Milac, A. L., Petrescu, A. J., de Almeida-Engler, J., Abad, P., y Rosso, M. N. 2005. In planta secretion of a calreticulin by migratory and sedentary stages of root-knot nematode. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(12), 1277-1284.
- Jaubert, S., Laffaire, J. B., Piotte, C., Abad, P., Rosso, M. N., & Ledger, T. N. 2002. Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. *Molecular and biochemical parasitology*, 121(2), 205-211.
- Jones, M. G. K., y Payne, H. L. 1978. Early stages of nematode-induced giant cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. *J Nematol.* 10, 70–84.
- Kamaruzzaman, M., Zhao, L. F., Zhang, J. A., Zhu, L. T., Li, Y., Deng, X. D., ... y Wang, X. 2023. MiPDCD6 effector suppresses host PAMP-triggered immunity to facilitate *Meloidogyne incognita* parasitism in tomato. *Plant Pathology*, 72(1), 195-206.
- Karssen, G. y Moens, M. 2006. Root-knot nematodes. En: Perry, R.N. and Moens, M. (eds) *Plant Nematology*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 59–90.
- Kiewnick, S., Karssen G., Brito J. A., Oggenfuss, M., y Frey, J. E. 2008. First report of root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* on tomato and cucumber in Switzerland. *Plant Disease*. 92(9), 1370-1370.

- Li, X., Yang D, Niu J, Zhao J, Jian H. De Novo Analysis of the Transcriptome of *Meloidogyne enterolobii* to Uncover Potential Target Genes for Biological Control. *Int J Mol Sci.* 2016 Sep 1;17(9), 1442.
- Lin, B., Zhuo, K., Chen, S., Hu, L., Sun, L., Wang, X., *et al.* 2016. A novel nematode effector suppresses plant immunity by activating host reactive oxygen species scavenging system. *New Phytol.* 209, 1159–1173.
- Maggenti, A. 1981. *General nematology*. Springer Series in Microbiology. (USA.).
- Marques, M., Oliveira, M., Pereira, P., y Rocha, M. 2020. Penetration and development of *Meloidogyne enterolobii* in resistant and susceptible *Capsicum* spp. *European Journal of Horticultural Science*, 85(2), 86–91.
- Matz, M. V, Wright RM, y Scott JG. 2013. No control genes required: Bayesian analysis of qRT-PCR data. *PLoS One.* 8(8):e71448.
- McClure, M.A., Kruk T.H., y Misaghi I. 1973. A method for obtaining quantities of clean *Meloidogyne* eggs. *J Nematol.* 5, 230.
- Mejias, J., Truong, N. M., Abad, P., Favery, B., y Quentin, M. 2019. Plant proteins and processes targeted by parasitic nematode effectors. *Frontiers in plant science*, 10.
- Melillo, M. T., Leonetti, P., Bongiovanni, M., Castagnone-Sereno, P., Bleve-Zacheo, T. 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during compatible and incompatible tomato–root-knot nematode interactions. *New Phytol.* 170, 501–12.
- Naalden, D., Haegeman, A., de Almeida-Engler, J., Birhane Eshetu, F., Bauters, L., y Gheysen, G. 2018. The *Meloidogyne graminicola* effector Mg16820 is secreted in the apoplast and cytoplasm to suppress plant host defense responses. *Mol. Plant Pathol.* 19, 2416–2430.
- Niu, J., Liu, P., Liu, Q., Chen, C., Guo, Q., Yin, J., ... y Jian, H. 2016. Msp40 effector of root-knot nematode manipulates plant immunity to facilitate parasitism. *Scientific reports*, 6, 19443.
- Nguyen, C. N., Perfus-Barbeoch, L., Quentin, M., Zhao, J., Magliano, M., Marteu, N., *et al.* 2018. A root-knot nematode small glycine and cysteine-rich secreted effector, MiSGCR1, is involved in plant parasitism. *New Phytol.* 217, 687–699.
- Nguyễn, P. V., Bellafiore, S., Petitot, A. S., Haidar, R., Bak, A., Abed, A., ... y Fernandez, D. 2014. *Meloidogyne incognita*-rice (*Oryza sativa*) interaction: a new model system to study plant-root-knot nematode interactions in monocotyledons. *Rice*, 7(1), 1-13.
- Pfaffl, M. W 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9):e45.
- Pu, W., Xiao, K., Luo, S., Zhu, H., Yuan, Z., Gao, C., y Hu, J. 2022. Characterization of five *Meloidogyne incognita* effectors associated with PsoRPM3. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1498.
- Qin, X., Xue, B., Tian, H., Fang, C., Yu, J., Chen, C., ... y Wang, X. 2022. An unconventionally secreted effector from the root knot nematode *Meloidogyne incognita*, Mi-ISC-1, promotes parasitism by disrupting salicylic acid biosynthesis in host plants. *Molecular plant pathology*, 23(4), 516-529.
- Rashidifard, M., Fourie, H., Véronneau, P.-Y., Marais, M., Daneel, M. S., y Mimee, B. 2018.

Genetic diversity and phylogeny of South African *Meloidogyne* populations using genotyping by sequencing. *Scientific Reports*, 8, 13816.

Ravichandra, N.G. 2014. Horticultural nematology. *Springer* India.

Robledo, D, Hernandez-Urcera J, Cal RM, Pardo BG, Sanchez L, Martinez P, *et al.* 2014. Analysis of qPCR reference gene stability determination methods and a practical approach for efficiency calculation on a turbot (*Scophthalmus maximus*) gonad dataset. *BMC Genomics*. 15.

Ruijter, J. M, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, y Moorman AF. 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* 37(6):e45.

Rutter, W. B., Hewezi, T., Abubucker, S., Maier, T. R., Huang, G., Mitreva, M., and Baum, T. J. 2014. Mining novel effector proteins from the esophageal gland cells of *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(9), 965-974.

Schmittgen, T. D, y Livak K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 3(6), 1101–8.

Shao, H., Zhang, P., You, C., Li, C., Feng, Y., y Xie, Z. 2020. Genetic Diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* in Mulberry Based on the Mitochondrial COI Gene. *Ecology and Evolution*, 10(12), 5391-5401.

Shi, Q., Mao, Z., Zhang, X., Zhang, X., Wang, Y., Ling, J., Lin, R., Li, D., Kang, X., Sun, W. *et al.* 2018. A *Meloidogyne incognita* effector MiISE5 suppresses programmed cell death to promote parasitism in host plant. *Sci Rep.* 8, 7256.

Shukla, N., Yadav, R., Kaur, P., Rasmussen, S., Goel, S., Agarwal, M., ... Kumar, A. 2018. Transcriptome analysis of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*)-infected tomato (*Solanum lycopersicum*) roots reveals complex gene expression profiles and metabolic networks of both host and nematode during susceptible and resistance responses. *Molecular Plant Pathology*, 19(3), 615-633.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultado en diciembre de 2023 en <https://www.gob.mx/siap>

Sikora, R. A., y Fernandez, E. 2005. Nematode parasites of vegetables. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. *CAB International.* 2, 319-392.

Song, H., Lin, B., Huang, Q., Sun, T., Wang, W., Liao, J., & Zhuo, K. (2021). The *Meloidogyne javanica* effector Mj2G02 interferes with jasmonic acid signalling to suppress cell death and promote parasitism in Arabidopsis. *Molecular plant pathology*, 22(10), 1288-1301.

Stetina, S. R., McGawley E.C., y Russin, J.S. 1997. Extraction of root-associated *Meloidogyne incognita* and *Rotylenchulus reniformis*. *Journal of Nematology* 29, 209–215.

Taylor, A. L. 1977. Introducción a la nematología vegetal aplicada: guía de la FAO para el estudio y combate de los nematodos parásitos de las plantas. Roma (Italy) *FAO*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF2016027604>

Tian, Z. L., Wang, Z. H., Maria, M., Qu, N., y Zheng, J. W. 2019. *Meloidogyne graminicola* protein disulfide isomerase may be a nematode effector and is involved in protection against oxidative damage. *Scientific reports*, 9(1), 11949.

- Truong, N. M., Nguyen, C. N., Abad, P., Quentin, M. y Favery, B. 2015. Function of root-knot nematode effectors and their targets in plant parasitism. In: *Advances in Botanical Research*, Vol. 73 (Escobar, C., Fenoll, C., eds), pp. 293–324. Elsevier, USA.
- Vandesompele, J., De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, *et al.* 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7), 0034.1.
- Velloso, J. A., Maquilan, M. A. D., Campos, V. P., Brito, J. A. y Dickson, D. W. 2022. Temperature effects on development of *Meloidogyne enterolobii* and *M. floridensis*. *Journal of Nematology*, 54(1).
- Vieira, P., y Gleason, C. 2019. Plant-parasitic nematode effectors—insights into their diversity and new tools for their identification. *Current opinion in plant biology*, 50, 37-43.
- Vovlas, N., Mifsud, D., Landa, B. B. y Castillo, P. 2005. Pathogenicity of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on potato. *Plant Pathology*, 54, 657–64.
- Vrain, T.C. 1977. A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. *Journal of Nematology*. 9, 249-251.
- Wang, X., Xue, B., Dai, J., Qin, X., Liu, L., Chi, Y., ... y Li, H. 2018. A novel *Meloidogyne incognita* chorismate mutase effector suppresses plant immunity by manipulating the salicylic acid pathway and functions mainly during the early stages of nematode parasitism. *Plant pathology*, 67(6), 1436-1448.
- Wang, X., Li, H., Hu, Y., Fu, P., y Xu, J. 2007. Molecular cloning and analysis of a new venom allergen-like protein gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Experimental parasitology*, 117(2), 133-140.
- Wu, X., Yu, H., Yang, R., Zhou, Y., Zhu, X., Wang, Y., ... y Duan, Y. 2019. Evaluation of suitable reference genes for gene expression analysis in the northern root-knot nematode, *Meloidogyne hapla*. *Plos one*, 14(6), e0218610.
- Welbaum, G.E. 2015. Vegetable production and practices. *CAB International*.
- Wiggers, R. J., Starr, J. L., Price, H. J. 1990. DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology*, 80, 1391–5.
- Xie, F., Wang, J., y Zhang, B. 2023. RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. *Functional & Integrative Genomics*, 23(2), 1-5.
- Xie, J., Li, S., Mo, C., Wang, G., Xiao, X., y Xiao, Y. 2016. A novel *Meloidogyne incognita* effector Misp12 suppresses plant defense response at latter stages of nematode parasitism. *Frontiers in plant science*, 7, 964.
- Xie, F., Xiao, P., Chen, D., Xu, L., y Zhang, B. 2012. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant molecular biology*, 80, 75-84.
- Zhao, J., Sun, Q., Quentin, M., Ling, J., Abad, P., Zhang, X., ... y Xie, B. 2021. A *Meloidogyne incognita* C-type lectin effector targets plant catalases to promote parasitism. *New Phytologist*, 232(5), 2124-2137.
- Zhao, J., Mejias, J., Quentin, M., Chen, Y., de Almeida-Engler, J., Mao, Z., ... y Jian, H. 2020. The root-knot nematode effector MiPDI1 targets a stress-associated protein (SAP) to establish

disease in Solanaceae and *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 228(4), 1417-1430.

Zhuo, K., Naalden, D., Nowak, S., Xuan Huy, N., Bauters, L., y Gheysen, G. 2019. A *Meloidogyne graminicola* C-type lectin, Mg01965, is secreted into the host apoplast to suppress plant defence and promote parasitism. *Mol. Plant Pathol.* 20, 346–355.

Zhuo, K., Chen, J., Lin, B., Wang, J., Sun, F., Hu, L., y Liao, J. 2017. A novel *Meloidogyne enterolobii* effector MeTCTP promotes parasitism by suppressing programmed cell death in host plants. *Molecular plant pathology*, 18(1), 45-54.

Zhou, J. J., Zhang, X. P., Rui, L. I. U., Jian, L. I. N. G., Yan, L. I., Yang, Y. H., ... y Mao, Z. C. 2023. A *Meloidogyne incognita* effector Minc03329 suppresses plant immunity and promotes parasitism. *Journal of Integrative Agriculture*, 22(3), 799-811.