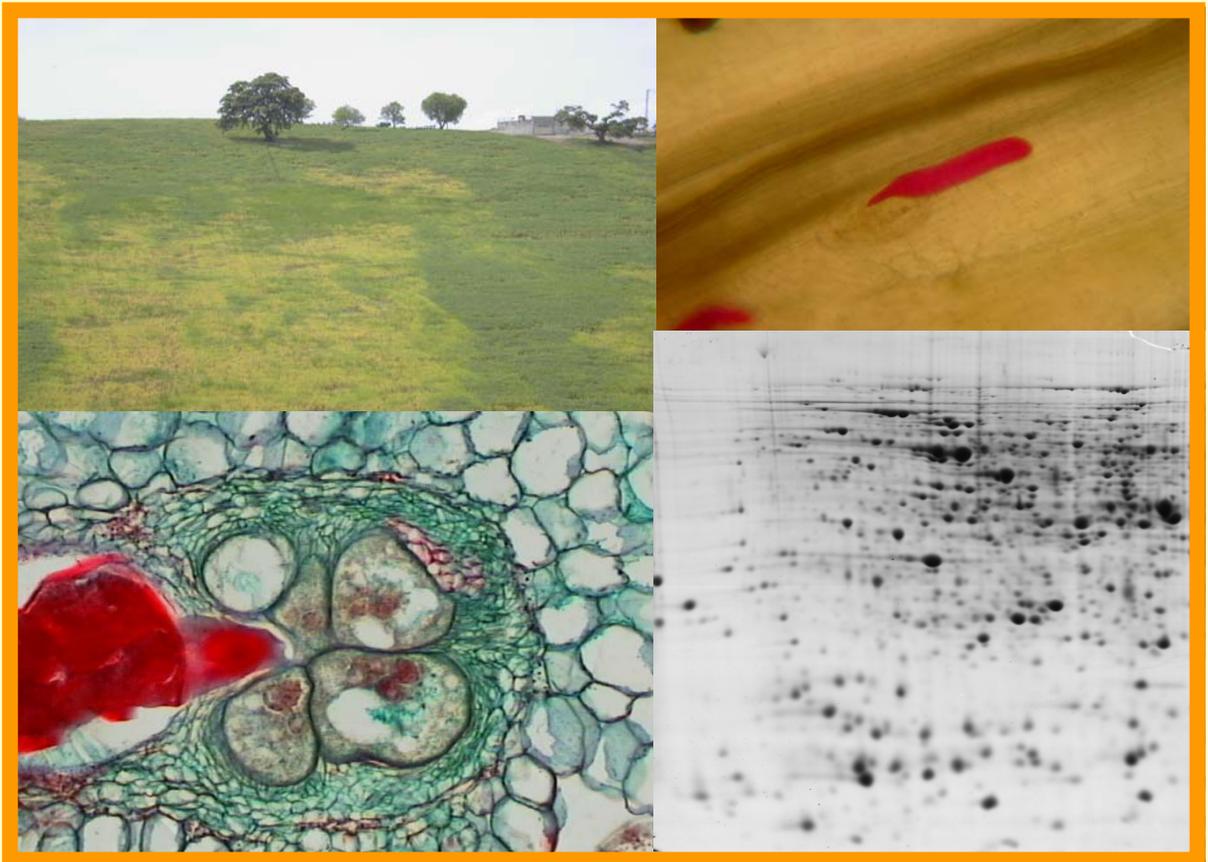


ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS Y DE MONTES
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

TESIS DOCTORAL

“Estudio de los mecanismos de interacción entre *Meloidogyne artiellia* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en genotipos de garbanzo”



DIRECTORES

Dr. Pablo Castillo Castillo

Prof. Dr. Manuel Tena Aldave

DOCTORANDO

Juan Emilio Palomares Rius

Córdoba, abril de 2009

TITULO: *Estudio de los mecanismos de interacción entre Meloidogyne artiellia y Fusarium oxysporum f.sp. ciceris en genotipos de garbanzo*

AUTOR: *JUAN EMILIO PALOMARES RIUS*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2009
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ISBN-13: 978-84-7801-960-1
D.L.: CO 972-2009



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS Y DE MONTES
DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

TESIS DOCTORAL

“Estudio de los mecanismos de interacción entre *Meloidogyne artiellia* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en genotipos de garbanzo”

DOCTORANDO:

Juan Emilio Palomares Rius

VºBº:

Los DIRECTORES

Dr. Pablo Castillo Castillo
Investigador Científico
Molecular
Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC

Prof. Manuel Tena Aldave
Catedrático de Bioquímica y Biología
Universidad de Córdoba

TUTOR

Prof. Rafael M. Jiménez Díaz
Catedrático de Patología
Universidad de Córdoba

Córdoba, Abril de 2009

D. Pablo Castillo Castillo, Investigador científico del Instituto de Agricultura Sostenible del CSIC y
D. Manuel Tena Aldave, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la
Universidad de Córdoba,

INFORMAN: Que el trabajo “Estudio de los mecanismos de interacción entre *Meloidogyne artiellia* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en genotipos de garbanzo”, que ha llevado a cabo el Ingeniero Agrónomo, Juan Emilio Palomares Rius bajo nuestra dirección, lo consideramos ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, Abril de 2009

Dr. Pablo Castillo Castillo
Investigador Científico
Molecular
Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC

Prof. Manuel Tena Aldave
Catedrático de Bioquímica y Biología
Universidad de Córdoba

D. Rafael M. Jiménez Díaz, Catedrático del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba.

INFORMA: Que considera satisfactoriamente finalizado el trabajo “Estudio de los mecanismos de interacción entre *Meloidogyne artiellia* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en genotipos de garbanzo”, llevado a cabo el Ingeniero Agrónomo, Juan Emilio Palomares Rius bajo la dirección del Dr. Pablo Castillo Castillo y el Prof. Manuel Tena Aldave, y en consecuencia puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba.

Córdoba, Abril de 2009

Prof. R. M. Jiménez Díaz
Catedrático de Patología Vegetal
Universidad de Córdoba

Este Trabajo ha sido realizado en el Grupo PAIDI AGR 136 'Sanidad Vegetal' del Instituto de Agricultura Sostenible de Córdoba, CSIC, y el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba, gracias a la concesión de una beca de Beca de Formación de Personal Investigador (FPI-MEC), y a través del Proyecto de Investigación "Supresión de la resistencia a enfermedades por la interacción entre agentes fitopatógenos "in planta": factores y mecanismos" financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2003-00640).

Córdoba, Abril de 2009

BIOGRAFÍA

Juan Emilio Palomares Rius nació en Valencia el 11 de agosto de 1977.

En 1997 inició sus estudios de Ingeniero Agrónomo en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes de la Universidad Politécnica de Valencia, obteniendo su título en 2002. En el Curso Académico 2001/02 realizó una estancia de ocho meses como estudiante ERASMUS en la Warsaw Agricultural University, Polonia, durante la cual realizó su Trabajo Profesional Fin de Carrera titulado 'Técnicas de detección en virología vegetal' con la calificación máxima de Matrícula de Honor. Durante tres meses en el año 2002 obtuvo una beca INTERCAMPUS en la Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina, durante la cual participó en Investigaciones en el Departamento de Patología Vegetal.

Posteriormente se dedicó al sector privado de la agricultura donde realizó su labor profesional en la gestión de fincas agrícolas, principalmente de cítricos y arroz.

En Junio de 2004 y hasta Junio de 2008 obtuvo una Beca de Formación de Personal Investigador (FPI-MEC) en el Departamento de Protección de Cultivos del Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC con el título de 'Supresión de la resistencia a enfermedades por la interacción entre agentes fitopatógenos "in planta": factores y mecanismos'. Las investigaciones realizadas durante estos años han dado lugar a la participación en Congresos nacionales e internacionales. Además, durante estos años ha realizado varias estancias en Centros de Investigación extranjeros (2005, Department of Plant Pathology, North Carolina State University, U.S.A., 3 meses; 2006, Western Australia State Agricultural Biotechnology Centre, Murdoch University, Perth, Australia, 3 meses; 2007, Institut National de la Recherche Agronomique (I.N.R.A.), Centre Sophia-Antipolis, Antibes, Francia, 6 meses).

Ha sido contratado como Titulado Superior de Actividades Técnicas y Profesionales en el Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC en el proyecto titulado "Evaluación de diversas prácticas de fertilización y de control biológico sobre las poblaciones del nematodo nodulador *Meloidogyne javanica* y el desarrollo vegetativo de plántones de olivo".

Actualmente está a la espera de la obtención del grado de Doctor para poder optar a alguna de las becas post-doctorales para continuar sus investigaciones en el campo de la fitopatología.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido en la elaboración de este trabajo. La tesis ha contribuido a enriquecerme tanto desde el punto de vista científico como personal, aunque tal vez algunos aspectos podrían haber sido mejores, o haberse planteado de forma diferente, ..., pero teníamos que marcar un límite final, y en cualquier caso se ha intentado hacer lo mejor posible.

A los directores del presente trabajo. A Manuel Tena Aldave agradezco su consejos, su experiencia, la ayuda en los aspectos bioquímicos y moleculares, y el celo que mostró en la corrección de los ejemplares provisionales. A Pablo Castillo, con el que he disfrutado la mayoría del tiempo de la tesis, le debo el haberme contagiado la pasión por la Nematología. El ánimo que siempre me ha intentado transmitir en los momentos de debilidad psicológica ha sido muy importante, así como su inagotable capacidad de trabajo. Tanto desde el punto de vista científico como personal es una gran persona que siempre ha estado preocupado por mí en los momentos buenos y malos, y espero que en el futuro podamos seguir realizando trabajos juntos, y disfrutando de su amistad. A Rafael Jiménez Díaz le agradezco todos los consejos y puntualizaciones fitopatológicas, los cuales provienen de un gran maestro fitopatólogo y que en muchos casos por los avances tecnológicos actuales pude haber perder de vista.

A todas las personas que con su tiempo, su dedicación y la desinteresada contribución de sus conocimientos y recursos permitieron enriquecer este trabajo. A Jesús Jorrín y Ana Maldonado, que me han contagiado el "virus" de la proteómica, por la cálida acogida en su grupo, sus consejos científicos, su interés constante y los buenos momentos en Congresos, desayunos,... espero seguir infectado por este "virus" por mucho más tiempo. A Juan Antonio y Blanca, por su interés en muchos apartados de la tesis, sus consejos, por siempre estar abiertos a ayudarme.

A todas las personas que me han ayudado y acompañado en ambos laboratorios en los que se ha desarrollado la tesis. A Miguel, M^a Angeles, Sira, Inma, Rafa, etc., en general a todo el grupo de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la UCO por ayudarme siempre y principalmente tener paciencia en los principios, así como por los desayunos y comidas tan divertidas en el departamento. A Jorge, Carolina, Carlos, Miguel, Fran, Guillermo, Sergio, Dani, Efrén, José Luís, Gema, Conchi, José, Víctor, Rafa, etc,...por ayudarme y acompañarme durante este periodo de tiempo en el Instituto de Agricultura Sostenible-CSIC, sin la ayuda de muchos de ellos este trabajo no habría sido posible.

A mis compañeras de despacho, Angu y Azahara, con las que por casualidad hemos escrito la tesis casi a la vez, por los buenos momentos juntos en el despacho y algunas pequeñas charlas para animar el ambiente.

A todos mis amigos, tanto los de Córdoba como los de Cullera, que siempre han estado apoyando en los momentos más duros de la realización y escritura de la tesis.

A mis padres, Emilio y Francisca, y a mis hermanos, Anna y Xavi, que son las personas a las que más debo estar aquí, de las cuales he aprendido muchas cosas y me han apoyado siempre.

RESUMEN

Garbanzo (*Cicer arietinum* L.) puede verse afectada por más de 50 enfermedades en diversas partes del mundo. La Fusariosis Vascular del garbanzo (FVG), es una de las más importantes enfermedades y uno de los factores limitantes del cultivo en todo el mundo, está causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & Sato, hongo anamorfo que puede sobrevivir en el suelo y en los restos vegetales en forma de clamidosporas hasta 6 años. La FVG puede provocar pérdidas en el rendimiento que pueden llegar al 10 % en la India, 10-15 % en España, y hasta un 40 % en Tunicia, incluso la completa pérdida del cultivo en los años con ataques más severos de la enfermedad.

El manejo de la enfermedad está principalmente basado en: el adelanto de la fecha de siembra, labores profundas durante el periodo estival, tratamiento de las semillas con fungicidas protectores, sistémicos ó con mezclas, solarización, antagonistas fúngicos y bacterianos. Sin embargo, la estrategia más práctica y económicamente eficiente es la utilización de cultivares resistentes. La resistencia se ve amenazada por la existencia de: (i) ocho razas patogénicas designadas como 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5, y 6, las cuales pueden ser clasificadas en dos patotipos, el de amarillez (razas 0 y 1B/C) y de marchitez (razas de la 1A a la 6), de acuerdo con el síndrome provocado en la planta, y (ii) interacciones por múltiples infecciones entre nematodos fitoparásitos y el genotipo resistente del huésped, así en las especies del género *Meloidogyne* y particularmente el nematodo de las leguminosas y los cereales (*Meloidogyne artiellia*), en interacciones incompatibles a la FVG puede resultar en la rotura de la resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. La siembra primaveral de garbanzo puede resultar más dañada por el nematodo que las siembras invernales, principalmente porque las condiciones de humedad y temperatura son la óptimas para el desarrollo del nematodo y este momento es cuando las plantas son más sensibles a la infección por el nematodo. Sin embargo, dependiendo del cultivar, la resistencia puede ser mantenida a pesar de la co-infección por ambos patógenos.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido el determinar y analizar los posibles mecanismos relacionados con la pérdida/mantenimiento de la resistencia a FVG cuando las plantas están co-infectadas por ambos patógenos. Este estudio ha sido realizado desde dos escenarios: i) como la combinación de diferentes inoculaciones, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (*Foc-5*), *M. artiellia*, y las inoculaciones simultáneas de ambos patógenos y ii) desde el punto de vista de los genotipos, pérdida de resistencia (línea CA336.14.3.0) y mantenimiento de la resistencia (línea ICC14216K) a la co-infección de ambos patógenos. Se han utilizado dos aproximaciones, una

mediante técnicas proteómicas, más amplia y no discriminativa y otra mediante el estudio de la expresión de genes relacionados con la patogénesis.

El reconocimiento mediante proteínas codificadas por los genes de resistencia debe activar la respuesta defensiva a *Foc-5*. La respuesta defensiva activada puede ser modificada ó bloqueada por los efectos del parasitismo inducidos por *M. artiellia* en las plantas de garbanzo. Con esta premisa hemos intentado encontrar los aspectos que están implicados en la respuesta defensiva al comparar las tres posibles inoculaciones mencionadas anteriormente.

El primer bloque de experimentos estuvo relacionado con los estudios proteómicos. Los experimentos preliminares mostraron una dilución de la respuesta en plantas infectadas solamente por *M. artiellia*, en un periodo comprendido desde los 2 a los 18 DAI (Days After Infection). Por esta razón, el primer estudio se centró en la interacción con *Foc-5* a los 4 y 8 DAI. En este estudio, a pesar de los resultados iniciales, la respuesta fue débil y complicada de enlazar con una posible respuesta defensiva a *Foc-5*. Sin embargo, las diferencias en proteínas constitutivas entre ambas líneas fueron abundantes, principalmente relacionadas con la respuesta defensiva, pero muy variable desde el punto de vista temporal y difícil de enlazar con algún patógeno específico, probablemente debido a una dilución de la respuesta defensiva en las etapas tempranas de la interacción (4-8 DAI). Por este motivo, se decidió atrasar el periodo de muestreo a fases más avanzadas de la infección por patógenos (35-40 DAI) y focalizada en las diminutas nodulaciones inducidas por el nematodo en los tratamientos con *M. artiellia* y ambos patógenos, y piezas de raíces de edad similar a las de nodulaciones en los tratamientos con *Foc-5* y los controles. En estudios preliminares, la hembra adulta del nematodo incluida en el nódulo provocaron la contaminación de proteínas de nematodo en los geles, consecuentemente, la hembra en cada nódulo fue cuidadosamente retirada del nódulo. Las diferencias proteicas fueron abundantes, especialmente en la interacción compatible (línea CA336.14.3.0 inoculada con *Foc-5* + *M. artiellia*). La expresión/represión de algunas proteínas puede ser asociada con la patogénesis/resistencia (quitinasa clase I, metabolismo secundario, enzimas relacionados con el metabolismo de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), proteínas de unión a nucleótidos y una proteína R). Algunas repuestas proteicas fueron las mismas a los tratamientos en ambas líneas de garbanzo, en este grupo de estudio pueden incluirse a una proteína R y el enzima ascorbato oxidasa. Es importante enfatizar el bajo nivel de identificación en este último experimento, probablemente debido a la baja cantidad de proteína aplicada en los geles o al número de secuencias depositadas en las bases de datos del genoma de garbanzo. El otro proteoma estudiado fue el proteoma del apoplasto. El apoplasto es probablemente el principal medio de interacción entre el garbanzo y *Foc-5*. En este caso, la respuesta fue nula ó muy débil en toda la raíz (muestreando al comienzo o plena expresión

de síntomas). La hipótesis de la translocación de compuestos producidos por el nematodo e implicados en la rotura de la resistencia fue testada mediante un experimento con “split-root”. La resistencia no fue superada por la inoculación de los patógenos separadamente en ambas partes radicales de la misma planta. El proteoma del fluido apoplástico en este experimento no mostró ninguna diferencia entre los diferentes tratamientos.

Similarmente, la expresión de genes relacionados con la respuesta defensiva (ruta fenilpropanoide y genes seleccionados del estudio proteómico) fue estudiada en diferentes periodos temporales, así como en diferentes tejidos. La respuesta de estos genes a los 2 DAI no fue clara ni concluyente en ambas líneas de garbanzo. A los 4 DAI, la expresión de los genes fenilalanina amoniaco liasa (PAL), trans-cinnamato 4-monoxigenasa (C4H) y isoflavona reductasa (IFR) fue inducida en la inoculación con *Foc-5* y la inoculación simultánea de ambos patógenos en ambas líneas. Sin embargo, la represión de los genes chalcona sintasa (CHS), isoflavona 2'-hidroxilasa (I2'H), isoflavona reductasa (IFR) y *cyp81D9* en las plantas inoculadas con *M. artiellia* en 'CA336.14.3.0' podría tener cierto papel en la respuesta diferencial entre ambas líneas de garbanzo. El segundo experimento se realizó del mismo modo que el proteómico en las fases más avanzadas de la interacción a los 35-40 DAI, pero en este caso, se observaron pocas diferencias en el comportamiento de la expresión de genes entre ambas líneas. La expresión de los otros genes (quitinasa clase I y catalasa) fue muy compleja en los periodos temporales estudiados. La resistencia no puede estar asociada con la expresión de estos genes; sin embargo, se observa alguna represión asociada con plantas de 'CA336.14.3.0' inoculadas con *M. artiellia*. La aproximación mediante la utilización de la Microdissección por Láser de citoplasmas se realizó en muestras de raíces a los 35-40 DAI, pero el resultado no fue satisfactorio y se deben considerar como un estudio preliminar. En este caso, la respuesta puede ser influenciada, en cierta manera, por el largo transporte a Perth (Australia) y la inherente manipulación producida en la técnica.

Finalmente, para detectar los diferentes mecanismos relacionados con la pérdida/mantenimiento de la resistencia a FVG cuando las plantas están co-infectadas por ambos patógenos. Las técnicas proteómicas han sido más apropiadas en periodos más largos de muestreo, mientras que los estudios de expresión génica han mostrado ser más adecuados en periodos cortos posteriores a las inoculaciones. Probablemente, la posibilidad de amplificación en los experimentos de expresión génica ha sido importante en estos resultados. La posibilidad del escaso crecimiento del hongo infectando la raíz de garbanzo en líneas resistentes o una concentración de la respuesta en el cilindro vascular puede explicar la baja respuesta proteica en el periodo de 4 y 8 DAI y en el fluido apoplástico. La respuesta diferencial tanto proteómica como de

expresión génica de ambas líneas podrían explicar parcialmente y con las limitaciones de las aproximaciones estudiadas, la pérdida/mantenimiento de la resistencia a la FVG cuando las plantas son co-infectadas por ambos patógenos.

SUMMARY

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is affected by more than 50 diseases in diverse parts of the world. Fusarium wilt of chickpea, caused by *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & Sato, is one of the most important diseases and limiting factors of chickpea production worldwide. The pathogen is an anamorphic fungus which can survive in soil and plant debris by means of chlamydospores for at least 6 years. Fusarium wilt of chickpea produces yield losses of up to 10% in India, 10-15% in Spain, and up to 40 % in Tunisia, but total loss of the crop can occur in years of severe attacks by the disease.

Management of Fusarium wilt of chickpea is mainly based in: advance of sowing time, deep tilling during summer, seed dressing with commercial protective, systemic or mixtures of fungicides, solarisation, fungal and bacterial antagonists. However, the most practical and efficient economical method for controlling Fusarium wilt of chickpea worldwide is the use of resistant cultivars. Resistance is compromised by the existence of: (i) eight pathogenic races designated as 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5, and 6, which can be classified into two pathotypes, yellowing (races 0 and 1B/C) and wilting (races 1A through 6), according to the disease syndrome that they induce in the plant and (ii) interactions from multiple infections of the resistant host genotype by plant-parasitic nematodes, such as *Meloidogyne* spp. and particularly the cereal and legume root-knot nematode (*Meloidogyne artiellia*), in incompatible combinations resulting in breakdown resistance to *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. Spring-sowing chickpeas are more severely damaged by the nematode than winter-sowing, because optimal moisture and temperature conditions for nematode development occur soon after seed germination when plants are more sensitive to nematode infection. However, depending of the cultivar, the resistance could be maintained despite the co-infection of both pathogens.

The objectives of this Doctoral Dissertation were to determine and analyze the possible mechanisms related to loss/maintenance of resistance to Fusarium Wilt of chickpea when plants are co-infected by both pathogens. This study has been conducted in two possible scenarios i) as the combination of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* race 5 (*Foc-5*), *M. artiellia*, and the simultaneous inoculation of both pathogens and ii) a genotype which loss the resistance to Fusarium wilt (line CA336.14.3.0) and a genotype which maintains the resistance (line ICC14216K) to the co-infection of both pathogens. For that, two approaches has been used, a broad and non-discriminative proteomic study and a gene expression study of genes related to the pathogenesis.

The recognition by codified proteins from the resistance genes must activate the defensive response to *Foc-5*. The activated defensive response could be modified or blocked by the parasitism effects induced by *M. artiellia* on chickpea plants. With this premise we have tried to find which aspects are implicated in the defence response comparing the three possible inoculations mentioned above.

The first block of experiments was related to proteomic studies. Preliminary experiments showed a dilution response in plants infected only by *M. artiellia* during the period comprised from 2 to 18 Days After Inoculation (DAI). For this reason, the first study was related to the interaction with *Foc-5* at 4 and 8 DAI. In this study, despite the initial results, the response was weak and complicated to link with a defence response to *Foc-5*. However, the constitutive differences between chickpea lines were abundant, mainly related to defence response, but highly variable in a temporal pattern and difficult to relate with a specific plant pathogen. Probably due to a dilution response in early stages (4-8 DAI), the sampling period was delayed to an advanced stage of the pathogen infections (35-40 DAI) and was focused in minute root-galls induced by the nematode in the treatments with *M. artiellia* and both pathogens, and pieces of similar age to the root-galls in the treatments *Foc-5* and control. In preliminary studies, the nematode female included in the root-gall produced protein contamination in gels, consequently, the female in each gall was carefully removed. Protein differences were abundant and especially in the compatible interaction (line CA336.14.3.0 inoculated with *Foc-5* + *M. artiellia*). Differential protein expression/repression can be associated with the pathogenesis/resistance [chitinase class I, secondary metabolism, enzymes related to metabolism of Reactive Oxygen Species (ROS), binding nucleotide proteins, and an R protein]. Some protein responses were the same to treatments in both chickpea lines. In this group could be included an R protein and the enzyme ascorbate peroxidase. It is important to emphasize the low identification rate in this last experiment, probably because of the low protein quantity in the gels or the amount of chickpea sequences deposited in the databases. The other proteome studied was the root apoplast proteome. The apoplast is probably the main interaction environment between chickpea and *Foc-5*. In this case, the response was null or very weak in whole root (sampling at the beginning or complete symptoms expression). The hypothesis of substance translocation produced by the nematode involved in breakdown-resistance was tested by a split-root experiment. The resistance was not overcome by the pathogen inoculation in separate roots in the same plant. The proteome apoplast in this experiment did not show any difference between control and treatments.

Similarly, the expression of genes related to the defensive response (Phenylpropanoid pathway and selected genes from the proteomic study) was studied in different temporal periods, as well as in different tissues. The genes responses at 2 DAI were not clear and not conclusive in both

chickpea lines. While at 4 DAI, the expression of Phenylalanine ammonia-lyase (PAL), Trans-cinnamate 4-monoxygenase (C4H) and Isoflavone reductase (IFR) was induced in *Foc-5*-inoculation and simultaneous inoculation with both pathogens in both chickpea lines. However, the repression of genes Chalcona sintase (CHS), Isoflavona 2'-hydroxylase (I2'H), Isoflavone reductase (IFR) and Cyp81D9 in line CA336.14.3.0 inoculated with *M. artiellia* could have some role in the resistance as differential response between both chickpea lines. The second experiment was conducted in the same way as the proteomic study at 35-40 DAI, but in this case, few differential responses were observed between chickpea lines. Gene expression of the other two genes (chitinase class I and catalase) were highly complex in the studied temporal periods. Resistance could not be associated with the expression of these genes; however, some gene repression was associated with CA336.14.3.0 plants inoculated with *M. artiellia*. Also, an approach using Laser Catapulting Microdissection (LCM) was conducted in root samples at 35-40 DAI, but the result was not satisfactory and they must be considered as a preliminary study. This response could be influenced, in some way, for the long transport to Perth (Australia) and the inherent manipulation to LCM.

Finally, In order to detect differential mechanism in both lines, the proteomic technique has been more suitable in longer sampling periods, while, gene expression studies were showed better in shorter times after inoculations. Probably, the amplification possibility in gene expression experiments has been important in these results. The lower level of fungus infecting the root in chickpea resistant lines or a response concentration in vascular cylinder could explain the lower protein response in early sampling period or apoplastic fluid. The differential protein and gene expression of both lines could be explained partially and with the limitations due to the approaches used the loss/maintenance of resistance to Fusarium wilt when the plant is co-infected by both pathogens.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1.- LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL GARBANZO	1
1.1.1.- <i>CICER ARIETINUM</i>	1
1.1.2.- LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL GARBANZO	1
1.1.2.1.- Distribución geográfica de la enfermedad	1
1.1.2.2.- Sintomatología	2
1.1.2.3.- Variabilidad patogénica de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	4
1.1.2.4.- Proceso de infección	4
1.1.2.5.- Control de la enfermedad	6
1.1.3.- NEMATODOS NODULADORES DE RAÍCES	8
1.1.3.1.- Aspectos generales	8
1.1.3.2.- <i>Meloidogyne artiellia</i>	10
1.1.3.3.- Distribución geográfica de <i>M. artiellia</i>	11
1.1.3.4.- Sintomatología	11
1.1.3.5.- Ciclo vital y supervivencia	12
1.1.4.- INTERACCIONES DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS CON HONGOS PATÓGENOS DE SUELO	13
1.1.4.1.- Antagonismo	14
1.1.4.2.- Sinergismo	15
1.1.4.3.- Anulación de la resistencia raza-específica	15
1.2.- MECANISMOS MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO	16
1.2.1.- CONCEPTO DE ENFERMEDAD EN PLANTAS	16
1.2.2.- RESPUESTAS DE LAS PLANTAS FRENTE A AGENTES FITOPATÓGENOS BIÓTICOS	17
1.2.3.- RECONOCIMIENTO DEL PATÓGENO POR LA PLANTA Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	18
1.2.3.1.- El sistema defensivo de las plantas	18
1.2.3.2.- Desarrollo de la respuesta defensiva de las plantas	23
1.2.4.- MECANISMOS DE DEFENSA DE LA PLANTA	28
1.2.4.1.- Mecanismos constitutivos	28
1.2.4.2.- Mecanismos inducibles	29
1.3.- MECANISMOS DE LA INTERACCIÓN PLANTA-F. SP. DE <i>F. OXYSPORUM</i>	35
1.3.1.- GENES IMPLICADOS EN EL RECONOCIMIENTO PLANTA-F. SP. DE <i>F. OXYSPORUM</i>	37
1.3.2.- ENZIMAS DEGRADATIVOS DE LA PARED CELULAR	37
1.3.2.1.- Poligalacturonasas	37
1.3.2.2.- Pectato liasas	38
1.3.2.3.- Xilanasas	38
1.3.2.4.- Proteasas	39
1.3.3.- RESPUESTA DEFENSIVA DE LAS PLANTAS A LAS F. SP. DE <i>F. OXYSPORUM</i>	39
1.3.3.1.- Formación de gomas y tilides	39
1.3.3.2.- Compuestos antifúngicos	39

1.3.3.3.- Fitoalexinas	40
1.3.3.4.- Quitinasas	40
1.3.3.5.- β -1,3-glucanasas	41
1.3.3.6.- Especies reactivas de oxígeno	41
1.3.3.7.- Proteínas de la familia de plegamiento alfa/beta hidroxilasa ("Hydroxylase alpha/beta fold family proteir")	42
1.3.4.- RESPUESTA DE F. SP. DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> ANTE MECANISMOS DEFENSIVOS DE LA PLANTA	42
1.3.4.1.- Enzimas degradadores de compuestos defensivos de la planta	42
1.3.4.2.- Quitina sintasa	42
1.3.4.3.- Toxinas	43
1.4.- MECANISMOS EN LA INTERACCIÓN PLANTA- <i>MELOIDOGYNE</i> SPP.	43
1.4.1.- SITIOS DE ALIMENTACIÓN	43
1.4.1.1.- Anatomía de las células gigantes	43
1.4.1.2.- Ontogenia de las células gigantes y nódulo	44
1.4.2.- SECRECIONES DEL NEMATODO	48
1.4.2.1.- Papel en el parasitismo	48
1.4.2.2.- Genes y proteínas de parasitismo	50
1.4.2.2.- Otros órganos de secreción	52
1.4.2.3.- Señales no-proteicas	54
1.4.3.- EFECTO SISTÉMICO DE LA INTERACCIÓN PLANTA-NEMATODO EN LAS INTERACCIONES VASCULARES	55
OBJETIVOS	57
CAPÍTULO II: ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS INTERACCIONES DE <i>MELOIDOGYNE</i> <i>ARTIELLIA</i> Y <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F.SP. <i>CICERIS</i> RAZA 5 CON GARBANZO	61
2.1.- INTRODUCCIÓN	61
2.2.- LAS TÉCNICAS PROTEÓMICAS EN PLANTAS	62
2.3.- MATERIALES Y MÉTODOS	68
2.3.1.- INÓCULO DE <i>MELOIDOGYNE ARTIELLIA</i>	68
2.3.2.- INÓCULO DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP. <i>CICERIS</i>	69
2.3.3.- MATERIAL VEGETAL	70
2.3.4.- DETERMINACIÓN DE LAS FASES PARASÍTICAS DE <i>M. ARTIELLIA</i> Y EVALUACIÓN DE LA PENETRACIÓN	71
2.3.4.1.- Fases del ciclo parasítico de <i>M. artiellia</i>	71
2.3.4.2.- Penetración de juveniles de segunda edad de <i>M. artiellia</i> en las dos líneas de garbanzo en periodos iniciales	72
2.3.5.- FASES INICIALES DE LA INTERACCIÓN (4 y 8 DAI)	73
2.3.6.- FASES AVANZADAS DE LA INTERACCIÓN (35-40 DAI)	74
2.3.7.- ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN EN EL FLUIDO APOPLÁSTICO	76
2.3.7.1.- Fluido apoplástico en raíces intactas	76
2.3.7.2.- Fluido apoplástico en raíces divididas mediante la técnica de "split-root"	77
2.3.8.-EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS	78

2.3.8.1.- Experimentos en periodos iniciales de la interacción (4-8 DAI) y en fases avanzadas (35-40 DAI)	78
2.3.8.2.- Fluido apoplástico	81
2.3.9.- DIGESTION DE PROTEÍNAS EN GEL E IDENTIFICACIÓN POR HUELLA PEPTÍDICA	83
2.4.- RESULTADOS	84
2.4.1.- FASES EN EL CICLO PARASÍTICO DE <i>MELOIDOGYNE ARTIELLIA</i>	84
2.4.2.- TEST DE PENETRACIÓN DE 'CA336.14.3.0' E 'ICC14216K' EN PERIODOS INICIALES DE LA INTERACCIÓN	86
2.4.3.- RESPUESTA PROTEÓMICA EN FASES INICIALES DE LA INTERACCIÓN (4 Y 8 DAI)	86
2.4.4.- RESPUESTA PROTEÓMICA EN LOS NÓDULOS PRODUCIDOS POR <i>M. ARTIELLIA</i> EN RAÍCES GARBANZO EN FASES AVANZADAS DE LA INTERACCIÓN (35-40 DAI)	98
2.4.4.1.- Agrupamiento jerárquico (" <i>hierarchical clustering</i> ")	101
2.4.4.2.- Análisis de componentes principales	102
2.4.4.3.- Análisis de los patrones de expresión de las manchas electroforéticas basados en comparaciones dos a dos (" <i>Pairwise comparisons</i> ")	113
2.4.4.4.- Identificación de proteínas	117
2.4.5.- RESPUESTA EN EL FLUIDO APOPLÁSTICO	135
2.4.5.1.- Respuesta a los 14 y 18 DAI	135
2.4.5.2.- Respuesta a los 40 DAI mediante " <i>split-root</i> "	137
2.5.- DISCUSIÓN	141
2.5.1.- DETERMINACIÓN DE LAS FASES PARASÍTICAS DE <i>M. ARTIELLIA</i> Y TEST DE PENETRACIÓN	141
2.5.1.1.- Ciclo parasítico de <i>M. artiellia</i> en garbanzo	141
2.5.1.2.- Penetración de J2s de <i>Meloidogyne artiellia</i> en 'CA336.14.3.0' e 'ICC14216K' en periodos iniciales de la interacción	142
2.5.2. FASES INICIALES DE LA INTERACCIÓN (4-8 DAI)	142
2.5.3.- FASES MÁS AVANZADAS DE LA INTERACCIÓN (35-40 DAI)	145
2.5.4.- FLUIDO APOPLÁSTICO	153
2.6.- CONCLUSIONES	157
CAPITULO III: ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA EN INTERACCIONES DE <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> F. SP. <i>CICERIS</i> RAZA 5 Y <i>MELOIDOGYNE ARTIELLIA</i> CON GARBANZO	159
3.1.- INTRODUCCIÓN	159
3.1.1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	159
3.1.2. LA PCR A TIEMPO REAL	160
3.1.3. LA MICRODISECCIÓN POR LÁSER	164
3.1.4. GENES ESTUDIADOS: RUTA FENILPROPANOIDE Y OTRAS POSIBLES DEFENSAS	165
3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS	173

3.2.1.- INÓCULO UTILIZADO	173
3.2.1.1.- <i>Meloidogyne artiellia</i>	173
3.2.1.2.- <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	174
3.2.2.- MATERIAL VEGETAL	176
3.2.3.- CONDICIONES EXPERIMENTALES	176
3.2.3.1.- Estudio de las fases iniciales de la interacción (2-4 DAI)	177
3.2.3.2.- Estudio de la interacción en fases avanzadas (35-40 DAI) y microdissección por láser	178
3.2.4. TOMA DE MUESTRAS	179
3.2.4.1. Estudio de las fases iniciales de la interacción (2-4 DAI)	179
3.2.4.2. Estudio de la interacción en fases avanzadas (35-40 DAI)	179
3.2.4.3. Microdissección por láser	179
3.2.5. EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ARN Y PRODUCCIÓN DE ADNc	182
3.2.5.1.- Fases iniciales de la interacción (2-4 DAI)	182
3.2.5.2.- Estudio de la interacción en fases avanzadas (35-40 DAI)	182
3.2.5.3.- Microdissección por láser (35-40 DAI)	183
3.2.5.4.- Cuantificación y calidad del ARN total	183
3.2.5.5.- Amplificación del ARN	184
3.2.5.6.- Síntesis de ADNc	185
3.2.6. GENES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA	185
3.2.7. DISEÑO DE CEBADORES Y PROTOCOLO DE LA PCR A TIEMPO REAL	186
3.2.8. ANÁLISIS DE DATOS	188
3.3. RESULTADOS	190
3.3.1. EXTRACCIÓN DEL ARN Y TRATAMIENTO CON ADNasa	190
3.3.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE PCR A TIEMPO REAL	191
3.3.3. VERIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR	192
3.3.4. NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA RUTA FENILPROPANOIDE	194
3.3.4.1.- Fases iniciales de la interacción (2-4 DAI)	195
3.3.4.2.- Estudio de la interacción en fases avanzadas (35-40 DAI)	197
3.3.4.3.- Microdissección por láser	206
3.3.5.- NIVELES DE EXPRESIÓN DE OTROS GENES CON POSIBLE RELACIÓN CON LA PATOGENESIS	207
3.4.- DISCUSIÓN	211
3.5.- CONCLUSIONES	219
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	221
BIBLIOGRAFÍA	227

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.1.- Familias de proteínas relacionadas con la patogénesis	33
TABLA 1.2.- Clases de proteínas antifúngicas	33
TABLA 1.3.- Algunos de los genes más importantes implicados en la interacción planta-patógeno en el género <i>Meloidogyne</i>	54
TABLA 2.1.- Proteínas radicales diferencialmente expresadas durante las interacciones planta-microorganismo e identificadas mediante estudios proteómicos (Metha <i>et al.</i> , 2008b)	65
TABLA 2.2.- Proteínas modificadas en raíces de garbanzo (líneas CA 336.14.3.0 e ICC14216K) inoculadas con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> raza 5 a los 4 DAI	94
TABLA 2.3.-Proteínas constitutivas diferenciales en raíces de garbanzo (líneas CA 336.14.3.0 e ICC14216K) al comparar los controles sin inocular de ambas líneas a los 4 DAI	95
TABLA 2.4.- Proteínas modificadas en raíces de garbanzo (líneas CA 336.14.3.0) inoculadas con <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ciceris</i> raza 5 a los 8 DAI	96
TABLA 2.5.- Proteínas constitutivas diferenciales en raíces de garbanzo (líneas CA 336.14.3.0 e ICC14216K) al comparar los controles sin inocular de ambas líneas a los 8 DAI	97
TABLA 2.6.- Porcentaje acumulado de la variabilidad de los datos explicada mediante el estudio de los componentes principales	105
TABLA 2.7.- Manchas electroforéticas diferencias cuantitativas entre los diferentes tratamientos en la línea CA336.14.3.0 a los 35-40 DAI	117
TABLA 2.8.- Manchas electroforéticas diferencias cuantitativas entre los diferentes tratamientos en la línea ICC14216K a los 35-40 DAI	122
TABLA 2.9.- Manchas electroforéticas con diferencias cualitativas entre tratamientos en la línea CA336.14.3.0 a los 35-40 DAI	125
TABLA 2.10.- Manchas electroforéticas con diferencias cualitativas entre los tratamientos en la línea ICC14216K a los 35-40 DAI	127
TABLA 2.11.- Manchas electroforéticas con diferencias constitutivas entre las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K a los 35-40 DAI	128

TABLA 2.12.- Proteínas del fluido extracelular de la raíz de garbanzo ('JG62', 'CA336.14.3.0' e 'ICC14216K') afectadas por la inoculación con <i>Foc-5</i> (30.000 clamidosporas / g suelo) a los 14 y 18 DAI	137
TABLA 2.13.- Proteínas mayoritarias en el fluido extracelular en garbanzo a los 35-40 DAI (Fig. 2.29)	140
TABLA 3.1.- Parejas de cebadores utilizados en la PCR a tiempo real	187
TABLA 3.2.- Eficiencia de la PCR para las distintas parejas de cebadores	192
TABLA 3.3.- Perfiles de expresión en raíz de genes relacionados con la ruta fenilpropanoide a 2 y 4 DAI	196
TABLA 3.4.- Perfiles de expresión en nódulos-raíces de garbanzo de genes relacionados con la ruta fenilpropanoide a los 35-40 DAI (Days After Inoculation)	198
TABLA 3.5.- Perfiles de expresión de genes relacionados con la ruta fenilpropanoide en secciones de nódulos, cortados mediante la técnica de microdissección de células por láser, a los 35-40 DAI	207
TABLA 3.6.- Perfiles de expresión de los genes quitinasa clase I y catalasa en muestras de raíces/nódulos obtenidas: A) a los 2 y 4 DAI; B) 35-40 DAI; C) 35-40 DAI-Microdissección por láser	

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1.- Parcela de garbanzo severamente afectada por Fusariosis Vascular causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	2
Fig. 1.2.- Síndromes de Amarillez y Marchitez causados por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>ciceris</i>	3
Fig. 1.3.- Nódulos sobre raíces de la línea de garbanzo "UC27" infectado por nematodos noduladores	47
Fig. 1.4.- Diferentes sitios de alimentación sobre raíces de la línea de garbanzo "UC27"	48
Fig. 1.5.- Representación esquemática de la parte anterior de un nematodo sedentario en el estadio J2	50
Fig. 1.6.- Modelo de competición por corismato mediante compartimentalización al inyectar el nematodo el enzima corismato mutasa en el citoplasma	52
Fig 2.1.- Esquema de un estudio proteómico diferencial en gel	64
Fig. 2.2.- Esquema del estudio proteómico en fases avanzadas de la interacción en el patosistema garbanzo- <i>Foc-5-M. artiellia</i>	74
Fig. 2.3.- Sitio de alimentación y nódulo producido por <i>M. artiellia</i> en raíces de garbanzo	76
Fig. 2.4.- Esquema de inoculaciones en cada planta con la técnica de "split-root"	78
Fig. 2.5.- Planta de la línea CA336.14.3.0 en el experimento de "split-root" a los 40 DAI	78
Fig. 2.6.- Diferentes estadios en el ciclo parasítico de <i>M. artiellia</i> en garbanzo (línea CA336.14.3.0)	85
Fig. 2.7.- Número de juveniles de segunda edad de <i>M. artiellia</i> penetrados en la raíz de plántulas de garbanzo (líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K) a las 48 horas posteriores a la inoculación	86
Fig. 2.8.- Gel bidimensional de raíces de la línea de garbanzo ICC14216K a los 8 DAI	88
Fig. 2.9.- Geles virtuales maestros del proteoma radical de las líneas de garbanzo CA336.14.3.0 e ICC14216K a los 4 DAI mostrando las manchas electroforéticas diferenciales entre la plantas inoculadas y sin inocular con <i>Foc-5</i>	91
Fig. 2.10.- Gel virtual maestro del proteoma radical de la línea de garbanzo CA336.14.3.0 a los 8 DAI mostrando las manchas electroforéticas diferenciales entre la plantas inoculadas y sin inocular con <i>Foc-5</i>	92

Fig. 2.11.- Geles virtuales maestros del proteoma radical de las líneas de garbanzo CA336.14.3.0 e ICC14216K a los 4 y 8 DAI mostrando las manchas electroforéticas diferenciales entre ambas líneas en plantas sin inocular	93
Fig. 2.12.- Gel bidimensional de nódulos de raíces secundarias de la línea de garbanzo ICC14216K causados por <i>M. artiellia</i> a los 35-40 DAI	99
Fig. 2.13.- Dendograma mostrando el agrupamiento jerárquico de los tratamientos en plantas en raíces de garbanzo sin inocular ó inoculadas individual ó conjuntamente con <i>M. artiellia</i> ó <i>Foc-5</i> a los 35-40 DAI	102
Fig. 2.14.- Mapas bidimensionales mostrando las asociaciones entre tratamientos y manchas electroforéticas generados mediante el análisis de componentes principales (PCA)	105
Fig. 2.15.- Agrupaciones de proteínas reguladas de forma común en ambas líneas afectadas por los tratamientos basadas en su expresión, determinadas mediante el análisis de componentes principales (PCA)	107
Fig. 2.16.- Media de los <i>log</i> de la intensidad de las manchas electroforéticas asociadas a cada componente principal en las proteínas cuya expresión es modificada en ambas líneas	108
Fig. 2.17.- Agrupaciones de proteínas reguladas en 'CA336.14.3.0' por los tratamientos, determinadas mediante el análisis de componentes principales (PCA)	109
Fig. 2.18.- Media de los <i>log</i> de la intensidad de las manchas electroforéticas asociadas a cada componente principal en la línea CA336.14.3.0	110
Fig. 2.19.- Agrupaciones de proteínas reguladas en 'ICC14216K' por los tratamientos, determinadas mediante el análisis de componentes principales (PCA)	111
Fig. 2.20.- Media de los <i>log</i> de la intensidad de las manchas electroforéticas asociadas a cada componente principal en la línea ICC14216K	112
Fig. 2.21.- Patrones de expresión de las líneas CA336.14.3.0 (A) e ICC14216K (B), basados en las comparaciones dos a dos de sus valores de expresión	114
Fig. 2.22.- Geles virtuales maestros de las posiciones de las manchas electroforéticas diferenciales entre plantas inoculadas y sin inocular (A y B) y entre plantas sin inocular de ambas líneas (C)	116
Fig. 2.23.- Asociación de categorías funcionales con las agrupaciones de expresión en los componentes principales en las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K	130
Fig. 2.24.- Asociación de categorías funcionales con las agrupaciones de expresión en las comparaciones dos a dos en las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K	131

Fig. 2.25.- Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas del fluido apoplástico de plantas de garbanzo, líneas JG62 (A), CA336.14.3.0 (B) e ICC14216K (C), inoculadas con la raza 5 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> , a los 14 DAI	136
Fig. 2.26.- Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas del fluido apoplástico de plantas de garbanzo, líneas JG62 (A), CA336.14.3.0 e ICC14216K (B), inoculadas con la raza 5 de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> , a los 18 DAI	137
Fig. 2.27.- Síntomas de necrosis y menor crecimiento en la parte de las raíces inoculadas con <i>Foc-5</i> en plantas de garbanzo línea CA336.14.3.0 (A-B) y línea ICC14216K (C-D)	138
Fig. 2.28.- Pesos de las mitades radicales sometidas a los diferentes tratamientos en el experimento de “ <i>split-root</i> ”	139
Fig. 2.29.- Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas del fluido apoplástico de raíces intactas de la línea CA336.14.3.0 a los 40 DAI en el control	140
Fig. 2.30.- Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas del fluido apoplástico en la línea ICC14216K a los 40 DAI en el experimento de “ <i>split-root</i> ”	141
Fig. 3.1.- Ejemplo de curva de PCR obtenida en ICycler (BioRad), en la cual se observa la línea umbral, línea sobre la fluorescencia inespecífica de fondo en la reacción	161
Fig. 3.2.- Estrategias para la detección específica de amplicones en PCR a tiempo real	162
Fig. 3.3.- Microdissección por láser	165
Fig. 3.4.- Diferentes clases de isoflavonoides aislados de cultivos celulares y plantas de garbanzo	170
Fig. 3.5.- Posibles rutas de formación de compuestos isoflavonoides propuestos por Barz y Welle (1992)	171
Fig. 3.6.- Diagrama del flujo de trabajo en las muestras microdisseccionadas por láser	181
Fig. 3.7.- Microscopio preparado para la microdissección por láser	181
Fig. 3.8.- Fases de la preparación de las muestras para la microdissección por láser	182
Fig. 3.9.- Análisis electroforético del ARN total de raíces de garbanzo, extraído con el kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) y después del tratamiento con RNase-Free DNase Set (Qiagen)	191
Fig. 3.10.- Ejemplo de dos curvas de fusión tras la amplificación por PCR a tiempo real	193
Fig. 3.11.- Amplicones de los genes estudiados mediante PCR a tiempo real	193
Fig. 3.12.- Biosíntesis de las fitoalexinas tipo pterocarpano, medicarpina y maackiaina en garbanzo	194

Fig. 3.13.- Agrupación jerárquica de los tratamientos en fases avanzadas de la interacción <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris-garbanzo</i> - <i>M. artiellia</i> (35-40 DAI) en las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K, basada en la expresión de genes de la ruta fenilpropanoide	200
Fig. 3.14.- Mapas bidimensionales, mostrando las asociaciones entre tratamientos y manchas electroforéticas, generados mediante el análisis de componentes principales (PCA), en la línea CA336.14.3.0	200
Fig. 3.15.- Mapas bidimensionales, mostrando las asociaciones entre tratamientos y manchas electroforéticas, generados mediante el análisis de componentes principales (PCA), en la línea ICC14216K	201
Fig. 3.16.- Agrupaciones de genes en 'CA336.14.3.0', basadas en su expresión y determinadas mediante análisis de componentes principales (PCA)	202
Fig. 3.17.- Medias de los <i>log</i> de los niveles de expresión de los distintos genes, agrupados por su asociación a cada componente principal en la línea CA336.14.3.0	203
Fig. 3.18.- Agrupaciones de genes en "ICC14216K", basadas en su expresión y determinadas mediante análisis de componentes principales (PCA)	204
Fig. 3.19.- Medias de los <i>log</i> de los niveles de expresión de los distintos genes, agrupados por su asociación a cada componente principal en la línea ICC14216K	205
Fig. 3.20.- Patrones de regulación de genes de la ruta fenilpropanoide en las líneas de CA336.14.3.0 e ICC14216K, basados en las comparaciones dos a dos de sus valores de expresión	205

ABREVIATURAS

%T	Porcentaje en peso del monómero total (acrilamida + bisacrilamida) en gel
2'HFR	2'-hidroxiflavona reductasa
2-DE	Bidimensional
ABA	Ácido abcísico
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNasas	Desoxirribonucleasa
ADP	Adenosin bifosfato
ANOVA	Análisis Normal de la varianza
APD	Agar patata dextrosa
APX	Ascorbato peroxidasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNa	Ácido ribonucleico antisentido
ARNasas	Ribonucleasa
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ATP	Adenosin trifosfato
<i>Avr</i> AVR	Gen / proteína de avirulencia
C4H	Ácido cinámico 4-hidroxilasa
cADN	Ácido desoxirribonucleico copia
cAMP-PKA	Adenosina 3', 5' ciclomonofosfato-dependiente de proteínas kinasas
CAT	Catalasa
CC-NB-LRR	Proteína con dominio de "espiral enrollada" "unión a nucleótidos" y "región rica en leucinas".
cDNA-AFLP	Polimorfismos basados en la longitud de los fragmentos de amplificación de cADN
cADN-RAPD	ADN Polimórfico Amplificado al Azar de cADN.
CDPKs	Protein-quinasas dependientes de calcio
CHAPS	Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico
CHS	Chalcona sintasa
CIDA	Centro de Investigación y Desarrollo Agrario

Ct	Threshold cycle ó ciclo umbral
DAI	'Days After Inoculation' Días posteriores a la inoculación
DAO	Diamino oxidasa
dATP/dCTP/dTTP/dGTP	Desoxiadenosina trifosfato/ /
dCTP	Desoxicitosina trifosfosfato
DEPC	Dietil pirocarbonato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimina trifosfato
EDTA-Na ₂	Sal sódica del ácido etilendiamino tetraacético
EF-Tu	Factor de elongación de la tubulina
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EST	Marcador de secuencia expresada
ETI	Efactor inductor de la inmunidad
ETS	Efactor inductor de la susceptibilidad
EVA	Etil-vinilo-acetato
F3H	Flavanona 3-hidroxilasa
FDR	Ratio de Descubrimiento de Falsos 'False Discovery Rate'
<i>Foc-5</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i> raza 5
FRET	Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia
FVG	Fusariosis Vascular del garbanzo
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GPX	Guayacol-peroxidasa
GR	Glutación reductasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HR	Reacción Hipersensible
HRGPs	Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina
I ² H	Isoflavona 2'-hidroxilasa
ICARDA	Internacional Center for Agricultural Research in the Dry Areas
ICRISAT	International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics
IEF	Isoelectroenfoque
IFS	Isoflavona sintasa
IOMT	Isoflavona O-metiltransferasa
ISR	Resistencia Sistémica Inducida

ITS	Espaciador transcrito interno
J2	Juveniles de segundo estadio de nematodos noduladores del género <i>Meloidogyne</i> .
JA	Ácido jasmónico
LAM	Microdissección Asistida por Láser
LAR	Resistencia Local Adquirida"
LCM	Microdissección de Captura asistida por Láser
Log	Logaritmo
LRR	Dominio rico en Repeticiones de Leucina
LSD	Test de mínima diferencia significativa
<i>Ma</i>	<i>Meloidogyne artiellia</i>
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Microbios
MAPKs	Protein-quinasas activadas por mitógeno
MIMPs	Patrones moleculares inducidos por microbios
MPR	Complejo de enfermedades de Marchitez y Podredumbre de la Raíz
NADH	Forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nanoLC ESI MS/MS	Nanocromatografía líquida asociada a electrospray y doble espectrometría de masas
NB-LRR	Proteínas de unión a nucleótidos con el dominio LRR
NO	Óxido nítrico
NUV	Radiación cercana al ultravioleta
ORF	Secuencias codificantes
PAL	Fenilalanina amoniaco liasa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógeno
PC	Componente principal
PCA	Análisis de componentes principales
PCD	Muerte Celular Programada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEN	Polietileno naftalato
PEST	Tipo de dominio citosólico para la degradación de proteínas
PGIPs	Proteínas inhibidoras de poligalacturonasas
PGs	Poligalacturonasas

PLs	Pectato liasas
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PR/PRP	Proteínas relacionadas con la patogénesis
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones asociados a microbios
PTI	Inmunidad inducida por <i>PAMPs</i>
PTMs	Modificaciones post-traduccionales
PVP	Polivinilpirrolidona
QRT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real
R/R	Gen / proteína de resistencia
RLKs	Receptores similares a Kinasas “ <i>Receptor-like kinases</i> ”
RLPs	Proteínas similares a receptores “ <i>Receptor-like proteins</i> ”
RME	Endocitosis mediada por receptor
RT-PCR	“Reverse transcription-PCR”
SA	Ácido salicílico
SAM	S-adenosilmetionina
SAR	Resistencia sistémica adquirida
SCAR-PCR	Región amplificada de ADN caracterizado mediante PCR
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido.
SOD	Superóxido dismutasa
<i>Taq</i>	ADN polimerasa de <i>Termus aquaticus</i>
TBE	Tris/ácido bórico/EDTA-Na ₂
TF	Factor de transcripción
TFA	Ácido trifluoroacético
TIR-NB-LRR	Proteína NB-LRR con Receptores Toll de <i>Drosophila</i> y de Interleukina-1 de humanos
TOF	Tiempo de vuelo (espectrometría de masas)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Ufc	Unidades formadoras de colonias
UV	Radiación ultravioleta
VOPA	Agar jugo V8-oxgall-PNCB
WRKY	Factores de transcripción del tipo caja W

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1.- LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL GARBANZO

1.1.1.- CICER ARIETINUM

El garbanzo (*Cicer arietinum* L.) es la tercera leguminosa de consumo humano en orden de importancia, después de la judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y el guisante (*Pisum sativum* L.) (FAO, 2007). El garbanzo se cultiva en más de 33 países del Sur y Oeste de Asia, Norte y Este de África, Sur de Europa, América y Australia (Sing y Saxena, 1996). España es el principal productor de garbanzo de la Unión Europea, con una superficie cultivada de 31.200 ha y 9.600 t de cosecha media (FAO, 2007). En *C. arietinum*, existen dos tipos de germoplasma, denominados respectivamente tipo “desi” (semilla pequeña, angulosa y de color oscuro) y tipo “kabuli” (semilla grande, redondeada y de color crema). Los garbanzos desi se cultivan principalmente entre los 20°N y 30°N y consumen preferencialmente en el subcontinente Indio, mientras que los kabuli se cultivan en latitudes por encima de los 30°N y se consumen sobretodo en la Cuenca Mediterránea y América (Singh y Saxena, 1996; Singh y Virmani, 1996).

En el cultivo del garbanzo se han descrito más de 50 enfermedades de diversa etiología en diferentes partes del mundo, siendo la Fusariosis Vascular, causada por *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & K. Sato, y la Rabia, causada por *Didymella rabiei* (Kovachski) v. Arx (anomorfo de *Aschochyta rabiei* (Pass) Labrousse), las más limitantes del rendimiento a nivel mundial (Allen, 1983; Nene *et al.*, 1984; Nene y Reddy, 1987). Ambas enfermedades son también consideradas como las más importantes en España (Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985b; Navas Cortés *et al.*, 1998a, 2000).

1.1.2.- LA FUSARIOSIS VASCULAR DEL GARBANZO

1.1.2.1.- Distribución geográfica de la enfermedad

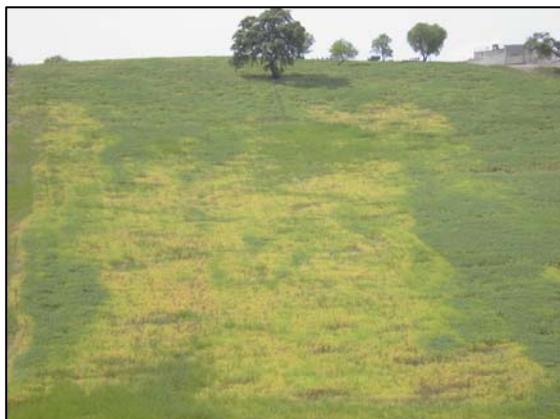
La Fusariosis Vascular es la más importante entre las comprendidas en el complejo de enfermedades denominado Marchitez y Podredumbre de la Raíz (MPR) del garbanzo, que origina

pérdidas severas de cosecha en cultivos en Andalucía (Trapero Casas, 1983) así como en la mayoría de los países cultivadores de esta leguminosa en el Mundo (Hawtin y Chancellor, 1978; ICRISAT, 1975; 1979; 1980, Allen, 1983).

La Fusariosis Vascular del garbanzo (FVG) ha sido diagnosticada en numerosos países, incluyendo Bangladesh, Birmania, Etiopía, India, Méjico, Pakistán, y Siria (Nene *et al.*, 1984), Túnez (Bousslama, 1980; Halila y Strange, 1996), Chile, Irán, y Sudán (Haware *et al.*, 1986a), Perú (Echandi, 1970), ex-Unión Soviética (Stepanova, 1971), Malawi (Kannaiyan, 1981), EE.UU. (California) (Buddenhagen *et al.*, 1988; Philips, 1988), Italia (Frisullo *et al.*, 1989), Israel (Y. Katan, *comunicación personal*), Libano y Turquía (C. Akem, *comunicación personal*).

Las pérdidas de rendimiento en las cosechas de garbanzo ocasionadas por la FVG se estimaron en 10 % en India (Singh y Dahiya, 1973), 10-15 % en España (Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985a) y hasta 40 % en Túnez (Bousslama, 1980). En algunos casos, los ataques de la enfermedad pueden llegar a ocasionar la pérdida completa de la cosecha (Halila y Strange, 1996; Haware y Nene, 1980) (Fig. 1.1).

Figura 1.1.- Parcela de garbanzo severamente afectada por Fusariosis Vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*.



1.1.2.2.- Sintomatología

La sintomatología de la FVG se caracteriza por dos síndromes, denominados Marchitez Vascular y Amarillez Vascular, distinguibles tanto por los síntomas que los componen como por la cronología del desarrollo de los mismos (Trapero Casas, 1983; Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985a). Ambos síndromes son consecuencia de la infección vascular de la planta, en cuyo xilema y médula de la raíz, cuello y tallo se produce una coloración castaño oscuro de uso diagnóstico.

El síndrome de Amarillez Vascular se caracteriza por la manifestación lenta de clorosis, amarillez y necrosis de los folíolos de la hojas inferiores que se continúa posteriormente en las superiores, en un desarrollo acrópeto, y culmina con la caída de los folíolos necrosados (Fig. 1.2). Generalmente, en inoculaciones artificiales las plantas no mueren antes de los 40 días después de

la siembra en suelo infestado por el patógeno (Trapero Casas, 1983; Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985a).

El síndrome de Marchitez Vascular se caracteriza por el desarrollo rápido de flacidez de hojas en cualquier nivel de la planta, cuyos folíolos adquieren una coloración verde-grisácea, que se extiende posteriormente a la planta completa (Fig. 1.2). La flacidez foliar es seguida por la desecación y necrosis de los folíolos, peciolo y tallos, que adquieren un color castaño claro, y finalmente por la muerte de la planta. Los folíolos necrosados suelen quedar adheridos al raquis (Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1986). El síndrome de Marchitez Vascular se desarrolla con más rapidez que el de Amarillez. En inoculaciones artificiales, mediante siembra en suelo infestado por el patógeno, la muerte de plantas susceptibles ocurre generalmente antes de transcurridos 20 días (Trapero Casas, 1983).



Figura 1.2.- Síndromes de Amarillez y Marchitez causados por *Fusarium oxysporum* f. sp *ciceris*.

El síndrome de la FVG más común y tradicionalmente reconocido en diversos países es la Marchitez Vascular (Narasimhan, 1929; Raheja y Das, 1957; Van der Maesen, 1972; Nene, 1980), mientras que la Amarillez Vascular es el síndrome predominante en Andalucía, Castilla y León, Extremadura y Túnez (Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1986; Alcalá Jiménez, 1995; Halila y Strange, 1996).

Algunas líneas de garbanzo parcialmente resistentes a la FVG muestran una respuesta a la infección denominada Marchitez Tardía, que se caracteriza por un largo periodo de tiempo desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad (periodo de infección), tras el que se produce un desarrollo normal de ésta (Upadhyaya *et al.*, 1983).

1.1.2.3.- Variabilidad patogénica de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

Los aislados del patógeno pueden ser clasificados en patotipos, según el síndrome de enfermedad al que dan lugar (Amarillez o Marchitez), y también como razas patogénicas (denominadas razas 0, 1A, 1B/C, 2, 3, 4, 5 y 6), de acuerdo con la interacción diferencial en la reacción de enfermedad que originan en un conjunto de líneas o cultivares de garbanzo diferenciadores (Haware y Nene, 1982a; Jiménez Díaz *et al.*, 1989b; Alcalá Jiménez, 1995). Además de patogénicamente, los patotipos de Amarillez y Marchitez pueden ser identificados mediante marcadores moleculares RAPD-PCR (Kelly *et al.*, 1994), así como mediante PCR específica usando cebadores SCAR derivados de ellos (Kelly *et al.*, 1998). Los aislados de las razas 0 y 1B/C originan el síndrome de Amarillez Vascular y los de las razas 1A, 2, 3, 4, 5 y 6 el de Marchitez Vascular (Alcalá Jiménez, 1995; Jiménez-Gasco *et al.*, 2001; Kelly *et al.*, 1994). Las razas 0, 1A, 5 y 6 pueden ser identificadas mediante PCR específica con cebadores SCAR (Jiménez Gasco y Jiménez Díaz, 2003). Las ocho razas patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* tienen distinta distribución geográfica. Las razas 2, 3 y 4 sólo han sido descritas en la India hasta ahora (Haware y Nene, 1982b), mientras que las razas 0, 1B/C, 5 y 6 han sido diagnosticadas principalmente en la Cuenca Mediterránea y (California) (Estados Unidos) (Halila *et al.*, 1996; Jiménez Díaz *et al.*, 1993b; Jiménez Gasco, 2001). La raza 1A, a su vez, es la más extendida y la mejor estudiada, habiéndose encontrado en la Cuenca Mediterránea, India y California (Jiménez Gasco, 2001). En España están presentes las razas 0, 1A, 1B/C, 5 y 6 (Jiménez Díaz, 1994; Jiménez Díaz, no publicado), siendo las razas 0 y 5 de los patotipos de Amarillez y Marchitez Vascular, respectivamente, las más comunes tanto en Andalucía como en el resto del país. La raza 5 es la más virulenta de las identificadas en España (Jiménez Díaz *et al.*, 1989b), mientras que la 0 es la menos virulenta de todas las razas descritas.

1.1.2.4.- Proceso de infección

F. oxysporum f. sp. *ciceris* es un hongo habitante de raíces (i.e., invasor de suelo) necrotrofo obligado y patogénicamente especializado sobre especies del género *Cicer*, a las que infecta vascularmente, y es transmisible en semillas infectadas de *C. arietinum*, su único huésped cultivado (Haware *et al.*, 1978; 1986a; Nene y Haware, 1980). A pesar de su especialización patogénica, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* puede invadir asintóticamente raíces de otras plantas, tanto leguminosas como no leguminosas, tales como: guisante (*Pisum sativum* L.), lenteja (*Lens esculenta* Moench), *Cajanus cajan* (L.) Millsp. (Haware y Nene, 1982a), altramuz blanco (*Lupinus albus* L.), haba (*Vicia*

faba L.), judía (*Phaseolus vulgaris* L.), melón (*Cucumis melo* L.), patata (*Solanum tuberosum* L.), remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), cenizo (*Chenopodium album* L.) y veza (*Vicia sativa* L.) (Cabrera de la Colina *et al.*, 1987; Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985b). Estas plantas no-huésped proporcionan al patógeno un medio de sobrevivir parasíticamente durante periodos de tiempo en los que el suelo permanece libre de huésped cultivado. Además, *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* posee la capacidad de sobrevivir inactivo en el suelo en ausencia de plantas huésped, mediante clamidosporas (Allen, 1983; Haware *et al.*, 1986b).

F. oxysporum f. sp. *ciceris* invade las plántulas de garbanzo poco después de la siembra, durante la germinación y emergencia, sin necesidad de heridas en los tejidos subterráneos. La invasión tiene lugar principalmente a través de los cotiledones y por las zonas del hipocotilo y epicotilo subterráneo próximas a aquéllos, y en menor proporción por zonas de la raíz principal, a excepción del ápice radical (Jiménez Díaz *et al.*, 1989a). Los cotiledones son extensamente invadidos por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, aumentando la masa micelial en esta zona y produciéndose las hifas especializadas para la penetración, siendo este tipo de infección coincidente con el observado en guisante (Chi *et al.*, 1964; Nyvall y Haglund, 1972; Virgin y Walker, 1940). Tras la penetración de la planta, el hongo crece a través del córtex hasta alcanzar el xilema. La colonización vascular se inicia en la raíz y base del tallo, con crecimiento de hifas delgadas que, posteriormente, se desarrollan en hifas gruesas, irregulares y ramificadas que ocluyen el lumen de los vasos infectados. Junto con el crecimiento de las hifas, el transporte de microconidias por los vasos del xilema facilita la colonización sistémica del eje de la planta (Jiménez Díaz, 1994; Jiménez Díaz *et al.*, 1989a). La velocidad y extensión de la colonización de la planta por el patógeno dependen de la susceptibilidad del cultivar y la virulencia y densidad de inóculo del patógeno (Navas Cortés *et al.*, 2000), así como de factores ambientales tales como la temperatura, el pH, el nivel de humedad, la fertilidad del suelo y la actividad microbiana de éste (Jiménez Díaz, 1994).

La colonización vascular de la planta ocurre de forma similar por los aislados de los patotipos de Amarillez y Marchitez, si bien los primeros invaden la planta más lentamente y en menor extensión que los segundos. Para ambos tipos de aislados, los síntomas severos característicos se desarrollan después de la colonización intensa y extensa de los haces xilemáticos de la raíz y base del tallo por el hongo, y la distribución de éste a lo largo del eje de la planta (Jiménez Díaz, 1994; Jiménez Díaz *et al.*, 1989a). Sin embargo, en las combinaciones raza/cultivar incompatibles no se observaron estructuras fúngicas entre las células de la raíz, pero sí se pudo aislar el hongo de la raíz, principalmente de la zona superior de ésta y de la base del tallo (Basallote Ureba, 1987). Stevenson *et al.* (1997) observaron que en combinaciones incompatibles la penetración de las hifas del patógeno ocurría en menor extensión que en las compatibles, pero en las interacciones

incompatibles no se desarrolló una respuesta de muerte celular hipersensible. Tampoco se ha observado la formación de gomas y tílides en las interacciones compatibles e incompatibles de cultivares de garbanzo con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5, fenómenos que suceden en otros patosistemas vasculares (Basallote Ureba, 1987).

Investigaciones en patosistemas similares, i.e., *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* – tomate, indican que para que se produzca una infección exitosa se deben regular estrictamente una serie de procesos (Di Pietro *et al.*, 2003): (1) reconocimiento de las raíces, (2) adherencia a la superficie de la raíz y diferenciación de las hifas de penetración, (3) penetración del córtex de la raíz y degradación de barreras físicas como la endodermis para alcanzar el cilindro vascular, (4) adaptación a un ambiente hostil en el interior de la raíz, (5) proliferación de hifas y producción de microconidias en los vasos xilemáticos, y (6) secreción de determinantes de virulencia como péptidos ó fitotoxinas. Mientras la planta esté viva, el hongo se mantiene restringido a los tejidos xilemáticos y en algunas células alrededor de estos vasos; una vez muerta, el hongo invade el tejido parenquimático y esporula profusamente en la superficie de la planta (Agrios, 2005).

1.1.2.5.- Control de la enfermedad

Las medidas de control de la FVG deben dirigirse a evitar el contacto entre el patógeno y la planta, así como a reducir la cantidad y/o eficiencia del inóculo del primero, disminuyendo el número de propágulos en el suelo y/o alterando las condiciones que son favorables para su actividad patogénica (Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985b). Por tanto es recomendable evitar la siembra de garbanzo en suelos donde se haya cultivado antes esta leguminosa, aún en el caso de haberse detectado niveles bajos de enfermedad en el cultivo precedente (Trapero Casas y Jiménez Díaz, 1985a).

La rotación de cultivos con plantas no susceptibles no tiene aplicación práctica, salvo que se hagan rotaciones de larga duración, porque las clamidosporas del hongo pueden persistir en el suelo durante al menos 6 años en ausencia de garbanzo (Haware *et al.*, 1986b).

El adelanto de la fecha de siembra es una medida de lucha efectiva, ya que contribuye a evitar las altas temperaturas y la baja humedad que favorecen el desarrollo rápido de la enfermedad (Allen, 1983; ICRISAT, 1980; Navas-Cortés *et al.*, 1998a, Padwick y Bhagwagar, 1943). Sin embargo, la susceptibilidad del cultivar y/o la virulencia de raza del patógeno predominante en el suelo (Navas Cortés *et al.*, 1998a; Navas Cortés *et al.*, 2000), la exposición del cultivo a la Rabia (Nene y Reddy, 1987), y las infecciones severas por otros hongos patógenos del suelo que

contribuyen etiológicamente en el complejo de Muerte de Plántulas (*Phytophthora megasperma* Drechs.; *Pythium* spp), pueden limitar la eficiencia de dicha medida de lucha (Rodríguez Tello, 1994).

Otros métodos utilizados para reducir el inóculo del patógeno son las labores profundas durante el periodo estival y la consiguiente eliminación de restos de garbanzos infectados en el campo (Haware *et al.*, 1990).

El control de la enfermedad mediante métodos químicos presenta varios inconvenientes, debido a la naturaleza de la enfermedad y la limitada rentabilidad económica del cultivo. Los tratamientos de semillas infectadas con fungicidas protectores, sistémicos ó con mezclas (i.e., benomilo+TMTD), incrementan significativamente la emergencia de plántulas y retrasan el desarrollo de la enfermedad durante las primeras fases de la epidemia en cultivares de garbanzo moderadamente susceptibles, pero carecen de efectividad en campos altamente infestados (Jiménez Díaz y Trapero Casas, 1985; Sugha *et al.*, 1995)

La solarización del suelo es un método eficiente de control de la enfermedad pues reduce la cantidad y viabilidad de los propágulos del patógeno en el suelo al tiempo que aumenta la mineralización del nitrógeno orgánico del suelo a nitrato, con lo que mejora el crecimiento de la planta y su rendimiento (Chauhan *et al.*, 1988a; Chauhan *et al.*, 1988b).

Varios estudios muestran la utilidad potencial de diversos antagonistas fúngicos y bacterianos para el control biológico de la enfermedad, tanto individualmente como en combinación. La propia solarización podría asimismo ejercer efectos en la flora microbiana, aumentando la capacidad supresora del suelo. Varios mecanismos, no excluyentes entre sí, pueden justificar respuestas de control biológico, tales como la antibiosis, la competencia trófica en suelo rizosférico y no-rizosférico, la competencia por los sitios de infección y el desarrollo de respuestas de resistencia inducida en el huésped (Biles y Martin, 1989; Matta, 1989; Alabouvette *et al.*, 2001). Entre los antagonistas fúngicos, hay diversos organismos estudiados como aislados de *F. oxysporum* y razas no patogénicas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Hervás *et al.*, 1995), también otras especies como *Trichoderma harzianum* Rifai (Kaur y Mukhopahyay, 1992; Hervás *et al.*, 1998). En el caso de antagonistas bacterianos, se han estudiado aislados de *Pseudomonas fluorescens* y de *Bacillus subtilis* (Vidhyasekaran y Muthamilan, 1995; Hervás *et al.*, 1997, 1998; Landa, 1999; Landa *et al.*, 2001). Los resultados muestran que solo se obtienen protecciones parciales y muy dependientes de características los agentes microbiológicos (ej., densidad de inóculo de antagonista y patógeno; eficiencia de colonización rizosférica por el antagonista, virulencia del patógeno, etc.), del genotipo del huésped, principalmente de si presenta resistencia parcial a razas virulentas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Landa, 1999; Landa *et al.*, 2001), y de las condiciones climáticas (Hervás *et al.*, 1998;

Landa, 1999; Landa *et al.*, 2001). Respecto al mecanismo de acción, la antibiosis parece descartada (Landa 1999; Landa *et al.*, 2001) siendo posible el aumento de la resistencia mediante la implicación de respuestas de resistencia inducida (Cachinero *et al.*, 2002).

La estrategia más práctica y económicamente eficiente para el control de la FVG es la utilización de cultivares resistentes (Nene y Reddy, 1987; Jalali y Chand, 1992). Sin embargo, la eficiencia de control puede resultar disminuida por la prevalencia de razas patogénicas sobre ellos en las poblaciones de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en los suelos de cultivo y la posible aparición futura de nuevas razas (Haware y Nene, 1982b; Jiménez Díaz *et al.*, 1989b; 1993a). Investigaciones realizadas por diferentes grupos han llevado al desarrollo en diferentes países de genotipos de garbanzo resistentes o tolerantes a la enfermedad (Kumar *et al.*, 1985; Haware, 1990; Jiménez Díaz *et al.*, 1991; Jiménez Díaz *et al.*, 1993a; Singh y Jiménez Díaz, 1996; Sharma *et al.*, 2005; Pande *et al.*, 2006); si bien, en la mayoría de los casos las fuentes de resistencia identificadas son raza-específicas, y operativas solo contra algunas de las razas del patógeno existentes en las diversas áreas de cultivo (Jiménez Díaz *et al.*, 1989b; Kaiser *et al.*, 1994, Sharma *et al.*, 2005). Además, en muchos casos, el germoplasma resistente a una enfermedad se ha mostrado altamente susceptible a otras enfermedades importantes del cultivo (Rodríguez López, 2007).

En consecuencia, para el control sostenible de la Fusariosis Vascular del garbanzo en ambientes mediterráneos han de combinarse diversas estrategias de lucha como la siembra otoñal con genotipos parcialmente resistentes y el tratamiento de las semillas con agentes de control biológico (Landa *et al.*, 2004).

1.1.3.- NEMATODOS NODULADORES DE RAÍCES

1.1.3.1.- Aspectos generales

Los nematodos noduladores de raíces (*Meloidogyne* spp.), dentro de los cuales se encuentra *Meloidogyne artiellia* Franklin, 1961, son los nematodos fitopatógenos más importantes tanto por su amplia distribución a nivel mundial como por el elevado número de plantas susceptibles a su parasitismo obligado, siendo el garbanzo huésped de algunas especies (ej., *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949; *M. artiellia*, *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, etc.) en diversos países (Sharma *et al.*, 1992; Castillo *et al.*, 2008). Este grupo de nematodos, que se sitúa entre los parásitos de plantas más exitosos con más de 90 especies descritas que infectan miles de plantas herbáceas y leñosas (Karssen y Moens, 2006), son difíciles de controlar porque, al

ocurrir su ciclo vital en el suelo e interior de las raíces de las plantas huéspedes, quedan protegidos por la matriz gelatinosa y el tejido radical, y no existen compuestos químicos selectivos contra ellos (Gheysen y Fenoll, 2002).

Los nematodos noduladores completan su ciclo vital en un periodo de tiempo de 1-2 meses, dependiendo de factores ambientales como la temperatura (Di Vito y Greco, 1988a; Ferris *et al.*, 1984). Los huevos depositados sobre la superficie de la raíz y contenidos en una matriz proteica gelatinosa secretada por las glándulas rectales de la hembra sobreviven en el suelo y son inóculo efectivo para iniciar la infección de la planta. En condiciones favorables, los juveniles sufren una primera muda dentro del huevo, pasando de juvenil de primera edad (J1) a juvenil de segunda edad (J2), y cuando las condiciones de humedad y temperatura son favorables los J2s eclosionan del huevo (Vanholme *et al.*, 2004). El estado infectivo es el de J2s. Tras la eclosión, los juveniles J2 migran activamente hacia el sistema radical a través del suelo atraídos por exudados radicales. Los J2s penetran la raíz por la parte cercana y posterior al ápice radical, migrando intercelularmente (a través de la lámina media y cilindro vascular, y sorteando la barrera formada por la endodermis) hacia la zona de diferenciación de la raíz, donde inducen los sitios permanentes de alimentación. Éstos se componen de 5 a 7 células del procambium alrededor de la región labial del nematodo, las cuales son estimuladas a producir diversos ciclos de mitosis sin citoquinesis, formándose de este modo células gigantes multinucleadas. Durante este periodo se produce una proliferación e hipertrofia de células del córtex y cercanas al periciclo, dando lugar a la formación de nódulos alrededor de los sitios de alimentación. Después de 2 semanas, los juveniles J2s experimentan rápidamente tres mudas pasando al estado adulto de hembra o macho (Karssen y Moens, 2006). A pesar de la formación de machos, la reproducción de muchos de los nematodos noduladores ocurre mediante partenogénesis.

En los nematodos noduladores, las glándulas subventrales son más activas durante las fases de pre-penetración y penetración de la raíz, con una reducción de la actividad secretora en concordancia con la inducción de las células gigantes (Endo, 1987), cuando simultáneamente se produce un aumento de la actividad de la glándula dorsal (Bird, 1983). Para completar su ciclo, los nematodos endoparásitos sedentarios (incluyendo, *Meloidogyne* spp., *Globodera* spp., *Heterodera* spp., etc.) dependen enteramente del éxito de la inducción y mantenimiento de los sitios especializados de alimentación. En los nematodos noduladores, los sitios de alimentación están compuestos por varias células gigantes caracterizadas por contener varios núcleos hipertróficos, pequeñas vacuolas, y una gran proliferación de retículo endoplasmático liso, ribosomas, mitocondrias y plastidios. Las células gigantes son análogas a las células vegetales de transferencia (Pate y Gunning, 1972); la pared celular adyacente al xilema aumenta de grosor formando

invaginaciones alineadas con la membrana plasmática (Jones, 1972), lo cual facilita el transporte de agua del xilema a la célula gigante (Gheysen y Fenoll, 2002). Estudios histopatológicos demostraron que el tamaño de los nódulos y el número de núcleos inducidos en las células gigantes dependen de la especie de nematodo, mientras que su número y tamaño parece estar relacionado con la planta huésped (Vovlas *et al.*, 2005).

De las especies descritas en el género *Meloidogyne*, sólo cuatro han sido asociadas al cultivo del garbanzo: *M. arenaria*, *M. incognita* (Kofoid y White, 1919) Chitwood, 1949, *M. javanica* y *M. artiellia* (Sikora *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2008). La sintomatología de la infección por estos nematodos se caracteriza por la formación de nódulos o agallas en el sistema radical, que son claramente visibles en las infecciones por *M. arenaria*, *M. incognita* o *M. javanica* (Vovlas *et al.*, 2005). Sin embargo, en las infecciones de raíces de garbanzo por *M. artiellia* los nódulos son de pequeño tamaño y difíciles de observar a simple vista (Vovlas *et al.*, 2005). En la parte aérea de la planta de garbanzo, los síntomas que originan las infecciones por nematodos noduladores, similarmente a lo que ocurre con la gran mayoría de nematodos fitoparásitos radicales, son bastante inespecíficos: amarillez, falta de crecimiento y un menor número de flores y vainas (Nath *et al.*, 1979; Srivastava *et al.*, 1974; Tiyagi y Alam, 1986).

1.1.3.2.- *Meloidogyne artiellia*

Meloidogyne artiellia es un nematodo endoparásito sedentario obligado que se reproduce en diversos cereales, crucíferas y leguminosas, por lo que comúnmente se le conoce como el nematodo nodulador o formador de agallas de cereales (excepto avena y maíz) y leguminosas (excepto caupí, lenteja, lupino y soja) (Di Vito *et al.*, 1985; Davis y Venette, 2004; Sikora *et al.*, 2005). Como es propio del género *Meloidogyne*, en *M. artiellia* existe un marcado dimorfismo sexual, lo que da lugar a que machos y hembras presenten caracteres morfológicos muy diferentes (machos vermiformes y hembras piriformes), diferencias que se establecen durante el desarrollo post-embrionario.

El ciclo biológico de *M. artiellia* comprende los estados de huevo, J2, J3, J4 y adultos (machos y hembras), siendo, como ya se ha indicado, los juveniles de segunda edad el único estado infectivo. Las temperaturas óptimas para el desarrollo de la especie están entre 15-25 °C, siendo desfavorables para su desarrollo e infección temperaturas superiores a 30 °C (Di Vito y Greco, 1988a). Una vez completados los diferentes estadios juveniles, las hembras inmaduras continúan alimentándose hasta llegar a la madurez, cuando adquieren aspecto piriforme y producen masas de 300-500 huevos, completándose de esta manera una generación del nematodo (Hernández

Fernández *et al.*, 2005). La producción potencial de huevos por la hembra de *M. artiellia* es influida significativamente por el genotipo del huésped y por el origen geográfico de la población del nematodo (Hernández Fernández *et al.*, 2005); mientras que el ciclo del nematodo es fuertemente influido por la temperatura del suelo.

1.1.3.3.- Distribución geográfica de *Meloidogyne artiellia*

M. artiellia se ha citado en parte de Europa, África, y Asia (Davis y Venette, 2004), asociándose en general con climas secos y moderadamente templados. *M. artiellia* origina severas pérdidas de cosecha de trigo en Grecia (Kyrou, 1969), de garbanzo en España (Varo Alcalá *et al.*, 1970; Tobar Jiménez, 1973; Castillo *et al.*, 1996), Italia (Greco, 1984) y Siria (Greco *et al.*, 1984; Mamluk *et al.*, 1983), y de veza en Siria (Mamluk *et al.*, 1983), aunque geográficamente se encuentra distribuido en otros países de la Cuenca Mediterránea como Argelia, Marruecos, Francia, Túnez, Turquía, etc. (Di Vito *et al.*, 1994a, 1994b).

En España se han citado infecciones por *M. artiellia* en cultivos de garbanzo en Carmona (Sevilla) (Castillo *et al.*, 1996) y en varias localidades de la comarca de Alhama (Granada) (Castillo, datos no publicados; Tobar Jiménez, 1973). Asimismo, en esta comarca de Alhama y en varias localidades de la campiña de Córdoba y Sevilla se han encontrado infestaciones de campos en barbecho, e infecciones en otros cultivos como cebada, trigo y varias leguminosas (Castillo, datos no publicados; Palomares Rius, datos no publicados; Talavera y Tobar Jiménez, 1997; Tobar Jiménez, 1973).

1.1.3.4.- Sintomatología

La parte aérea de la planta de garbanzo atacada no presenta síntomas específicos o diagnósticos, mostrando entre otros, clorosis y falta de crecimiento. Las vainas son pequeñas, sin semillas y en escaso número, habiéndose también demostrado un efecto adverso en el contenido de proteína de la semilla, relacionado quizás con una baja eficiencia de la fijación de nitrógeno o una disrupción del transporte de savia bruta en presencia del nematodo (Castillo *et al.*, 2008). Los nódulos radicales producidos por *M. artiellia* son muy pequeños y difíciles de apreciar, siendo las grandes masas de huevos que los recubren el único síntoma visible de la infección por el nematodo.

M. artiellia llega a causar la pérdida total de la cosecha de garbanzo en campos altamente infestados (Di Vito y Greco, 1988b), como puede ocurrir cuando el garbanzo es cultivado en rotación con trigo que también es susceptible a *M. artiellia*, favoreciendo un incremento del inóculo del

nematodo en el suelo. En la Cuenca Mediterránea, el cultivo de garbanzo más severamente afectado corresponde al de ciclo corto de siembra en primavera (Marzo-Junio), debido a que las condiciones óptimas de humedad y temperatura para el nematodo ocurren justo después de la germinación de la semilla, cuando las plantas son más susceptibles a la infección. Así, densidades de inóculo de 1 huevo+J2/cm³ de suelo pueden causar importantes pérdidas de cosecha (Di Vito y Greco, 1988b). En siembras de invierno (Diciembre-Junio), el cultivo resulta menos perjudicado, ya que las condiciones óptimas para el desarrollo de *M. artiellia* coinciden con estados de desarrollo de la planta posteriores a la emergencia, cuando éstas son más tolerantes al ataque del nematodo. En este caso, son necesarios 8 huevos+J2/cm³ de suelo para causar el mismo efecto que en la siembra de primavera (Di Vito y Greco, 1988b). El límite de tolerancia, a partir del cual se ha demostrado un perjuicio apreciable en el crecimiento y producción del garbanzo es de 0,14 huevos/cm³ de suelo en condiciones de campo.

1.1.3.5.- Ciclo vital y supervivencia

M. artiellia sobrevive los periodos secos y calurosos mediante huevos, que pueden persistir en el suelo durante 2-3 años protegidos en las masas gelatinosas en las que son depositados por la hembra, o posiblemente mediante el estado anhidrobiótico de los J2s. Debido a su amplia gama de huéspedes, *M. artiellia* no necesita mecanismos especiales de persistencia que permitan mantener las poblaciones viables durante largos periodos de tiempo. La anhidrobiosis se define como un estado transitorio de inactividad por parte del nematodo, donde éste aparece enroscado y con un metabolismo reducido al mínimo, del que sólo sale cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables. Este mecanismo es muy común en otros géneros de nematodos (Demeure *et al.*, 1979 a; b), aunque entre los noduladores sólo ha sido demostrado en *M. javanica* (Towson y Apt, 1983). Sin embargo, a pesar de los anteriores mecanismos de persistencia, se ha comprobado que la densidad de población de *M. artiellia* disminuye considerablemente después de la cosecha de su huésped y durante el periodo estival (Di Vito y Greco, 1988b). En ocasiones, la coincidencia de una combinación de factores como lluvias insuficientes y elevadas temperaturas en la primavera origina un desarrollo insuficiente del sistema radical que limita la emergencia e infección de los J2s. El nematodo parece estar adaptado a una gran variedad de tipos de suelo, incluyendo aquéllos que contienen 30-40% de arcilla (Di Vito y Greco, 1988b).

1.1.4.- INTERACCIONES DE NEMATODOS FITOPARÁSITOS CON HONGOS PATÓGENOS DEL SUELO

Los nematodos fitoparásitos pueden influir en la actuación de otros organismos fitopatógenos del suelo y el papel que juegan en la interacción con otros fitopatógenos es diferente en función de los distintos tipos de parasitismo que aquéllos desarrollan. Dichos nematodos inducen cambios fisiológicos, bioquímicos y estructurales en la planta, que pueden ser mínimos como en el caso de nematodos ectoparásitos, o extensos y complejos como en el caso de nematodos endoparásitos sedentarios (ej., *Meloidogyne* spp. y *Heterodera* spp.). Atkinson demostró estas interacciones en 1892, al comprobar que la infección por *Meloidogyne* spp. incrementaba la severidad de la Marchitez causada por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) W. C. Zinder & H. N. Hans en algodón (Atkinson, 1892). Más tarde, otros investigadores demostrarían que los nematodos fitoparásitos también interactúan con virus y bacterias (Bergenson, 1972; Dmowska, 1982; Khan, 1993; Lamberti y Roca, 1987; Powell, 1971), dando lugar a complejo de enfermedades o a variaciones en las respuestas de la planta a la infección.

En algunos casos, las interacciones entre nematodos fitoparásitos y hongos fitopatógenos pueden llegar a ocasionar la pérdida del cultivo, siendo por tanto importante el conocimiento de los mecanismos implicados para desarrollar estrategias de control efectivas. En la mayoría de los casos, el papel de los nematodos no es esencial para la infección y establecimiento de los hongos, aunque sí puede alterar la incidencia y severidad de las enfermedades causadas por éstos (Mai y Abawi, 1987). Aunque inicialmente se sugirió que el papel del nematodo era más de tipo mecánico, ocasionando lesiones en la planta que facilitarían físicamente la invasión de ésta por el hongo, distintos estudios indicaron que el mecanismo es más complejo, implicando en muchos casos interacciones de tipo biológico, más que de tipo físico (Roy *et al.*, 1989; Starr *et al.*, 1989). Así, por ejemplo, la penetración de juveniles de *M. incognita* produjo heridas en las raíces de algodón que, sin embargo, no favorecieron la invasión de éstas por *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Perry, 1963; Starr *et al.*, 1989). Los cambios estructurales y fisiológicos de la planta huésped causados por el nematodo pueden proporcionar al hongo un substrato más favorable o hacer ineficaces los mecanismos de defensa contra él (Taylor, 1990). Asimismo, la inducción de cambios en los exudados de las raíces del huésped por el nematodo puede determinar una modificación de la población de microorganismos de la rizosfera que repercute sobre la subsiguiente infección por el hongo, como se ha observado con un incremento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hans y un decrecimiento de especies de actinomicetos en la rizosfera de tomate infectado por *M.*

javanica, siendo ésta otra posible forma de sinergismo entre ambos patógenos (Bergeson *et al.*, 1970).

Aunque las interacciones referidas dependen principalmente de los organismos implicados (Jackson y Milton, 1968), otros factores, como la temperatura, densidad de inóculo de ambos patógenos, secuencia de inoculaciones, etc., pueden tener gran importancia en el desarrollo de aquéllas. Como ejemplo de esto, Abawi y Baker (1984) demostraron que en tomate no se producía interacción entre *M. incognita* y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a niveles bajos de densidad de inóculo para ambos patógenos (independientemente de la capacidad de resistencia/susceptibilidad de la planta al nematodo), aunque con densidades de inóculo elevadas (5×10^3 nematodos/planta) o altas temperaturas (30-35 °C), la infección por *M. incognita* incrementaba significativamente la severidad de la Marchitez causada por el hongo.

La interacción de nematodos y hongos fitopatógenos puede desarrollarse según diversos escenarios, como se describe en los siguientes apartados.

1.1.4.1.- Antagonismo

En ciertos casos, la interacción entre hongos y nematodos fitopatógenos tiene un efecto antagonista, siendo el perjuicio menor cuando ambos patógenos infectan la planta simultáneamente que cuando lo hacen por separado. Esto se observa, por ejemplo, en la infección conjunta de remolacha por *Heterodera schachtii* Schmidt y *F. oxysporum* f. sp. *betae* Stewart (Jorgenson, 1970). En otros casos, es uno de los patógenos el que dificulta la infección del otro, como en el caso de raíces de tomate infectadas por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ó *F. solani* (Mart.) Sacc., que originaron una disminución de la población y nodulación de *M. incognita* (Qadri y Saleh, 1990); o en sentido contrario, la infección de judía por *M. incognita*, que protegió a la planta contra el ataque de *Rhizoctonia solani* Kühn (Costa Manso y Huang, 1986).

La secuencia de inoculación por los dos patógenos también puede influir sobre el resultado de la interacción entre ambos, como en el caso de *R. solani* y *Heterodera cajani* Koshy en caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), donde el antagonismo observado cuando la planta era inoculada simultáneamente con ambos patógenos desaparecía cuando la planta se inoculó primero con *H. cajani* y después con *R. solani* (Walia y Gupta, 1986).

Entre los mecanismos que pueden explicar este tipo de interacciones están la competencia por puntos de infección en la raíz, la disminución de nutrientes, la producción por el hongo de compuestos nematicidas o productos tóxicos para el nematodo con efecto letal o limitante de su reproducción, y por último la reducción en el crecimiento y reproducción del hongo en los tejidos

infectados por el nematodo. También, la elicitación por parte de un patógeno de la respuesta defensiva de la planta contra el otro posible agente patógeno, podría explicar estas relaciones de antagonismo.

1.1.4.2.- Sinergismo

En otras combinaciones hongo-nematodo, la interacción entre ambos microorganismos ha dado lugar a un efecto sinérgico en la planta. En estos casos, la coinfección de la planta por ambos patógenos origina mayor severidad de los síntomas en comparación con la ocasionada por cada agente individualmente (Siddiqi y Husain, 1992). Diferentes estudios han demostrado que dicho efecto se mantiene aún cuando ambas infecciones se produzcan en sitios separados de la planta, lo que indicaría que otros mecanismos distintos de los de tipo físico, o adicionales a éstos, están implicados en la respuesta. Así, en experimentos de '*split roots*', en los que raíces distintas de una planta de caupí (*Cajanus cajan* (L.) Mill.) se inocularon con *Meloidogyne* spp. y *Fusarium udum* Butler, pudo demostrarse que el efecto sinérgico se mantenía a pesar de la separación de los agentes fitopatógenos interactuantes (Marley y Hillocks, 1996). Varios mecanismos pueden explicar este sinergismo, como la producción por parte del nematodo de un factor translocable o sistémico, la atracción hacia las raíces del hongo o del nematodo por los cambios producidos en la rizosfera, cambios fisiológicos producidos por el hongo o el nematodo en el huésped, y la disminución de la resistencia de la planta a uno de los patógenos causada por la infección del otro.

1.1.4.3.- Anulación de la resistencia raza-específica

Este tipo de respuesta se ha estudiado sobre todo en interacciones entre formas especiales de *F. oxysporum* causantes de Fusariosis Vasculares y *Meloidogyne* spp., debido a la significación económica de las enfermedades producidas por dichos hongos y la importancia que la utilización de cultivares resistentes tiene en el control de ellas. Es por ello que la anulación de la resistencia raza-específica por la posible coinfección de la planta por nematodos fitoparásitos constituye una amenaza potencial muy importante para la estrategia de lucha contra numerosas Fusariosis Vasculares.

El primer ejemplo de este tipo de respuesta fue estudiado en la interacción entre *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* y *Meloidogyne* spp. en algodón (Atkinson, 1892). Posteriormente ha sido documentada en otros patosistemas correspondientes a diversas plantas, como caupí (Harris y Ferris, 1991a; b; c), tomate (Sidhu y Webster, 1977), y judía (France y Abawi, 1994), etc.

La producción por los nematodos noduladores y los formadores de quistes del enzima corismato mutasa (Lambert *et al.*, 1999; Bekal *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2006) podría tener un papel fundamental en el fenómeno de anulación de resistencia, al redirigir hacia el desarrollo de los sitios de alimentación metabolitos potencialmente defensivos de la planta y/o esenciales para su fisiología (los productos derivados del corismato originan ácido salicílico y un gran número de metabolitos secundarios, además de los aminoácidos aromáticos y la fitohormona ácido indol acético). No obstante, otros varios mecanismos pueden estar implicados en la pérdida de la resistencia a otros patógenos, tal y como se especificará en los siguientes apartados.

1.2.- MECANISMOS MOLECULARES DE LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

1.2.1.- CONCEPTO DE ENFERMEDAD EN PLANTAS

Según el concepto de enfermedad acuñado por Roberts y Boothroyd (1984), ésta resulta de “una serie de procesos fisiológicos perjudiciales originados por la interacción continua de la planta con un agente causal primario, que se manifiestan en sus tejidos y órganos por respuestas patológicas características llamadas síntomas”. El agente causal primario puede ser de naturaleza biótica y el agente se denomina patógeno (plantas parásitas, nematodos, hongos, bacterias, espiroplasmas y fitoplasmas, virus y viroides), o abiótica (factores medioambientales como temperatura, luz, humedad, etc, nutricionales y químicos), en cuyo caso algunos autores la denominan fisiopatías o desórdenes fisiológicos. La causa de una enfermedad en plantas es de naturaleza multicomponente y en su forma más simple incluye las interacciones entre el agente, la planta y el ambiente biótico y abiótico mediadas por los atributos de ellos. En las enfermedades de origen biótico, son atributos dominantes en dicha interacción la virulencia y densidad de inóculo del patógeno (agente causal biótico), y la susceptibilidad de la planta; cuya interacción es modulada por la duración y favorabilidad del ambiente biótico y abiótico. Mientras que la resistencia es el atributo genéticamente regulado de la planta, que le permite restringir el crecimiento y/o la reproducción del patógeno en ella y, consecuentemente, el desarrollo de la enfermedad que éste le puede ocasionar (Jiménez-Díaz, 1992).

1.2.2.- RESPUESTA DE LAS PLANTAS FRENTE A AGENTES FITOPATÓGENOS BIÓTICOS

En la naturaleza, las enfermedades de plantas causadas por patógenos son la excepción si se tiene en cuenta la gran cantidad de microorganismos que comparten nichos ecológicos y establecen contacto con aquéllas y el escaso número de enfermedades que se producen (Agrios, 2005). Las plantas al ser organismos fijados en el suelo dependen exclusivamente de la defensa para evadirse de sus patógenos potenciales. En consecuencia cuentan con una gran cantidad de mecanismos de percepción de posibles patógenos y de protección frente a los mismos, lo que da pie a la expresión de muy variadas formas de resistencia.

En concreto, a grandes rasgos, se pueden observar distintos tipos de resistencia:

a) Resistencia no-huésped ó básica, que es la que presenta una especie vegetal frente a los microorganismos no patogénicos o a los patógenos de otras especies. Es una forma muy efectiva de resistencia basada en mecanismos defensivos preformados de la planta y en mecanismos inducidos, al menos de defensa basal.

b) Resistencia huésped ó resistencia de cultivar, en este caso aún establecida la compatibilidad básica por los patógenos con la planta, algunos genotipos de la planta huésped (cultivares) pueden poseer resistencia, que es operativa contra componentes de la especie microbiana a la cual la especie vegetal es susceptible. Dentro de esta resistencia hay dos sub-tipos:

- *Resistencia raza-específica mediada por genes R y Avr, o resistencia gen-a-gen*, en el que la resistencia de un cultivar puede interaccionar diferencialmente con genotipos de la especie patógena, que se denominan razas patógenicas, pero no contra todas. Esta respuesta se desencadena por el reconocimiento (bien directo o indirecto) mutuo entre los productos de los genes *R* de la planta y de los genes del patógeno que determinan su incapacidad de causar enfermedad en ella (genes de no-patogenicidad o 'avirulencia') (*Avr*). Los genes *R* son genes mendelianos, mayores, por lo que la resistencia que codifican se denomina mono u oligogénica. Esta resistencia es de fenotipo claramente discernible, en muchos casos asociado con la respuesta de muerte celular hipersensible, pero puede ser poco duradera y ser superada por el desarrollo de razas del agente patogénicas sobre los genes *R*.

- *Resistencia raza no-específica*, en este caso, la resistencia puede operar de forma generalizada contra todas las razas patógenicas conocidas de la especie patógena.

c) Resistencia sistémica, que es la que se desarrolla en un tejido sano tras: 1) el reconocimiento localizado de un patógeno, desencadenante de resistencia mediada por proteínas R o de defensa basal, en un tejido aéreo distal de la planta; o 2) la interacción de las raíces de la planta con microorganismos beneficiosos del suelo.

Desde el punto de vista del fenotipo de la resistencia, la capacidad de restringir el crecimiento y/o la reproducción del patógeno en la planta (impidiendo el establecimiento de la relación parasítica entre planta y patógeno) daría lugar a la *resistencia completa*. Alternativamente, la resistencia puede no impedir el parasitismo, pero actuar limitando la extensión con que tiene lugar la colonización y/o la reproducción del patógeno en el tejido del huésped, una vez que la infección se ha establecido, denominándose *resistencia incompleta ó parcial*.

1.2.3.- RECONOCIMIENTO DEL PATÓGENO POR LA PLANTA Y TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

1.2.3.1.- El sistema defensivo de las plantas

En las plantas, al igual que ocurre entre los animales, el reconocimiento de lo extraño ó “no propio” es la base de la respuesta defensiva frente a microorganismos potencialmente patogénicos. En vertebrados, está muy bien establecido que su defensa inmunitaria frente al ataque de microorganismos comprende la actuación de forma concertada de un doble sistema de inmunidad innata y adquirida o adaptativa. Mientras que el sistema inmune innato radica en el reconocimiento por receptores (PRRs, de “*pattern-recognition receptors*”), situados en la superficie celular o intracelulares, de estructuras moleculares generales y bastante conservadas de los patógenos (las denominadas PAMPs, de “*pathogen-associated molecular patterns*”), el de inmunidad adquirida ó adaptativa se basa en células móviles que se desplazan en el sistema circulatorio y que son capaces de generar mediante recombinación somática una gama de receptores patógeno-específicos. Los conceptos fitopatológicos actualmente en uso establecen un comportamiento relativamente similar de las plantas, pese a carecer éstas de un sistema equivalente al de inmunidad adquirida animal. La respuesta defensiva de las plantas reside sólo en su sistema de defensa innata (esto es, basada en receptores preformados codificados genéticamente), aunque este sistema al basarse en un número de receptores mucho mayor al del sistema inmunidad innata animal, ya que puede desarrollar la doble tarea de reconocimiento genérico de no-patógenos o microorganismos en general y de reconocimiento específico de patógenos o de variantes

patogénicas de éstos. Se podría, pues, considerar que el sistema único de respuesta defensiva innata de las plantas presenta dos ramas, una que trabaja de forma muy similar al sistema de inmunidad innata animal, reconociendo PAMPs, y la otra que reconoce efectores o factores de virulencia específicos de los patógenos y que por ello es capaz, de alguna manera, de suplir la falta de un sistema como el de inmunidad adquirida animal (Chisholm *et al.*, 2006; Jones y Dangl, 2006). Mientras que la actuación de la primera rama origina una respuesta de resistencia basal de resistencia no-huésped, la de la segunda produce una respuesta generalmente más robusta de resistencia raza-específica, si bien ambas pueden integrar reacciones muy similares, con la excepción, tal vez, de la denominada reacción de muerte celular hipersensible (HR, ver más adelante) que suele asociarse sólo a eventos de reconocimiento específicos (Hofius *et al.*, 2007; Livaja *et al.*, 2008).

La primera rama del sistema defensivo innato de las plantas, reconoce una amplia variedad de patrones moleculares evolutivamente estables asociados a patógenos o microorganismos en general (PAMPs; también llamados MAMPs, de "*microbe-associated-molecular patterns*") mediante receptores (PRRs) que normalmente se supone que son extracelulares (de membrana). El reconocimiento MAMPs:PRRs desencadena una respuesta defensiva basal (Bent y Mackey, 2007), también llamada PTI (de "*PAMPs-triggered immunity*") (Jones y Dangl, 2006). Como determinantes PAMPs/MAMPs podemos considerar en principio a componentes o motivos estructurales de proteínas y de polisacáridos parietales microbianos, avalados tanto por investigaciones específicas recientes [caso de las proteínas bacterianas flagelina y factor de elongación Tu (EF-Tu)], como por haber sido reconocidos en la literatura fitopatológica a lo largo de más de 30 años como elicitores generales de reacciones de defensa de plantas [caso de oligosacáridos (especialmente fragmentos de β -glucanos y de quitina, dos polisacáridos presentes en la paredes celulares de muchos hongos), lípidos, péptidos y proteínas] (Ebel y Cosio, 1994; Nürnberger, 1999; Schwessinger y Zipfel, 2008). Sin embargo, como dentro de los elicitores generales se incluyen no sólo sustancias procedentes de los patógenos (elicitores exógenos) sino también de la propia planta (elicitores endógenos) que resultan en este caso liberadas por el patógeno [caso, por ejemplo, de oligogalacturónidos producidos por degradación parcial de la fracción péctica de la pared celular vegetal efectuada por enzimas pectolíticas del patógeno (Shibuya y Minami, 2001)], se considera que además de MAMPs/PAMPs otros tipos de compuestos que derivan del huésped actúan también como inductores del sistema defensivo innato de las plantas. Éstos, al ser patrones moleculares inducidos por microorganismos, suelen denominarse MIMPs (de "*microbe-induced molecular patterns*") (Mackey y McFall, 2006). Aunque los receptores PRRs, necesarios para el reconocimiento de los anteriores "determinantes antigénicos" (MAMPs/PAMPs y MIMPs), están poco descritos a nivel

estructural, los datos conocidos apuntan a que mayoritariamente podrían ser proteínas transmembranales con un dominio enlazante extracelular de tipo LRR (de “*leucine-rich repeat*”, repeticiones ricas en leucina) y que o bien poseen un dominio citoplásmico señalizador de quinasa (receptores RLKs, de “*receptor-like kinases*”) o carecen del mismo (receptores RLPs, de “*receptor-like proteins*”) (Bent y Mackey, 2007; Zipfel, 2008).

La respuesta PTI o de resistencia basal, junto con la dotación de defensas químicas y estructurales preformadas (constitutivas), proporcionan a las plantas un fondo de protección frente a sus patógenos específicos al tiempo que constituyen los principales mecanismos determinantes de la resistencia no-huésped (no obstante, algunos tipos de resistencia no-huésped, que cursan desarrollando una reacción de muerte celular hipersensible ó HR, podrían implicar además formas más específicas de reconocimiento de los patógenos, muy similares a las que se producen en la resistencia gen-a-gen; Mysore y Ryu, 2004). La diversidad de MAMPs/PAMPs y MIMPs capaces de actuar como determinantes “antigénicos” de la respuesta PTI explicaría, entre otros factores, el carácter cuantitativo, generalizado e inespecífico de la resistencia no-huésped. Conceptualmente, la estabilidad de este tipo de resistencia podría justificarse por ser consecuencia de varias capas sucesivas de mecanismos de protección, que comprenden tanto barreras constitutivas como inducibles (Nürnberg y Lipka, 2005).

La segunda rama del sistema defensivo de las plantas se basa en la producción de diversas clases de proteínas receptoras altamente polimórficas, pero con estructuras bastante conservadas, capaces de reconocer bien directa ó indirectamente a determinantes proteicos específicos de los patógenos. Tales proteínas receptoras, aunque podrían también incluirse en el grupo de PRRs, se suelen referir, en base a la nomenclatura desarrollada en relación con la clase más estudiada de resistencia raza específica (la resistencia gen-a-gen), como proteínas de resistencia (proteínas R), siendo dentro de la teoría general de la resistencia gen-a-gen los productos de los correspondientes genes *R*. Los determinantes proteicos específicamente reconocidos por las proteínas R suelen denominarse a su vez, también de acuerdo con dicha teoría, como proteínas o factores de avirulencia (*Avr*) al considerarse productos de los respectivos genes *Avr* de los patógenos.

Se admite que la supresión de la respuesta PTI de la planta huésped por una especie microbiana (o por una *forma specialis* fúngica ó patovar bacteriano) es el suceso que instaura para ésta un estado de compatibilidad básica que la convierte en un patógeno específico. Esta adaptación patogénica, fruto de la interacción evolutiva de las plantas con sus patógenos potenciales, parece ser consecuencia de la producción por parte de los microorganismos de efectores o factores de virulencia específicos que inducen una respuesta también específica de susceptibilidad (a la que se denomina ETS, de “*effector-triggered susceptibility*”) en la planta al

suprimir la expresión de sus mecanismos de defensa basal (Ma y Guttman, 2008). Estos efectores pueden ser definidos como moléculas derivadas del patógeno que promueven su virulencia interactuando con el huésped, sin tener ninguna función en el crecimiento y desarrollo microbiano (Bent y Mackey, 2007). Cada patógeno parece secretar decenas de efectores, tal como puede deducirse del elevado número de efectores de tipo III (entre 20 y 100, dependiendo de la especie y aislado) que introducen las bacterias fitopatógenas en las células de sus huéspedes (Cunnac *et al.*, 2004; Lindeberg *et al.*, 2006). La respuesta evolutiva de defensa de las plantas ante sus patógenos específicos (supresores de la respuesta de PTI), es el reconocimiento vía proteínas R de algunos de los efectores de virulencia secretados por aquellos (que de esta forma actúan como factores de avirulencia) y producir una respuesta amplificada y robusta de resistencia que se suele denominar de “inmunidad activada por efectores” (ETI, de “*effector-triggered immunity*” (Tameling y Takken, 2007). En ambos casos, las respuestas PTI y ETI son cualitativamente bastante similares, si bien esta última es generalmente más intensa y podría incluir de forma exclusiva a reacciones HR o de muerte celular hipersensible (Jones y Dangl, 2006).

Los microorganismos patógenos pueden readaptarse a la nueva presión de selección ejercida por el reconocimiento de algunos de sus efectores, mediante la eliminación o cambio de conformación de éstos, con lo que se establece un 2º estado de ETS que lleva nuevamente a una infección exitosa aunque, en algunos casos, con una cierta merma de virulencia (Bent y Mackey, 2007). Las plantas, a su vez, pueden adaptarse a la nueva situación mediante reconocimiento del agente causal (nuevo efector) y establecimiento de una nueva respuesta de ETI. De acuerdo con el modelo en zig-zag propuesto por Jones y Dangl (2006), la actuación del sistema inmune de las plantas, como consecuencia de la coevolución de éstas con sus patógenos potenciales, pasa por una fase inicial de PTI, desencadenada por el reconocimiento de MAMPs/PAMPs (ó MIMPs) por PRRs, y alternativas fases de ETS y ETI desencadenadas las primeras por efectores de virulencia del patógeno y las segundas por el reconocimiento directo ó (más bien) indirecto de algunos de estos efectores (que se convierten así en factores de avirulencia) por receptores (generalmente) intracelulares (proteínas R). Los genes que definen efectores reconocidos por determinados genes *R* se denominan genes de avirulencia y suelen ser mantenidos porque dan cierto aumento del poder de patogenicidad en las líneas susceptibles. Un ejemplo de este tipo de genes puede ser el que codifica a una proteína de bajo peso molecular rica en cisteína secretada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, la cual es necesaria para el reconocimiento del patógeno por el gen *I-3* de resistencia en plantas de tomate (Rep *et al.*, 2004).

Los efectores de virulencia mejor conocidos son los denominados de tipo III, entre los que la proteína harpina (*harpin*) constituye uno de los ejemplos más representativos. Estos efectores, que

son producidos por una serie de bacterias fitopatógenas Gram-negativas, reciben su nombre del sistema de secreción que éstas utilizan para inyectarlos en el citoplasma de las células del huésped (Block *et al.*, 2008). Respecto a los efectores de hongos es bastante poco lo que se conoce, con la excepción de los de tipo RXLR de oomicetos (Birch *et al.*, 2008). Las proteínas R de las plantas, capaces de reconocer a efectores de los patógenos y desarrollar así una respuesta de ETI, son en su mayoría proteínas intracelulares de tipo NB-LRR, esto es, con dominios LRR y con un sitio NB (de “*nucleotide-binding*”). Se conocen dos grandes grupos de tales proteínas, las TIR-NB-LRR y las CC-NB-LRR, según contengan hacia el extremo N-terminal dominios adicionales TIR (dominio con homología a los receptores Toll de *Drosophila* y de Interleukina-1 de humanos) ó CC (de “*coiled-coil*”, o espiral enrollada), respectivamente. Existen, sin embargo, otras familias de proteínas R si bien por el momento minoritarias, como las de RLKs y RLPs (proteínas transmembranales similares a los dos tipos mejor conocidos de PRRs), las constituidas sólo por dominios citosólicos (único o en tándem) de quinasas, las que contienen un dominio citosólico CC anclado a la membrana plasmática, ó las que contienen un dominio extracelular LRR (como RLKs y RLPs) y dominios citosólicos PEST (para degradación de proteínas) y RME (de endocitosis mediada por receptor) (McDowell y Woffenden, 2003). El reconocimiento de efectores por proteínas R se admite que puede ser bien directo, análogo al de los PAMPs/MAMPs por los PRRs, ó indirecto, vía la detección por proteínas R de la degradación o modificación de proteínas del huésped que son diana de la acción de los factores de virulencia (hipótesis “*guard*”, según la cual las proteínas R vigilan la integridad de las proteínas diana de las proteínas de avirulencia de los patógenos (Van der Biezen y Jones, 1998). Que el reconocimiento sea de uno u otro tipo puede influir de forma importante en la durabilidad de la resistencia conferida por un particular gen R (Bent y Mackey, 2007).

En resumen, el reconocimiento de los patógenos por el sistema defensivo de las plantas parece mediado por dos grandes grupos de receptores, el primero que reconocería a estructuras PAMPs/MAMPs ó MIMPs, bastante generales y conservadas, con el desencadenamiento de una respuesta de PTI (de resistencia basal) y el segundo que haría lo propio con efectores de virulencia (factores de avirulencia) específicos de los patógenos con desarrollo de una respuesta de ETI (de resistencia específica, normalmente raza/cultivar-específica, o de resistencia gen-a-gen). Aunque las bases que sustentan este modelo vigente de defensa inmune de las plantas a enfermedades son firmes, debe tenerse presente, no obstante, que las mismas se han obtenido de estudios relativamente restringidos, por lo que a tipo de patógenos y órganos de la planta afectados se refiere. Así, la mayor información sobre la actuación del sistema defensivo y sus componentes moleculares deriva del estudio, en una serie limitada de especies vegetales entre las que

Arabidopsis thaliana viene ocupando una posición cada vez más prominente, de enfermedades foliares causadas por patógenos biotrofos, en los que la defensa pasa por el rápido desarrollo de una reacción de muerte celular hipersensible. Por ello, cabría esperar que los mecanismos expuestos no agoten la totalidad del espectro defensivo de las plantas.

1.2.3.2.- Desarrollo de la respuesta defensiva de las plantas

La respuesta del sistema inmune se produce mediante la actuación consecutiva de tres etapas fundamentales: a) reconocimiento mediado por receptores de los patógenos, b) subsiguiente señalización intracelular, y c) ejecución de la respuesta defensiva. En general, las etapas a) y b) son las que han recibido mayor atención por lo que son las mejor conocidas a nivel de mecanismos moleculares subyacentes, mientras que la etapa c) está bastante poco conocida a este nivel mecanístico.

-Reconocimiento de los patógenos (etapa a)

Como se ha descrito en la sección precedente, éste se produce mediante una serie de proteínas receptoras (PRRs y proteínas R) que en su mayoría contienen dominios LRRs a los que en general se les asigna un papel principal en la especificidad del reconocimiento. Las proteínas PRRs, tanto RLPs como RLKs, interactúan directamente con las estructuras a las que reconocen (PAMPs) en el exterior celular, mientras las proteínas R (al menos las mayoritarias de tipo NB-LRR) reconocen intracelularmente a sus elicitores específicos (proteínas Avr), lo que hacen bien de forma directa o indirecta (Stulemeijer y Joosten, 2008).

Sin pretender, en absoluto, presentar una visión ni tan siquiera mínimamente aproximada del estado actual de conocimiento sobre la materia, podríamos indicar que las RLPs, que carecen de un dominio citoplásmico señalizador, necesitan modificaciones post-traduccionales ó proteínas adicionales que se unan a la pequeña parte citoplasmática de la proteína para mediar las siguientes respuestas en cadena, mientras que las RLKs utilizan a tal efecto su dominio citoplásmico de proteína quinasa, mediante procesos de auto-fosforilación (Stulemeijer y Joosten, 2008). Finalmente, en el mecanismo de acción de las proteínas NB-LRRs se han propuesto dos posibles modelos de actuación parecidos entre sí: a) activación de la función mediante unión de ATP/ADP ("*switch function of ATP/ADP binding*") (Takken *et al.*, 2006), y b) similar al anterior pero con dos modos directo ó indirecto de detección del patógeno (De Young e Innes, 2006). En ambos casos, el dominio LRR del extremo C-terminal actúa como principal determinante de la especificidad del

reconocimiento, el dominio NB actúa en el enlace de ATP/ADP y el dominio existente en el extremo N-terminal (CC o TIR) es el implicado en la señalización intracelular del reconocimiento.

El dominio LRR se cree que puede tener un papel muy importante por su variabilidad en el reconocimiento, pero hasta la actualidad no se ha observado que ningún efector se una directamente a este dominio (Tameling y Takken, 2007). Sin embargo, sí que se ha visto cierta interacción con chaperonas que pueden ser requeridas para el apropiado plegamiento de este dominio (Azevedo *et al.*, 2006), y también se han observado interacciones de este dominio con el extremo N-terminal de las proteínas NB-LRR (Leister *et al.*, 2005), las cuales pueden ser importantes en la regulación de la actividad de las proteínas NB-LRR y con ella, la inducción de la respuesta defensiva (Tameling y Takken, 2007).

-Transducción de la señal y respuesta defensiva (etapas b y c)

Tras la percepción de los patógenos, una serie diversa de rutas participan en la transducción de la señal de reconocimiento que, en última instancia, culmina con la activación de factores de transcripción y la expresión de genes relacionados con la respuesta defensiva. Las rutas de señalización no son independientes entre sí, presentándose interacción entre ellas así como un cierto grado de confluencia. Incluso ciertas rutas parecen tener una estructura ramificada, de modo que no todos los estímulos de reconocimiento que se transmiten por una determinada ruta utilicen exactamente los mismos intermedios (Glazebrook, 2001). Se tiene así un complejo circuito de transmisión de señales de reconocimiento, de estructura convergente e interactuante, capaz de conducir señales generadas desde distintos puntos de entrada por vías concurrentes que pasan por un número reducido de nudos (rutas de señalización) y desembocan en un número discreto de salidas (factores de transcripción) con el despliegue de una respuesta inducida de resistencia. El sistema combina características de generalidad (implicación no sólo en respuestas de defensa frente a todo tipo de patógenos, sino también de defensa frente a la producción de heridas y ataques de herbívoros así como a estreses abióticos) con otras de especificidad (así con *Arabidopsis* y otras especies se ha evidenciado que mutaciones determinadas comprometen la resistencia basada en unos genes R pero no en otros, aún cuando ambos tipos de genes utilicen una misma ruta de señalización; Glazebrook, 2001).

Aunque no describiremos en detalle los conocimientos actuales sobre distintas rutas de señalización, tal como se están desvelando en numerosos estudios de biología y genética molecular, sí haremos referencia a que las evidencias implican en tales rutas a los siguientes elementos o etapas (Stulemeijer y Joosten, 2008):

-Fosforilación de proteínas, como consecuencia de la activación de una gama de protein-quinasas, entre las que se pueden señalar como especialmente significativas las cascadas de protein-quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y las protein-quinasas dependientes de calcio (CDPKs).

-Activación de proteínas G, adenilato ciclasas y fosfolipasas (con formación de ácido fosfatídico, un importante segundo mensajero).

-Cambios transitorios en la permeabilidad iónica de la membrana plasmática (activación de ATPasas y apertura de canales regulados por nucleótidos cíclicos), determinantes de la entrada de Ca^{2+} y H^+ y salida de K^+ y Cl^- , con el subsiguiente incremento del calcio citosólico (otro importante segundo mensajero que, entre otros efectos, activa a CDPKs) y alcalinización del espacio extracelular.

-Producción transitoria de EROs (estallido oxidativo), como consecuencia de la activación de enzimas apoplásticas (NADPH-oxidasa, otras oxidasas apoplásticas y/o peroxidasas), y de NO (óxido nítrico). Ambos, EROs y NO, son importantes segundos mensajeros que participan en rutas específicas de señalización.

-Producción de ácidos salicílico (SA) y jasmónico (JA) así como de etileno, todos ellos implicados en rutas específicas de señalización que pueden operar de manera antagónica.

-Producción de modificaciones postraduccionales (PTMs, de "*post-translational modifications*") de proteínas entre las que, además de la ya mencionada reacción de fosforilación, se pueden citar otras varias como ubiquitinación y sumoilación, S-nitrosilación y S-palmitoilación, N-miristoilación y glicosilación (Stulemeijer y Joosten, 2008).

La respuesta defensiva derivada del proceso de transducción de la señal de reconocimiento es consecuencia de cambios de actividad, como resultado de procesos de PTM, de proteínas pre-existentes (enzimas, factores de transcripción) y sobre todo de una reprogramación transcripcional derivada de la síntesis, activación y/o inhibición de factores de transcripción (TF, de "*transcription factor*"). Aunque son varias las familias de TFs que parecen modular lo que se ha venido en denominar el transcriptoma defensivo de las plantas (Eulgem, 2005), la presencia en los promotores de numerosos genes defensivos de *Arabidopsis* de sitios enlazantes de factores de transcripción de tipo WRKY (las denominadas cajas W) ha hecho pensar que esta amplia familia de TFs (en *Arabidopsis* la familia WRKY se compone de 74 miembros) desempeña un papel dominante y central en la regulación de la defensa vegetal (Eulgem y Somssich, 2007). Dos características importantes de la familia de factores WRKY, que son también compartidas por algunas de las otras familias de TFs implicadas en la defensa, son la alta redundancia funcional entre algunos de sus

miembros y el contener representantes capaces de realizar cometidos antagónicos de activación o represión de la transcripción. En relación con este segundo aspecto, cada vez se hace más evidente que la inactivación de factores WRKY que reprimen reacciones de defensa constituye un mecanismo clave de inducción de ciertas respuestas del sistema inmune de plantas (Eulgem y Somssich, 2007).

Que la respuesta de defensa de las plantas esté también sometida a elementos de control negativo parece lógico, ya que debe resultar ventajoso limitar su expresión, que energéticamente es costosa, sólo a situaciones en las que realmente resulte necesaria. Algunos de estos elementos de control negativo han podido conocerse del estudio de mutantes que expresan constitutivamente determinadas reacciones defensivas, en especial la de HR (los denominados mutantes miméticos de lesión, "*lesion mimic mutants*"). Uno de estos elementos de control es LSD1, cuya supresión genera mutantes *lsd1* de *Arabidopsis* que experimentan respuestas generalizadas de HR. LSD1 es una proteína con dominios de dedos de zinc, al igual que los TFs de tipo WRKY, y que actúa como regulador negativo de respuestas celulares relacionadas con la producción de EROs, como es el caso de la HR (Dietrich *et al.*, 1997). Otra clase de reguladores negativos o supresores de reacciones de defensa, que actúan de manera menos directa sobre la transcripción que TFs o efectores como LSD1, es la de las proteínas MLO. La supresión de este tipo de proteínas en cebada origina mutantes *mlo* que muestran inducción espontánea de HR y resistencia estable frente a Oídio que ha podido aprovecharse industrialmente. Las proteínas MLO se localizan en la membrana plasmática donde interaccionan por su extremo C-terminal con la CDPK calmodulina, por lo que su actuación, como reguladores negativos de la activación de la HR, parece requerir señalización mediada por Ca^{2+} (Kim *et al.*, 2002).

Pese a que el sistema defensivo de las plantas es estático y por tanto cada célula debe solventar su propia defensa, la interacción que se da localizadamente con un patógeno genera señales que pueden sensibilizar tejidos sanos distales de cara a su defensa frente a un ataque posterior de ese mismo u otro patógeno. Se trata del fenómeno de resistencia o inmunidad sistémica, que en plantas se manifiesta con al menos una doble apariencia. La primera y mejor caracterizada es la denominada resistencia sistémica adquirida (SAR, de "*systemic acquired resistance*"), que es un estado de resistencia, a un amplio espectro de enfermedades y relativamente persistente en el tiempo, que se establece tras la infección compatible o incompatible de tejidos de una planta por patógenos que provocan síntomas de necrosis. La segunda, que recibió la denominación de resistencia sistémica inducida (ISR, de "*induced systemic resistance*"), es también un estado de resistencia de larga duración, a una amplio espectro de patógenos e incluso

también a insectos herbívoros, que adquieren las plantas tras la interacción de sus raíces con microorganismos no-patogénicos del suelo, como por ejemplo rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Van Loon *et al.*, 1998). Parece claro que tanto en SAR como en ISR se debe producir una generación de señales en el sitio de infección que se emiten y son percibidas a larga distancia por los tejidos sanos (transmisión sistémica) donde se induce una subsiguiente respuesta de resistencia. Respecto a la naturaleza de la señal, nada se sabe en el caso de ISR mientras que en el de SAR lo que está mejor establecido es que la misma no es SA; como alternativas no excluyentes (la señal podría ser múltiple), se han propuesto el salicilato de metilo, ciertos compuestos lipídicos (entre ellos algunos posibles derivados del JA), péptidos y NO, entre otras (Vlot *et al.*, 2008). Existen diferencias nítidas entre SAR e ISR respecto al despliegue de defensas en los tejidos y a las rutas de señalización participantes. En relación con el despliegue de defensas, éste siempre se produce, independientemente de que se de o no la infección secundaria (infección provocada por inóculo del patógeno producido en las primeras infecciones en la planta), en SAR (de hecho la acumulación sistémica de PR-1, que como veremos más adelante en el apartado 2.4 es una típica proteína PR, suele ser la forma más habitual de evidenciar experimentalmente la inducción de SAR), mientras que en ISR puede no darse respuesta defensiva alguna hasta que se produzca la infección secundaria, momento en que se despliega de manera mucho más rápida y/o potente que en los controles no sometidos a ISR (efecto de sensibilización, ó "*priming*", del tejido sistémico para potenciar su defensa). Aunque el desarrollo de reacciones de defensa puede acabar siendo muy similar en ISR y SAR, y en ambos casos este despliegue defensivo parece estar controlado por un regulador transcripcional común, NPR1, constituye una diferencia esencial que mientras en SAR dicho despliegue es dependiente de la ruta de señalización del SA, en ISR lo es de las rutas de señalización de JA y/o etileno (Van Loon, 2007). De acuerdo con la aparente especificidad que presentan las rutas anteriores respecto al tipo de patógenos para el que resultan efectivas (Glazebrook, 2005), algunos casos como en diversas ff. spp. de *Fusarium oxysporum* resultan restringidos tanto por SAR como por ISR, mientras que otros sólo lo son bien por ISR (caso de hongos necrotrofos facultativos como *Botrytis cinerea*) o por SAR (caso de algunos virus).

Como se ha indicado, el resultado de la señalización es una reprogramación transcripcional que afecta a la expresión de un amplio espectro de mecanismos inducibles de defensa. No obstante, como se está revelando por estudios de transcriptómica y proteómica, dicha reprogramación va mucho más allá de la sólo afectación de reacciones catalogadas como de defensa, tal como queda bien patente de estudios con *Arabidopsis* que han llegado a concluir que hasta un 25% de genes responden a la infección por patógeno alterando sus niveles de

transcripción (Eulgem, 2005). El último dato anterior es buen indicativo de la complejidad de la respuesta defensiva de las plantas y, por tanto, de la necesidad de hacer uso de cara a su estudio de técnicas ampliamente informativas, como son las "ómicas".

1.2.4.- MECANISMOS DE DEFENSA DE LA PLANTA

1.2.4.1.- Mecanismos constitutivos

Se pueden diferenciar tres tipos de mecanismos de defensa constitutivos, la defensa debida a la carencia de factores esenciales, las defensas estructurales y las defensas químicas preexistentes en la planta (Agrios, 2005).

A) **Defensa debida a carencia de factores esenciales**, como podría ser la ausencia en el huésped de las dianas específicas de las toxinas producidas por el patógeno o de elementos nutritivos necesarios para éste.

B) **Defensas estructurales preexistentes**, entre las que se pueden incluir la cantidad y composición de la cera y cutícula que cubre las células epidérmicas, la estructura de la pared de tales células, el tamaño, localización y forma de los estomas y lenticelas, y la presencia de tejidos con gruesas paredes celulares que dificultan la progresión del patógeno.

C) **Defensas químicas preexistentes**, entre las que se incluyen tanto a compuestos con actividad antimicrobiana *per se*, caso por ejemplo de las saponinas (Papadopoulou *et al.*, 1999), como a precursores inmediatos de compuestos antimicrobianos (caso de glucósidos cianogénicos, glucosinolatos o precursores de fitoalexinas). El término "fitoanticipina" se ha propuesto para distinguir estos compuestos antimicrobianos preformados de las fitoalexinas, que son también compuestos antibióticos que se originan tras la infección, pero a partir de precursores metabólicos remotos (VanEtten *et al.*, 1994). Igualmente, constituyen importantes defensas preformadas una gama amplísima de proteínas/péptidos antimicrobianos (García-Olmedo *et al.*, 1998; Veronese *et al.*, 2003), aunque, como éstos actúan además como defensas inducibles, se tratarán más adelante dentro de las denominadas proteínas relacionadas con la patogénesis. Algo similar ocurre con ciertos inhibidores enzimáticos, que también se describirán dentro de las defensas inducibles.

1.2.4.2.- Mecanismos inducibles

A) Reacción de muerte celular hipersensible (*Hypersensitive response, HR*), o necrosis rápida y localizada de las células vegetales en el sitio de infección, en la que un número variable (generalmente reducido) de células del huésped que han establecido contacto directo con el patógeno mueren, al tiempo que se produce una detención del crecimiento y desarrollo de aquél dentro de la planta (Dangl *et al.*, 1996). La muerte celular es un proceso activo que requiere transcripción y síntesis de proteínas y se piensa que ocurre a través de una muerte celular programada ("*programmed cell death, PCD*"), en algunos aspectos similar a la apoptosis de las células animales (Levine *et al.*, 1996; Desikan *et al.*, 1998; Heath, 1998). Así, aunque las plantas carecen de caspasas, cisteín-proteasas similares (metacaspasas) parecen desempeñar un papel esencial en la activación y ejecución de al menos ciertos eventos de PCD en plantas similar al que efectúan las caspasas de animales (Bozhkov *et al.*, 2005).

La respuesta HR es bastante común particularmente en la resistencia raza-específica en enfermedades causadas por patógenos biotrofos obligados. Aunque generalmente se asocia al reconocimiento de factores de avirulencia por proteínas R, más que al de PAMPs por PRRs, la reacción HR también se observa en numerosos casos (no en todos) de resistencia no-huésped, lo cual podría apuntar a que esta forma de resistencia puede a veces incluir no solo respuestas de resistencia basal sino, también, respuestas derivadas del reconocimiento de efectores de los patógenos fúngicos obligados, virus, bacterias y nematodos (Mysore y Ryu, 2004). Todos los compuestos de señalización y rutas desarrolladas durante la respuesta defensiva son utilizados posteriormente para el desarrollo de una resistencia adquirida localizada ó sistémica.

B) Reacciones que modifican y fortalecen la matriz extracelular:

-Formación de geles y tílides (i.e., invaginaciones de la membrana plasmática y citoplasma de las células parenquimáticas anexas al xilema hacia el interior de los vasos de éste): Las tílides poseen paredes celulósicas y pueden, en algunos casos, llegar a obturar el vaso. Se suelen producir en muchas plantas bajo condiciones de estrés y durante la invasión xilemática de ciertos patógenos (Agrios, 2005).

En algunos casos, las plantas también suelen producir varios tipos de gomas alrededor de las lesiones posteriores a la infección, cuyo posible papel, como ocurre con las tílides, es la contención del crecimiento de los patógenos en la proximidad del punto de invasión. En este caso, la

deposición de gomas se suele realizar en los espacios intercelulares y entre células alrededor del sitio de infección, formando una barrera impenetrable (Agrios, 2005)

-Formación de capas de corcho: La infección por hongos, bacterias, e incluso algunos virus y nematodos fitopatógenos, frecuentemente induce en la planta la formación de varias capas de corcho posteriores al punto de infección, aparentemente como resultado de la estimulación de células del huésped por la secreción de sustancias por el patógeno. La función de estas capas de suberina es, por una parte, aislar la dispersión de posibles sustancias tóxicas que pueda secretar el patógeno y, por otra, restringir el acceso de éste al agua y nutrientes de los tejidos sanos (Agrios, 2005).

-Formación de zonas de abscisión: Suele ocurrir en hojas jóvenes en crecimiento activo tras la infección por diversos hongos, bacterias ó virus. La zona de abscisión suele formarse entre dos capas circulares de células foliares rodeando al punto de infección, disolviéndose la lámina media entre estas dos capas en toda la sección de la hoja y produciéndose gradualmente una muerte celular del tejido aislado, que se separa del resto y con él el patógeno (Agrios, 2005).

-Síntesis de nuevo material polisacárido de la pared, como el β -glucano callosa, y su integración en estructuras heterogéneas (papilas) que se depositan en los puntos de penetración (Heath, 1980; Ebrahim-Nesbat *et al.*, 1989; Bayles *et al.*, 1990; Stadnick y Buchenauer, 1999).

-Síntesis de proteínas parietales, tales como las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) (Showalter *et al.*, 1985; Showalter, 1993), y su deposición en el interior de la pared por efecto de reacciones de entrecruzamiento oxidativo (Bradley *et al.*, 1992; Brisson *et al.*, 1994; Otte y Barz, 2000).

-Deposición de ácidos cinámicos y/o síntesis y deposición de lignina y otros polímeros fenólicos (Matern y Kneusel, 1988; Moerschbacher *et al.*, 1990; Nicholson y Hammerschmidt, 1992).

Muchas de las reacciones anteriores implican etapas oxidativas con participación de peroxidasas y H_2O_2 del apoplasto (Espelie *et al.*, 1986; Moerschbacher, 1992; Olson y Varner, 1993; Milosevic y Slusarenko, 1996)

C) Reacciones con presunta actividad antimicrobiana.

-Inducción de la ruta fenilpropanoide, que origina precursores para la formación de, entre otros, el ácido salicílico [SA, molécula señalizadora implicada en el desarrollo de la HR y respuestas de resistencia local (LAR) y SAR; aunque SA puede originarse también a partir de precursores previos a la ruta fenilpropanoide, como los ácidos corísmico e isocorísmico (Wildermuth *et al.*, 2001)], las fitoalexinas de tipo isoflavonoide y cumarínico y los sillares monoméricos de la lignina (Hahlbrock y Scheel, 1989; Dixon y Paiva, 1995a, 1995b; Dixon *et al.*, 2002).

-Inducción de la actividad lipoxigenasa, que actúa sobre ácidos grasos poliinsaturados formando peróxidos lipídicos, capaces de provocar la destrucción de membranas y muerte celular (Keppler y Novacky, 1986) y de ser precursores biosintéticos de moléculas señalizadoras, como el ácido jasmónico (JA) y oxilipinas (Blee, 1998; Farmer *et al.*, 1998).

-Producción de fitoalexinas, ó metabolitos secundarios de naturaleza antimicrobiana, que se sintetizan “*de novo*”, rápida y localizadamente, asociada con la invasión por el patógeno en interacciones incompatibles y estímulos relacionados (Barz *et al.*, 1990; Smith, 1996; Hammerschmidt, 1999).

-Síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR o PRPs), este término fue introducido en 1980 para designar a proteínas (o péptidos) que, codificadas por la planta huésped, resultaban inducidas exclusivamente bajo condiciones fitopatogénicas ó situaciones similares (Antoniw *et al.*, 1980), incluyendo también ataques por insectos fitófagos. Esta definición, que dejaba fuera del grupo de PRPs a proteínas constitutivas que resultan inducidas en respuesta a patógenos o a proteínas inducidas bajo situaciones de estrés abiótico, ha ido perdiendo rigidez, de manera que, expresa o tácitamente, se han ido incluyendo en el grupo a nuevos miembros cada vez más en base a su carácter inducible en respuesta a situaciones fitopatogénicas que a la exclusividad de la inducción en tales situaciones. Así Van Loon, uno de los más señalados pioneros de la investigación en el ámbito de las PRPs, ha introducido el término de proteínas inducibles relacionadas con la patogénesis (“*inducible defence-related proteins*”) para incluir a proteínas que están a niveles casi indetectables en tejidos sanos y para las que se ha observado un incremento (inducción) de su contenido en los tejidos infectados por patógenos.

La inducción de proteínas PR bajo condiciones fitopatológicas, sugiere, pero no prueba, un papel de estas proteínas en la defensa de la planta (van Loon, 1990). En general, se considera que

constituyen un mecanismo de defensa, que impide o limita la dispersión del patógeno en la planta. Sin embargo, al igual que ocurre con otras reacciones de defensa (caso, por ejemplo, de la síntesis de fitoalexinas), son más bien escasas las evidencias a favor de la contribución de PRPs como determinantes de casos concretos de resistencia.

Las proteínas PR se pueden clasificar en diversas familias de acuerdo a similitudes en su secuencia, relaciones serológicas y/o actividades enzimáticas ó biológicas. Actualmente hay descritas 17 familias, desde PR-1 a PR-17 (Tabla 1), a cuyos miembros se asignan letras de acuerdo al orden con que fueron descritos (Ferreira *et al.*, 2007). Muchas de las proteínas PR son de función desconocida, aunque para otras sí han podido establecerse en bioensayos que poseen actividades antimicrobianas, en apoyo de su supuesto papel en la defensa de las plantas.

En un rápido repaso indicaríamos que la familia PR-1, posiblemente la más importante de acuerdo con la cuantía de su inducción, es de función desconocida aunque existen evidencias de que algunos de sus miembros incrementan la resistencia de plantas frente a hongos, oomicetos y bacterias (Van Loon *et al.*, 2006). Tampoco es conocida la función de PR-17, la última familia de PRPs introducida hasta la fecha (Christensen *et al.*, 2002). La mayoría de las restantes familias de PRPs comparten con PR-1 su efecto antimicrobiano (especialmente antifúngico, pero también antibacteriano, insecticida, nematocida e incluso antiviral), que en general se ha asociado a sus actividades biológicas como: 1) enzimas hidrolíticas, caso de actividades β -1,3-glucanasa (PR-2), quitinasa (PR-3, PR-4, PR-8 y PR-11), proteasa (PR-7) o ribonucleasa (PR-10); 2) enzimas oxidativas implicadas en la lignificación, por su actividad peroxidasa (PR-9), o en la formación de ROS, por su actividad oxalato-oxidasa (PR-15) o por su relación con enzimas de este tipo (PR-16); 3) inhibidores enzimáticos, como es el caso de PR-6, que muestra actividad inhibidora de proteinasa; y 4) agentes permeabilizantes de membrana, como es el caso de las osmotinas y proteínas de tipo thaumatina (PR-5), las defensinas (PR-12), las tioninas (PR-13) y las proteínas de transferencia de lípidos (PR-14). El sinergismo entre algunas proteínas PR es bastante frecuente, como es buen ejemplo la potenciación de actividad antifúngica *in vitro* mostrada cuando quitinasas y β -1,3-glucanasas actúan conjuntamente (Theis y Stahl, 2004).

TABLA 1.1.- Familias de proteínas relacionadas con la patogénesis

Familia	Miembro tipo	Propiedades bioquímicas	Rango de masa molecular (KDa)
PR-1	Tabaco PR-1a	Desconocida	15-17
PR-2	Tabaco PR-2	B-1,3-glucanasa	30-41
PR-3	Tabaco P, Q	Quitinasa clase I, II, IV, VII	35-46
PR-4	Tabaco R	Proteínas de unión a quitina	13-14
PR-5	Tabaco S	Tipo thaumatina	16-26
PR-6	Tomate inhibidor I	Inhibidor de proteínasas	8-22
PR-7	Tomate P ₆₉	Endoproteinasa	69
PR-8	Pepino quitinasa	Quitinasa clase III	30-35
PR-9	Tabaco "peroxidasa formadora de lignina"	Peroxidasa (POC)	50-70
PR-10	Perejil "PR-1"	"Tipo ribonucleasa"	18-19
PR-11	Tabaco quitinasa clase V	Quitinasa clase V	40
PR-12	Rábano Rs-AFP3	Defensinas	5
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI-2.1	Thioninas	5-7
PR-14	Cebada LTP4	Proteínas transferidoras de lípidos	9
PR-15	Cebada OxOa (germin)	Oxalato oxidasas	22-25
PR-16	Cebada OxOLP	"Oxalate oxidase-like protein"	100 (hexámero)
PR-17	Tabaco PRp27	Desconocida	?

Fuente: Ferreira *et al.* (2007).

Otra clase de proteínas relacionadas con la defensa es la de proteínas antifúngicas ("*antifungal proteins*" o AFPs). Las AFPs solapan parcialmente con las PRPs, aunque es un grupo mucho mayor ya que, por un lado, incluye no sólo a proteínas antimicrobianas de plantas sino también de microorganismos y de animales (tanto vertebrados como invertebrados) y, por otro, no sólo incluye a proteínas inducidas específicamente por infección de un patógeno, sino también a proteínas constitutivas que no necesariamente tengan que experimentar inducción por patógenos. Las diversas clases de proteínas antifúngicas se muestran en la Tabla 2 (Ferreira *et al.*, 2007).

TABLA 1.2.- Clases de proteínas antifúngicas.

Clase	Características más importantes	Mecanismo de acción
Proteínas PR-1	Masas moleculares comprendidas entre 15-17 KDa. Homología a la superfamilia de proteínas ricas en cisteína.	Desconocido
β-Glucanasas	Actividad 1,3- β -endoglucanasa	Hidrólisis de 1,3- β -glucano, presente en las paredes celulares fúngicas
Quitinasas	Actividad quitinasa. Masas moleculares entre 26-43 KDa	Rotura de polímeros de quitina de la pared celular <i>in situ</i>
Proteínas de unión a quitina	Masas moleculares entre 3,1-20 KDa. Proteínas de unión a quitina	Unión a quitina (?)

Clase	Características más importantes	Mecanismo de acción
Proteínas del tipo thaumatina	Masa molecular de aprox. 22 KDa. Comparten cierta homología en la secuencia de aminoácidos con la proteína thaumatina	No esta completamente estudiado. Algunas causan cambios en permeabilidad en la pared celular de hongos, otras se unen a 1,3-β-glucano y presentan actividad 1,3-β-glucanasa
Defensinas /Tioninas	Baja masas molecular, proteínas ricas en cisteína	La inhibición del crecimiento fúngico es probablemente debida a una mecanismo de flujo (salida) de iones
Proteínas del tipo ciclofilina	Ejemplo: mungin	Desconocido
Proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs)	ARN N-glicosidasas que despurinan el ARNr	Inactivan los ribosomas fúngicos <i>in vitro</i> y, probablemente <i>in situ</i>
Proteínas transferidoras de lípidos (LTPs)	Masas moleculares de ~ 8,7 kDa	Desconocido
Inhibidores de proteasas	Proteínas inhibidoras de proteasas de serina y cisteína	Desconocido
Otras proteínas	Ejemplos: viridin y snakin-1	Desconocida
Péptidos antifúngicos	Péptidos de bajo peso molecular	Diversos mecanismos de acción

Fuente: adaptado de Ferreira *et al.* (2007)

D) Acumulación de especies reactivas de oxígeno (EROs: principalmente el anión radical superóxido, O_2^- , y el peróxido de hidrógeno, H_2O_2) **o estallido oxidativo, y de óxido nítrico** (NO), que parecen actuar, bien por separado o conjuntamente (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998; Baker y Orlandi, 1995; Lamb y Dixon, 1997; Wojtaszek, 1997; Delledonne *et al.*, 2001, 2002), como mediadores en el proceso de inducción de diversas respuestas defensivas y, muy especialmente, de la HR (de forma bastante similar a la acción de los macrófagos durante la respuesta inmune en animales) y SAR, pero también ejerciendo actividades antimicrobianas directas (efecto tóxico del H_2O_2 o del peroxinitrito, producto de reacción entre NO y O_2^- ; participación del H_2O_2 en procesos de reforzamiento de la pared, etc).

Las plantas están dotadas de numerosos mecanismos antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, que se encargan de mantener los niveles basales de EROs de las células dentro de unos límites de seguridad. Los mecanismos enzimáticos incluyen una amplia gama de enzimas entre las que cabe destacar a superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, catalasa, glutatión peroxidasa y peroxirredoxinas, mientras que los antioxidantes no enzimáticos más importantes son el ascorbato y el glutatión (García-Limones, 2003). La producción de EROs en el contexto de la defensa y otros aspectos de la fisiología de las plantas es el resultado de la regulación de tanto procesos enzimáticos que los originan (reacciones ligadas a la fotosíntesis cloroplástica, a la cadena

respiratoria mitocondrial, al metabolismo oxidativo de peroxisomas y microcuerpos, así como a diversas oxidasas de la membrana plasmática y a oxidasas y peroxidadas apoplásticas) como de los mecanismos antioxidantes encargados de su eliminación (Mittler *et al.*, 2004).

1.3.- MECANISMOS EN LA INTERACCIÓN PLANTA - ff. spp. DE *FUSARIUM OXYSPORUM*

1.3.1.-GENES IMPLICADOS EN EL RECONOCIMIENTO PLANTA- ff. spp. DE *FUSARIUM OXYSPORUM*

Como otros organismos multicelulares, los hongos patogénicos de plantas perciben señales del medio en el que se desarrollan a través de receptores celulares, lo que puede traducirse en la activación de rutas de transmisión que regulan la expresión de genes efectores que están directamente involucrados en la patogénesis (Lengeler *et al.*, 2000). La patogenicidad de las ff. spp. de *Fusarium oxysporum*, como en el caso de la f. sp. *lycopersici*, se ve inducida por la presencia de ciertas moléculas, entre ellas, los sillares monoméricos de la cutina (Roncero *et al.*, 2003), fitoalexinas (como se ha observado en el caso de *F. solani*) (Van Etten *et al.*, 1989) y exudados radicales tanto solubles como volátiles (Agrios, 2005). El pH del suelo también podría condicionar la expresión de ciertos genes (Peñalva y Arst, 2002). La patogenicidad inducida anteriormente estaría mediada por procesos de señalización llevados a cabo por dos rutas, vía MAPK y cAMP-PKA (Di Pietro *et al.*, 2003; Roncero *et al.*, 2003), una situación similar a la observada en otros patógenos fúngicos como *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr ó *Ustilago maydis* (DC.) Corda (Lengeler *et al.*, 2000).

Se ha observado la existencia de genes mayores implicados en la resistencia a la Fusariosis Vascular en tomate (Huang y Lindhout, 1997), melón (Brotman *et al.*, 2002) y garbanzo (Benko Isepon *et al.*, 2003) y la existencia de razas en muchas formas especiales en *F. oxysporum*, hacen que la interacción esté controlada mediante el modelo “*gen-a-gen*” (Rep *et al.*, 2004).

La resistencia en cultivares de tomate a la Fusariosis Vascular es raza-específica y controlada por seis loci. Algunos de estos genes han sido secuenciados, y codifican proteínas de resistencia de la subclase NBS-LRR (Simons *et al.*, 1998; Hemming *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2006; Ori *et al.*, 1997). El locus *I-2* confiere resistencia completa a la raza 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Simons *et al.*, 1998), siendo específicamente expresado en los tejidos que rodean los haces xilemáticos (Mes *et al.*, 2000), mientras que los otros loci *I* solo proporcionan resistencia parcial al patógeno (Sela-

Burlage *et al.*, 2001). La resistencia mediada por el gen *I-3* parece depender del reconocimiento de la proteína SIX1 (12 KDa, rica en cisteína, secretada durante la colonización del xilema), la cual pudiera ser la proteína de avirulencia de esta raza (Rep *et al.*, 2002; Rep *et al.*, 2003; Rep *et al.*, 2004; Rep *et al.*, 2005).

La resistencia a la Fusariosis Vascular en garbanzo es también raza-específica y está gobernada por genes mayores (Sharma *et al.*, 2004; Tullu *et al.*, 1999; Upadhyaya *et al.*, 1983), siendo la resistencia a las razas de tipo monogénica u oligogénica. La genética de las razas 1B/C y 6 está todavía sin determinar (Sharma *et al.*, 2004; 2005; Sharma y Muehlbauer, 2007; Tekeoglu *et al.*, 2000; Tullu *et al.*, 1999). Estudios recientes, usando la línea WR-315, han demostrado que la resistencia a las razas 1A, 2, 3, 4 y 5 es monogénica (Sharma *et al.*, 2005). A pesar de que no se ha realizado el mapa génico de los genes de resistencia a la Fusariosis vascular del Garbanzo, si se han encontrado marcadores que los sitúan en dos conjuntos de genes separados en dos diferentes grupos de ligamiento, el gen de resistencia a la raza 0 se sitúa en el grupo de ligamiento 5, mientras que los genes de resistencia que controlan las razas 1A, 2, 3, 4 y 5 están en el grupo de ligamiento 2 (Sharma y Muehlbauer, 2007).

Los genes de resistencia contra las razas 4 y 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (*foc-4* y *foc-5*) están localizados uno cerca del otro en el mismo grupo de ligamiento (Simon y Muehlbauer, 1997; Ratnaparkhe *et al.*, 1998); y el conjunto de los genes de resistencia contra las razas 1A y 2 están cerca del locus *foc-4* (Simon y Muehlbauer, 1997). Respecto a los marcadores moleculares de las razas 4 y 5, estos muestran alineamientos significativos con genes relacionados con la patogénesis localizados en los cromosomas 1 y 5 de *Arabidopsis thaliana* (Benko-Iseppon *et al.*, 2003).

Los progresos en la identificación de fuentes de resistencia y en el desarrollo de cultivares resistentes a la FVG han sido significativos en los últimos años. En el ICRISAT (International Crop Research Institute for the Semi-Arid Tropics), India, hay disponibles líneas de garbanzo, tanto “desi” como “kabuli” resistentes a la FVG (Haware *et al.*, 1990). Dicha resistencia ha sido incorporada con éxito a cultivares de alto rendimiento, ej. ICCV 2, ICCV 4 e ICCV 6, procedentes de ICRISAT (Ghanekar *et al.*, 1990), Surutato 77 y Sonora 80, procedentes de México (Morales, 1986), UC 15 y UC 27, procedentes de California (Buddenhagen y Workneh, 1988), y Andoum 1, precedente de Túnez (Halila y Harabi, 1990). Más recientemente, el grupo de Sanidad Vegetal (AGR-136) de la Universidad de Córdoba y CSIC ha identificado fuentes de resistencia a la FVG en colaboración con ICARDA (Internacional Center for Agricultural Research in the Dry Areas) y, a través de un proyecto Eclair de la U.E. (AGRE CT90-0051), el Departamento de Agronomía y Mejora del CIDA-Córdoba, Junta de Andalucía y Koipesol Semillas, S.A., habiendo obtenido germoplasma y líneas avanzadas (F₆ - F₇) de garbanzo con resistencia a la FVG. Como resultado de dichos trabajos, se han

identificado las líneas CA 252-10-1-1M, CA 252 2-1-0M y CA 255-2-5-0M como parcialmente resistentes (resistencia parcial o incompleta, "late wilting") a la raza 5 de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (Navas-Cortés *et al.*, 1998b), que es la más virulenta de las cuatro razas (razas 0, 1, 5 y 6) de este patógeno identificadas hasta ahora en España (Jimenez Díaz *et al.*, 1989b). Asimismo, se han obtenido las líneas CA-336-14-3-3-3-0 y CA334-20-4-2-3, que mostraron resistencia completa a dicha raza, siendo además resistentes a un aislado altamente virulento de *D. rabiei* (Navas-Cortés *et al.*, 1998b) y a las razas 0, 1 y 6 de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (Jiménez Díaz, *no publicado*), para cuyo desarrollo se usó la línea "desi" 81001 como fuente de resistencia.

1.3.2.-ENZIMAS DEGRADATIVOS DE LA PARED CELULAR

Durante la penetración de la raíz y la colonización de la planta, las diversas ff. spp. de *Fusarium oxysporum* secretan una variedad de enzimas degradadoras de la pared como son: poligalacturonasas (PGs), pectato liasas (PLs), xilanasas y proteasas, que pueden contribuir a la infección (Beckman, 1987). La regulación de estos genes puede estar inducida por la presencia de sustrato y reprimida por glucosa (Di Pietro *et al.*, 2003). Además, la actividad *in planta* de estos enzimas puede ser controlada por la presencia en el apoplasto, bien de forma constitutiva o inducible, de proteínas inhibitoras específicas. Entre éstas, merecen ser destacadas las proteínas inhibitoras de poligalacturonasas (PGIPs), para las cuales se ha propuesto un papel en la respuesta defensiva de las plantas frente a hongos fitopatógenos por la doble vía de inhibir la actividad PG de éstos y propiciar la acumulación de oligogalacturónidos activos como inductores (elicitors endógenos) de reacciones defensivas (De Lorenzo *et al.*, 2001; De Lorenzo y Ferrari, 2002).

1.3.2.1.- Poligalacturonasas

En *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se ha descrito la producción extracelular *in vitro* de dos endopoligalacturonasas (endo-PGs) y una exo-PG, evidenciándose un comportamiento diferencial de las razas 0 y 5, ya que mientras la menos virulenta raza 0 excretaba las tres isoformas la más virulenta raza 5 sólo lo hacía con la exo-PG (Pérez-Artés y Tena, 1990), lo que fue interpretado en términos de una falta de relación entre esta actividad y la patogenicidad ó virulencia (Pérez-Artés *et al.* 2004). Sin embargo, el comportamiento *in planta* difirió ya que ambas razas produjeron similarmente una misma endo-PG en el curso del desarrollo de la infección de plantas de garbanzo susceptibles (Jorge *et al.*, 2006). Un complemento similar de tres poligalacturonasas se ha estudiado en detalle en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. PG1, una endo-PG, se ha identificado como la forma mayoritaria

producida *in vitro* (Di Pietro y Roncero, 1996), mientras que las otras dos (PG2 y PG3), caracterizadas ambas como exo-PGs (Di Pietro y Roncero, 1996; García Maceira *et al.*, 1997), sólo se han detectado *in planta* en el curso de la infección de plantas de tomate (Roncero *et al.*, 2003). Además, se han identificado dos genes PG, *pg5* y *pgx4*, que codifican respectivamente a una endo-PG minoritaria y una exo-PG. Experiencias de sobre-expresión de *pg1* (Di Pietro y Roncero, 1998) y de inactivación dirigida de *pg5* (García-Maceira *et al.*, 2001) y *pgx4* (García-Maceira *et al.*, 2001), no han podido evidenciar que las respectivas formas PGs desempeñen algún papel en la patogenicidad o virulencia.

1.3.2.2.- Pectato liasas

En *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se han caracterizado tres isoformas endo-PL, dos de ellas excretadas *in vitro* por la raza 5 y la otra por la raza 0 (Pérez-Artés y Tena, 1990), lo que se ha interpretado como indicación de un posible papel de esta actividad en la virulencia (Pérez-Artés *et al.*, 2004). Esta conclusión ha sido apoyada por los resultados de estudios de expresión *in planta*, que indicaron una mayor inducción de actividad e isoformas PL en el curso de la infección de plantas de garbanzo con la raza 5, en comparación con la raza 0 (Jorge *et al.*, 2006). En *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se ha caracterizado una única endo-PL cuyo gen codificante, *pl1*, se activa transcripcionalmente durante el progreso de la Fusariosis Vascular de tomate, si bien la disrupción de este gen no causa ningún efecto en la virulencia (Huertas-Gonzalez *et al.*, 1999). Así pues, las pectato liasas pueden ser importantes factores de virulencia en *Fusarium*, aunque la multiplicidad de isoformas funcionalmente redundantes puede dificultar la obtención de evidencias respecto a la implicación en la patogénesis de enzimas individuales (Di Pietro *et al.*, 2003).

1.3.2.3.-Xilanasas

La completa degradación de xilanos, dada la heterogénea composición de éstos, necesita la actuación conjunta de diferentes tipos de enzimas, como endo- β -1,4-xilanasas, β -xylosidasas y β -glucuronidasas (Biely *et al.*, 1997). En *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* se han clonado hasta cuatro genes de endo-xilanasas (*xy12*, *xy13*, *xy14* y *xy15*), aunque mutantes knock-out revelaron que separadamente ninguno de estos genes contribuía significativamente a la patogenicidad (Di Pietro *et al.*, 2003). En *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se ha detectado y purificado una endo- β -1,4-xilanasa extracelular con una masa molecular de 21,6 KDa (Jorge *et al.*, 2005), habiéndose detectado *in planta* la producción en raíz de esta actividad durante el desarrollo de la FVG (Jorge *et al.*, 2006).

1.3.2.4.-Proteasas

Se ha estudiado la secreción de una “*subtilase*” (gen *prt1*), con unos niveles de expresión bajos durante todo el proceso de infección de tomate por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Sin embargo, la disrupción del gen no produjo ningún efecto en la virulencia (Di Pietro *et al.*, 2001).

1.3.3.-RESPUESTA DEFENSIVA DE LAS PLANTAS A LAS ff. spp. DE *FUSARIUM OXYSPORUM*

Se pueden observar diversas respuestas defensivas en plantas contra la infección por diversas ff. spp. de *F. oxysporum*, entre las que destacaríamos las siguientes:

1.3.3.1.- Formación de gomas y tílides

La formación de gomas y tílides intenta bloquear el avance de las hifas, considerándose una respuesta típica de plantas a hongos vasculares (Agrios, 2005; Beckman, 1987), si bien la misma se ha asociado indistintamente con la susceptibilidad ó resistencia de la planta huésped. Sin embargo, estudios histológicos con garbanzo infectado por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* no mostraron la presencia de oclusiones de vasos del xilema debidos a tílides, gomas ó geles (Basallote Ureba, 1987).

1.3.3.2.- Compuestos antifúngicos

Estos compuestos pueden ser preformados o inducibles y localizarse tanto intra- como extra-celularmente, como por ejemplo en el fluido xilemático. Se ha observado un aumento de azufre elemental hasta niveles fungitóxicos en el fluido xilemático de plantas de tomate infectadas por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Williams *et al.*, 2002). Otro compuesto presente con anterioridad a la infección por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* es la saponina α -tomatina, la cual aumenta su concentración a niveles fungitóxicos en el fluido xilemático de tomate rápidamente después de la infección (Smith y MacHardy, 1982).

Dentro de este grupo de compuestos, se pueden incluir algunos péptidos como cicerin y arietin, que han sido estudiados en semillas de garbanzo y presentan actividad antifúngica contra *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Ye *et al.*, 2002).

La cantidad de fenoles totales no se ha encontrado correlacionada con la resistencia a la Fusariosis Vascular de garbanzo, aunque sí se ha podido evidenciar cromatográficamente la acumulación en líneas resistentes de algunos compuestos antifúngicos que no llegaron a ser identificados (Khan *et al.*, 2005). En otras Fusariosis Vasculares sí se ha observado una inducción de compuestos fenólicos, como los ácidos p-cumárico, ferúlico, vanílico y sinápico en banana inoculada con *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) W. C. Snyder & H. N. Hansen (De Ascensao y Dubery, 2003), o los ácidos ferúlico, caféico y vanílico junto con un compuesto que no se pudo identificar en tomate inoculado con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Panina *et al.*, 2007). Los compuestos fenólicos, o más concretamente sus productos de oxidación, provocan el oscurecimiento vascular asociado con la Fusariosis Vascular (Mace *et al.*, 1972).

1.3.3.3.- Fitoalexinas

Se ha observado un aumento en los niveles de fitoalexinas en la respuesta defensiva de plantas a diversas ff. spp. de *F. oxysporum*. En garbanzo, la infección provoca un mayor contenido en fitoalexinas medicarpina y maackiaina en los exudados radicales de los genotipos resistentes, pudiendo contribuir esta característica parcialmente a la resistencia (Stevenson, 1995). También se observaron concentraciones significativamente más elevadas de estas fitoalexinas de tipo isoflavonoide tanto en plantas pre- ó post- inoculadas resistentes (Stevenson, 1997). La producción y excreción de estas fitoalexinas por garbanzo en respuesta a *F. oxysporum* no-patogénico y razas incompatibles de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, puede ser uno de los mecanismos por los que estos microorganismos actúan como inductores de resistencia frente a la FVG (Cachinero *et al.*, 2002).

1.3.3.4.- Quitinasas

Se ha constatado la inducción de actividad quitinasa asociada tanto a la resistencia específica de garbanzo a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* como a la resistencia no-huésped frente a aislados no-patogénicos de *F. oxysporum* (Cachinero *et al.*, 2002). También se ha observado un máximo de actividad a los 3 días posteriores a la inoculación, debida a dos isoformas del enzima (Saikia *et al.*, 2005).

La inducción de quitinasas de la clase III como una respuesta temprana de resistencia en el sistema garbanzo-*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (máxima expresión a 2 días tras la inoculación, con caída acusada a 8 días) ha sido también constatada mediante cDNA-AFLP (Nimbalkar *et al.*, 2006).

1.3.3.5.- β -1,3-glucanasas

Al igual que con las quitinasas, se ha observado que la inducción de actividad β -1,3-glucanasa es una reacción de defensa de garbanzo contra *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y aislados no-patogénicos de *F. oxysporum* no patogénicos (Cachinero *et al.*, 2002), siendo ésta una respuesta temprana y que engloba la expresión de varias isoformas (Saikia *et al.*, 2005). La inducción conjunta de quitinasas y β -1,3-glucanasa parece pertinente, ya que la inhibición del crecimiento de diversos hongos por ellas requiere la combinación de ambas hidrolasas (Saikia *et al.*, 2005).

1.3.3.6.- Especies reactivas de oxígeno

La producción de peroxidación lipídica y acumulación de actividades de enzimas antioxidantes [caso de ascorbato peroxidasa (APX), catalasa (CAT), guayacol-peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD)] y de diamino oxidasa (DAO; un enzima apoplástico formador de H₂O₂), ha sido estudiada en el curso del desarrollo de reacciones de compatibilidad o incompatibilidad de garbanzo a la Fusariosis Vascular causada por la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (García-Limones *et al.*, 2003). La conclusión del trabajo anterior fue que un mayor y/o más rápido incremento en el nivel de EROs, como consecuencia bien de la elevación de su tasa de producción (reflejada por el curso de acumulación de peróxidos lipídicos y de actividad DAO) o del descenso de la capacidad de destrucción de EROs (reflejado por el curso de actividades APX, CAT, GPX, GR y SOD), puede contribuir a la resistencia a la Fusariosis Vascular del garbanzo. En otros estudios menos específicos, se ha observado un aumento de la actividad peroxidasa en la interacción resistente con razas incompatibles de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y aislados no patogénicos de *F. oxysporum* (Cachinero *et al.*, 2002). También se ha observado un aumento de la expresión génica de ascorbato peroxidasa y de glutatión reductasa asociada tanto a interacciones compatibles como incompatibles de garbanzo con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, aunque en este caso no pudieron correlacionarse los niveles de transcripción con el grado de la reacción de susceptibilidad o tolerancia mostrada por una amplia gama de líneas de garbanzo (Cho y Muehlbauer, 2004).

1.3.3.7.- Proteínas de la familia plegamiento alpha/beta hidrolasa ("***Hydrolase alpha/beta fold family protein***")

La inducción de este tipo de proteína ha sido constatada, mediante cDNA-AFLP, que se produce en las fases iniciales (a 2 DAI, con caída a 8 DAI) de la respuesta de resistencia en el sistema garbanzo-*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Nimbalkar *et al.*, 2006).

1.3.4.- RESPUESTA DE ff. spp. DE *FUSARIUM OXYSPORUM* ANTE MECANISMOS DEFENSIVOS DE LA PLANTA

1.3.4.1.- Enzimas degradadoras de compuestos defensivos de la planta

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* puede adaptarse a condiciones de presencia o acumulación de compuestos tóxicos secretados por las plantas en su defensa como la α -tomatina, bien modificando el contenido de esteroides de la membrana (Défago *et al.*, 1983) ó excretando una enzima degradadora de tomatina, la tomatinasa (Lairini *et al.*, 1996). Se ha estudiado, en el sistema *F. oxysporum lycopersici* – tomate, la importancia de este enzima en la virulencia mediante mutagénesis del gen *Tom1* del hongo, que codifica a una tomatinasa. Los resultados indicaron que la enzima no es esencial para la patogénesis, pero si es requerida para una virulencia completa en tomate. Sin embargo, la anterior conclusión sobre la relativa esencialidad del enzima no es concluyente, ya que al haberse observado cuatro genes fúngicos adicionales que codifican para probables tomatinasas, los mutantes *tom 1* podrían mantener un nivel suficiente de actividad tomatinasa para seguir siendo patogénicos (Pareja-Jaime *et al.*, 2008).

1.3.4.2.- Quitina sintasa

Se ha identificado un gen en *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* que codifica una quitina sintasa de clase V (Madrid *et al.*, 2003), cuya supresión por mutagénesis insercional produce una completa pérdida de virulencia en tomate. Lo anterior indica que la síntesis de quitina es esencial para la patogénesis, bien porque constituya una respuesta frente a mecanismos activos de la planta, como la producción de quitinasas (Iseli *et al.*, 1993) ó lectinas (Ciopraga *et al.*, 1999), o porque este enzima participe en otros procesos defensivos esenciales para el hongo (Di Pietro *et al.*, 2003).

1.3.4.3.- Toxinas

Otro tipo de efectores muy importantes de la severidad de la enfermedad son las toxinas producidas por el hongo (*sensu lato*), entre las cuales el ácido fusárico ha sido demostrado como un factor de virulencia (Gaumann, 1957; Kalyanasundaram y Ventaka Ram, 1956). Las especies del género *Fusarium* producen complejas mezclas de toxinas, las cuales pueden ser útiles en otras funciones como la competencia con otros microorganismos y el dominio de su hábitat (Bell *et al.*, 2003). La toxinas producidas por *F. oxysporum* incluyen bikaverina, enniatinas, ácido fusárico, lycomarasmina, moniliformina, oxysporona, tricotecenos, zearelonas, y varias naftoquinonas y antraquinonas (Tatum *et al.*, 1985; Tatum *et al.*, 1987; Baker y Tatum, 1998; Thrane, 1989; Marasas *et al.*, 1984).

En *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* se ha estudiado la secreción de toxinas mediante la extracción de compuestos en diversos solventes, entre los cuales el éter de petróleo fue el que produjo una mayor cantidad de compuestos fitotóxicos, observándose que dos de ellos originaban marchitez y necrosis en tejido foliar, así como la reducción del crecimiento radical en semillas pregerminadas de garbanzo. (Khan *et al.*, 2004).

1.4.-MECANISMOS EN LA INTERACCIÓN PLANTA-MELOIDOGYNE SPP.

1.4.1.- SITIOS DE ALIMENTACIÓN

1.4.1.1.- Anatomía de las células gigantes

Las células gigantes, como sitios de alimentación permanente para el nematodo, resultan transformadas para servir a este fin. El citoplasma es muy denso, conteniendo un gran número de mitocondrias, plastidios y ribosomas, con aparato de Golgi y retículo endoplasmático bien desarrollados y generalmente organizados en espiral (Jones y Payne, 1978). La vacuola desaparece y da lugar a muchas pequeñas vacuolas. La captación de nutrientes del sistema vascular por el nematodo se ve favorecida por invaginaciones de la pared celular en contacto con el xilema, actuando como células de transferencia (Caillaud *et al.*, 2008). Con todas estas características, son células metabólicamente activas y que actúan como células de transferencia en la alimentación del nematodo.

1.4.1.2.- Ontogenia de las células gigantes y nódulo

En este apartado se van a tratar aspectos relacionados con la formación y evolución de los sitios de alimentación en nematodos noduladores, no incluidos en el apartado 1.3.1.

El nematodo selecciona entre cinco y siete células procambiales para inducir en cada una de ellas una célula gigante y formar el sitio de alimentación (Vanholme *et al.*, 2004). El primer signo de la inducción de las células gigantes es la activación del ciclo celular, formando células binucleadas (De Almeida Engler *et al.*, 1999). Las células elegidas son estimuladas a producir diversos ciclos de mitosis sin citoquinesis, formándose de este modo células gigantes multinucleadas; su expansión se produce por un crecimiento isotrópico y su tamaño final suele estar alrededor de 400 veces el de una célula vascular.

La fisiología y anatomía de las células gigantes no es estable a lo largo del tiempo, así en *A. thaliana* se ha observado que las células gigantes presentan un citoplasma denso y multinucleación a los 7 días posteriores a la infección (DAI); a los 14 DAI, la síntesis de ADN decrece considerablemente, pero el nódulo y la célula gigante continúan expandiéndose; y a los 21 DAI, la célula ha alcanzado su máximo tamaño, conteniendo más de un centenar de núcleos poliploides (Wiggers *et al.*, 1990). La distribución de microtúbulos y microfilamentos es un factor esencial en la formación de las células gigantes; así el citoesqueleto de actina muestra un gran número de orientaciones aleatorias de haces y "filamentos" (Favery *et al.*, 2004; de Almeida Engler *et al.*, 2004, Jammes *et al.*, 2005), así también se ha observado la implicación del citoesqueleto en la mitosis, con la paralización de los fragmoplastos en el huso mitótico, crecimiento de la membrana plasmática, tráfico de vesículas y la biogénesis de la pared celular; y el bloqueo del citoesqueleto induce la parada de desarrollo del nematodo (De Almeida Engler *et al.*, 2004). Otro factor importante es la remodelación de la pared en la formación de la célula gigante, favoreciendo el crecimiento isotrópico coordinada y extenso, viéndose favorecido por la acción de enzimas como endo- β -D-glucanasas, expansinas y xiloglucano endotransglucosilasas, y la producción de sutiles cambios en la red de pectinas embebida dentro de la pared celular, así también en la expresión ó represión de hidrolasas y proteínas estructurales (Jammes *et al.*, 2005; Caillaud *et al.*, 2008). La deposición de nuevo material en la pared, junto con la eliminación en ciertas partes de este material permite un ensanchamiento de ésta y la formación de las invaginaciones. No solo los genes mencionados anteriormente son manipulados por los nematodos en la ontogenia de las células gigantes, sino varias funciones clave de las plantas son modificadas, como el ciclo celular, comunicación mediante hormonas y síntesis de ADN entre otras, con una expresión-represión diferencial de gran cantidad de genes. A este respecto, estudios recientes de microarrays muestran un total de 3.373 genes

diferencialmente expresados en nódulos producidos por *M. incognita* en *A. thaliana*, observándose una proporción muy similar entre genes sobre-expresados y sub-expresados (Jammes *et al.*, 2005). En este caso, se ha observado que no todos los genes de una misma ruta metabólica se comportan de manera similar, produciéndose respuestas diferenciales entre genes de la misma familia, como ocurre con las acuaporinas (Caillaud *et al.*, 2008).

Para que se produzca una infección exitosa de nematodos noduladores se debe dar una supresión de la respuesta defensiva de la planta. Así, en los estudios de expresión génica global en los nódulos producidos en *A. thaliana*, el 70 % de los genes implicados en la respuesta defensiva de la planta fueron reprimidos localmente. La supresión de la respuesta defensiva de la planta incluyó efectos en genes de resistencia y en genes asociados a la resistencia (*PAD4*, *NHL3*), genes asociados a la respuesta mediada por ácido jasmónico/etileno (*EIN3*, *ERF1*, *PR4*) y genes potencialmente asociados con actividad antimicrobiana (Jammes *et al.*, 2005), no observándose cambios en la expresión de genes relacionados con la ruta del ácido salicílico (*ICS1*, *SID1*, *NPR1*, *WHY1*, *PR5*). Entre los factores de transcripción *WRKY*, 17 de los 21 genes identificados fueron reprimidos (Jammes *et al.*, 2005). También se ha determinado que el incremento de la producción de EROs en el momento de la invasión por los juveniles (12 horas posteriores a la inoculación), no era detectable a los 2 DAI, momento de la formación de las células gigantes (Melillo *et al.*, 2006).

El papel de las hormonas vegetales parece ser vital en la formación de las células gigantes y de los nódulos que las engloban. Los cambios celulares que ocurren en la formación de células gigantes, incluyendo endoreduplicación, mitosis sin citoquinesis, alargamiento celular y formación de raíces laterales, pueden ser inducidos por la aplicación de auxinas (Gheysen y Fenoll, 2002). La inducción de los transportadores de auxinas *AUX1* y *AtAUX4/LAX3* se ha evidenciado en diferentes estudios de microarray (Caillaud *et al.*, 2008), habiéndose constatado también incrementos de esta hormona por la activación de ciertos promotores como *DR5* en *A. thaliana* (Karczmarek *et al.*, 2004) y *GH3* en *Trifolium repens* L. (Hutangara *et al.*, 1999). Los nematodos podrían manipular localmente los niveles de auxinas, interfiriendo en su transporte polar, mediante la inducción de la ruta de los flavonoides, como se ha descrito también en *Rhizobium leguminosarum* (Frank) Frank (Hutangara *et al.*, 1999; Mathesius *et al.*, 1998). Los nematodos secretan en las células gigantes corismato mutasa, un enzima de la ruta del shikimato y, por tanto, implicado en la síntesis de flavonoides (Lambert *et al.*, 1999). También podrían afectar a la respuesta auxínica de la planta otros mecanismos alternativos, como la liberación de auxinas conjugadas, el incremento de la sensibilidad celular a auxinas y la posible producción de compuestos con actividad similar a auxinas (Goverse *et al.*, 2000). Respecto a otras hormonas, el etileno (Gheysen y Fenoll, 2002) y citoquininas también pueden estar involucradas en el desarrollo de los sitios de alimentación. Sobre todo en el caso estas

últimas, por su papel en conjunción con las auxinas en la división celular (Laureys *et al.*, 1998; Valente *et al.*, 1998; Riou-Khamlichi *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1996). Elevados niveles de citoquininas, endógenas ó exógenas, se correlacionan con la susceptibilidad de las plantas a los nematodos noduladores, habiéndose observado la producción de citoquininas biológicamente activas por *Meloidogyne* spp. (Bird y Loveys, 1980; Dropkin *et al.*, 1969; Kochba y Samish, 1971; 1972). Sin embargo, sólo algunos componentes de las rutas metabólicas del ácido abscísico (ABA) y las giberelinas han sido observados en la interacción de plantas con nematodos, no estando muy claro el papel de estas fitohormonas en la formación de las células gigantes (Caillaud *et al.*, 2008). La proliferación e hipertrofia de las células del córtex y de células cercanas al periciclo, da lugar a la formación de nódulos alrededor de los sitios de alimentación de los nematodos, siendo una posible teoría de su ontogenia por la obstrucción del transporte de auxinas en la raíz.

El papel de las hormonas se puede integrar con otras teorías en la formación de las células gigantes. En un principio, las hormonas estimularían el ciclo celular y los cambios en la pared, la amplificación del genoma implicaría un aumento del metabolismo que, junto con la succión de contenido citoplasmático (similar a una situación de estrés hídrico), provocaría las características de células de transferencia. Las hormonas y la succión parcial del contenido citoplasmático, explicarían la tendencia a la mitosis en las células gigantes, a diferencia de otras células producidas en otros sitios de alimentación por otros nematodos sedentarios, los sincitios, en los que también se produce una endoreduplicación del ADN, pero expandiéndose la célula gigante (parasitada por el nematodo) por la disolución de paredes celulares anejas a la célula parasitada por el nematodo. Las características similares en la ontogénia de las células gigantes han sido observadas en el endospermo de maíz, en el que la mitosis tiene una mayor sensibilidad al estrés hídrico (disminuyendo las divisiones celulares) que la endo-reduplicación (Setter y Flannigan, 2001). Por las necesidades hídricas inducidas por la succión parcial del citoplasma por el nematodo en las células gigantes, se produce un aumento de la síntesis de ATPasas y acuaporinas que pueden paliar en parte este estrés hídrico, observándose también una mayor turgencia en las células gigantes que en los sincitios mencionados anteriormente, a pesar que no se ha medido el potencial hídrico en éstas (Gheysen y Fenoll, 2002). También se observan células gigantes similares en los sitios de alimentación inducidos por otros tipos de nematodos, tanto en el caso de otros endoparásitos sedentarios, como *Meloidodera* spp. (que inducen una célula gigante uninucleada), como en el de ectoparásitos migratorios, como *Xiphinema* spp. y *Longidorus* spp. (que se alimentan prolongadamente en los ápices radicales, produciendo células gigantes y estructuras similares a los sitios de alimentación de los nematodos noduladores, sin penetrar los tejidos de la raíz, siendo el único contacto con estas células su largo estilete (Wyss *et al.*, 1988; Griffiths *et al.*, 1984). Aunque

hay que tener en cuenta el papel de otras proteínas secretadas por el nematodo que pueden modificar el esquema general anterior.

Sin embargo, a pesar de los posibles mecanismos comunes a todas las especies del género *Meloidogyne*, se ha observado mediante estudios histopatológicos que el tamaño de los nódulos y el número de núcleos inducidos en las células gigantes son dependientes de la especie de nematodo (Figs. 1.3 y 1.4), mientras que el número y tamaño de las células gigantes parece estar relacionado con la planta huésped (Vovlas *et al.*, 2005). Estas diferencias están actualmente poco estudiadas desde el punto de vista molecular. Entre las posibles causas se podría mencionar compuestos diferenciales de secreción entre las diferentes especies del género *Meloidogyne* y *M. artiellia*, por sus características, podría ser un buen nematodo para constatar la diferencia entre especies.

Muchos aspectos de la formación y mantenimiento de las células gigantes quedan oscuros a pesar de las excelentes revisiones en las que se puede obtener más información (Gheysen y Fenoll, 2002; Caillaud *et al.*, 2008; Davis y Mitchum, 2005; Zinov'eva *et al.*, 2004). La introducción de microarrays para un estudio global en tejidos enriquecidos con células gigantes (Jammes *et al.*, 2005; Hammes *et al.*, 2005; Bar-Or *et al.*, 2005) está permitiendo afianzar desde un punto de vista más global la formación de las células gigantes. La introducción de la microcaptura de células mediada por láser (LCM) permitirá una mejor comprensión de la formación de las células gigantes (Ramsay *et al.*, 2004; 2006), al eliminar la posible contaminación de células que no son afectadas localmente por el nematodo. Otro aspecto a tener en cuenta son las secreciones que introduce el nematodo dentro de las células eligidas para formar el sitio de alimentación, las cuales pueden tener un papel importante, aunque actualmente solo se conoce una parte de ellas (véase más adelante).

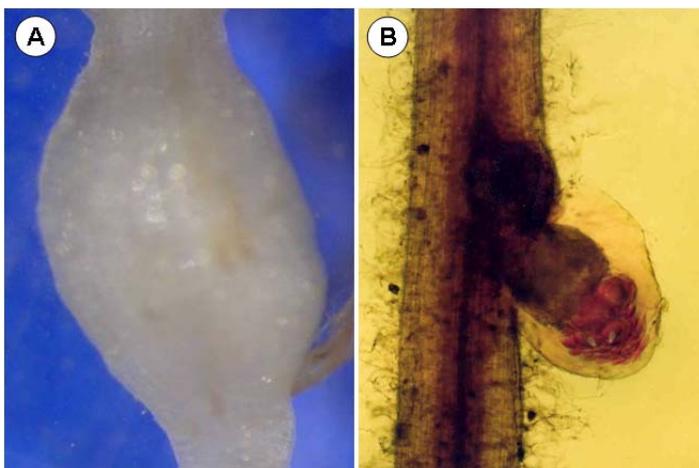


Figura 1.3.- Nódulos sobre raíces de la línea de garbanzo "UC27" infectado por nematodos noduladores: A, *Meloidogyne incognita* y B, *Meloidogyne artiellia*. Se puede observar la diferencia de nodulación entre ambas y como la hembra en *M. artiellia* sobresale de la raíz. (Vovlas *et al.*, 2005).

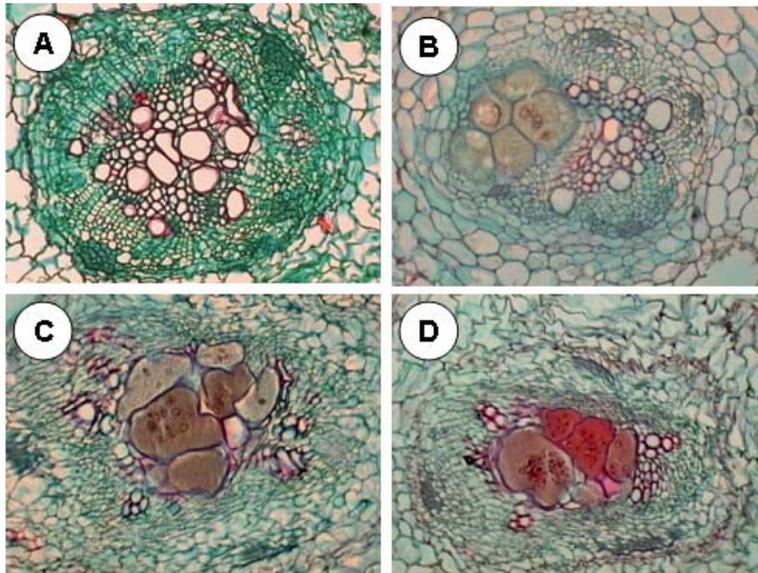


Figura 1.4.- Diferentes sitios de alimentación sobre raíces de la línea de garbanzo "UC27". A, Control; B, *Meloidogyne artiellia*; C, *Meloidogyne incognita*; D, *Meloidogyne javanica*. (Vovlas *et al.*, 2005).

1.4.2.- SECRECIONES DEL NEMATODO

1.4.2.1.- Papel en el parasitismo

Se considera que las secreciones de los nematodos noduladores de raíces contienen los efectores del parasitismo y los elementos de señalización implicados en la interacción con la planta. Las secreciones proteicas de la glándulas faríngeas/esofágicas (una dorsal y dos subventrales), inyectadas en las células de la planta huésped a través del estilete del nematodo, se cree que son las que desempeñan un papel principal en la inducción de la formación del sitio de alimentación y en el parasitismo (Davis *et al.*, 2004). Aunque las glándulas faríngeas muestran cambios de contenido y actividad a lo largo de todo el ciclo parasítico, las subventrales (Fig. 1.5) están más desarrolladas y presentan mayor actividad en los juveniles J2, suponiéndose por ello que participan principalmente en las fases de penetración y migración a través de la raíz y en las primeras fases de la interacción. A su vez, la glándula dorsal aumenta de tamaño y es más activa durante la formación de las células gigantes y durante la fase sedentaria del nematodo, por lo que parece ser dominante durante este estadio del parasitismo. Además de las anteriores, otras secreciones pueden ser también importantes en la ontogenia de los sitios de alimentación y en el parasitismo, como son las producidas por los anfidios (Semblat *et al.*, 2001), la cutícula y por los diversos orificios corporales del nematodo (Caillaud *et al.*, 2008).

Las secreciones de las glándulas dorsal y subventrales están compuestas de gránulos, los cuales en el caso de la glándula dorsal son transportados a través de extensiones citoplasmáticas y son inyectados en la faringe, a través de una pequeña vesícula, cerca de la base del estilete, mientras que la secreción de las glándulas subventrales desemboca inmediatamente después del bulbo medio (la cámara muscular de bombeo en el esófago). La glándula dorsal también participa en la formación del “tubo de alimentación”, el cual, es una estructura proteica adherida al estilete durante el periodo de alimentación, cuyas posibles funciones son el filtrado de los contenidos celulares (Böckenhoff y Grundler, 1994) y/o el acceso a una mayor área del citoplasma (Hussey y Grundler, 1998).

El estudio de estas secreciones es dificultoso, ya que la toma de muestra requiere la manipulación de las hembras de *Meloidogyne* en el interior de la raíz. Pese a ello, mediante aproximaciones de proteómica y transcriptómica se ha podido concluir que, al menos 60 proteínas diferentes son secretadas durante las fases de parasitismo (Jaubert *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003). Recientemente, con una aproximación de identificación directa del secretoma mediante nanoLC ESI MS/MS se han podido identificar hasta 486 proteínas en juveniles de *M. incognita* (Bellafiore *et al.*, 2008). La temporalidad y localización glandular de muchas de las proteínas secretadas por los nematodos han sido estudiadas mediante inmunolocalización. La cantidad de proteínas obtenidas y la escasa homología de las secuencias deducidas en los estudios génicos con las de otras especies, ha dificultado su identificación y estudio, conociéndose sólo parcialmente algunas de estas proteínas. El estudio de bases de datos de ESTs de nematodos fitoparásitos con nuevas herramientas informáticas ha permitido unir secuencias de diferentes estadios en el desarrollo de nematodos, y ensamblar y buscar posibles péptidos con señales de secreción en las secuencias codificantes (ORF) de estos ESTs (Roze *et al.*, 2008). La implantación de técnicas de silenciamiento génico mediante ARNi y la transformación de plantas que expresen constitutivamente estas proteínas, permitirán un mejor estudio de las proteínas sin homología en las bases de datos y posible identificación de su función (Fanelli *et al.*, 2005, Huang *et al.*, 2006b, Fleming *et al.*, 2007).

La similitud entre algunos genes del parasitismo de nematodos y bacterias, ha sugerido que algunos de estos genes pueden haberse adquirido mediante transferencia horizontal de genes de bacterias (Scholl y Bird, 2005; Ledger *et al.*, 2006).

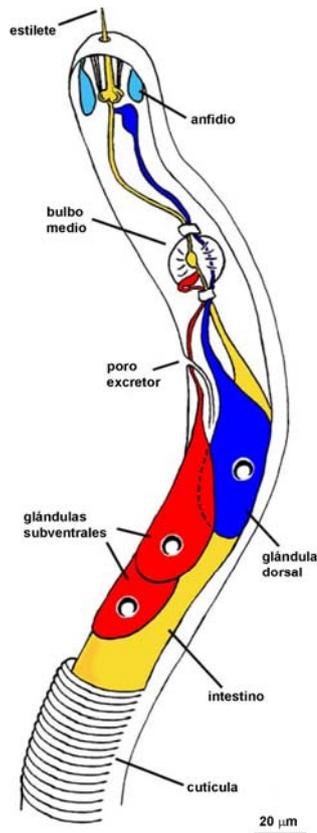


Figura 1.5.- Representación esquemática de la parte anterior de un nematodo sedentario en el estadio J2. Los órganos más importantes son indicados en el dibujo. (Vanholme *et al.*, 2004)

1.4.2.2. Genes y proteínas de parasitismo

-Secreciones de las glándulas faríngeas

Ante las dificultades mostradas por los estudios de genética clásica o directa, los mayores avances en este campo se han obtenido utilizando aproximaciones de genética reversa y caracterización de ESTs. En general, las investigaciones se han centrado en las secreciones de las glándulas faríngeas y en los ESTs expresados diferencialmente en ellas en relación a otros tejidos o durante diferentes estadios del ciclo vital. Buena parte de los genes de parasitismo descubiertos han resultado ser genes “pioneros” sin similitud con otras secuencias depositadas en las bases de datos, por lo que no han podido ser identificados a nivel funcional. Dentro de los genes y proteínas (proteínas del parasitismo) que sí han podido ser caracterizados se pueden diferenciar dos grupos: 1) el que engloba a una serie de proteínas modificadoras de la pared celular de plantas, cuyo papel en el parasitismo se puede considerar que está bien establecido, y 2) el del resto, que incluye una serie de posibles genes de parasitismo para cuyas proteínas codificadas se proponen posibles acciones en relación con el proceso de parasitismo.

Entre las proteínas modificadoras de la pared celular están: β -1, 4-endoglucanasas (celulasas), pectato liasa, poligalacturonasa, β -1, 4-endoxilanasas, proteínas de unión a celulosa y quitinasa (Vanholme *et al.*, 2004; Caillaud *et al.*, 2008). Estas proteínas han sido localizadas principalmente en las glándulas subventrales y poseen un papel primordial en la penetración y migración por la raíz en las etapas iniciales de la interacción.

Dentro del grupo de productos de posibles genes de parasitismo sin función asignada se pueden incluir diversas proteínas, tales como proteínas del tipo de las alergénicas del veneno (“*venom allergen like protein*”), de tipo RanBPM (de “*Ran-Binding Protein in the Microtubule organising centre*”), calreticulina y proteínas de la familias 14-3-3 y SPX-RAL-2; al péptido 16D10, y a enzimas como corismato mutasa y una fosfatasa ácida (Vanholme *et al.*, 2004) (Tabla 3). De forma más o menos especulativa, para algunas de las anteriores proteínas se han propuesto funciones durante el parasitismo, como las que seguidamente se comentan. La calreticulina puede estar implicada en la señalización por calcio y en la regulación del ciclo celular (Borisjuk *et al.*, 1998; Ghiran *et al.*, 2003) durante la formación de las células gigantes. Las proteínas 14-3-3 en plantas regulan la H⁺-ATPasa en respuesta a infecciones fúngicas, habiéndose especulado que las secretadas por nematodos podrían desempeñar un papel similar durante el desarrollo del nódulo (Wienkoop y Saalbach, 2003). La expresión en raíces de tabaco del péptido 16D10 produce una estimulación del crecimiento radical y la proliferación de raíces laterales, interaccionando con dos probables factores de transcripción de tipo SCARECROW de plantas (Huang *et al.*, 2006), dato este último que abre la posibilidad de que algunos efectores del parasitismo tengan como diana factores de transcripción del huésped. La enzima corismato mutasa, que es secretada en todas las fases del parasitismo (excepto huevos) por *M. incognita* (Huang *et al.*, 2005), parece involucrada tanto en la formación del sitio de alimentación como en la disminución efectiva de las defensas de la planta, de acuerdo con un “modelo de competición por corismato” (Fig. 1.6) (Bekal *et al.*, 2003; Doyle y Lambert, 2003). Según este modelo, la inyección en el citoplasma de la célula vegetal de la enzima del nematodo redireccionaría los intermedios de la ruta endógena del shikimato, que se realiza en plastidios, hacia el citosol, para la producción de aminoácidos aromáticos de cara a la nutrición del parásito, con el correspondiente déficit en la producción de compuestos hormonales (IAA, SA) y/o compuestos defensivos para la planta (p.ej. fitoalexinas derivadas de fenilalanina por la ruta fenilpropanoide) (Dewick, 1998; Wildermuth *et al.*, 2001).

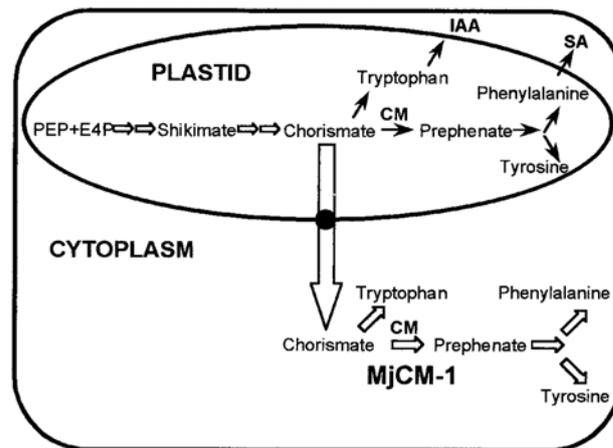


Figura 1.6.- Modelo de competición por corismato mediante compartimentalización al inyectar el nematodo el enzima corismato mutasa en el citoplasma. Diagrama de una célula vegetal representando la localización subcelular de la ruta del shikimato y la ruta de la fenilalanina y tirosina. Eritrosa 4-fosfato (E4P), fosfoenolpiruvato (PEP), y corismato mutasa (CM). Las flechas vacías indican el flujo de metabolitos a través de la ruta del shikimato cuando MjCM-1 (*Meloidogyne javanica* corismato mutasa 1) es inyectada por el nematodo en el citoplasma de la célula vegetal (adaptado de Doyle y Lambert, 2003).

Algunos de los genes que no tienen homología con las bases de datos presentan señales de localización nuclear (Huang *et al.*, 2003; Roze *et al.*, 2008), con un comportamiento similar a genes de parasitismo observados en otros nematodos fitoparásitos como *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952 (Elling *et al.*, 2007) o en el nematodo parásito de animales, *Trichinella spiralis* Owen, 1835 (Yao y Jasmer, 2001).

Se han observado similitudes al comparar posibles genes de parasitismo de *Meloidogyne* spp. con los de otros nematodos fitopatógenos sedentarios que producen sitios de alimentación, como es el caso de los formadores de quistes que inducen sincitios (géneros *Heterodera* y *Globodera* principalmente), entre estos genes se encuentra la corismato mutasa. Se puede deducir que algunos de los mecanismos en la formación de ambos sitios de alimentación (sincitios ó células gigantes) son comunes.

-Otros órganos de secreción

Otras secreciones importantes en el desarrollo del parasitismo pueden ser las producidas por la cutícula, los anfidios, el sistema excretor/secretor y las glándulas rectales (Vanholme *et al.*, 2004). Se supone que la función de estos órganos pueda cambiar de acuerdo con el estadio parasítico dentro del ciclo vital del nematodo (Jones *et al.*, 1994).

Los anfidios secretan proteínas con un papel primordial en las primeras etapas del reconocimiento entre huésped y parásito (Perry, 2001; Fioretti *et al.*, 2002), o con posible función como productos de genes de avirulencia, como el gen *map-1* en *M. incognita* (Semblat *et al.*, 2001).

El sistema excretor/secretor secreta proteínas y glicoproteínas formadoras del glicocalix, capa proteica que recubre la cutícula y facilita el movimiento a través del suelo (Bird *et al.*, 1988,) y protectoras contra la respuesta defensiva de la planta (Robertson *et al.*, 2000; Prior *et al.*, 2001; Roze *et al.*, 2008).

Recientemente, se han realizado los primeros esbozos de las secuenciaciones de los genomas de *M. incognita* y *M. hapla*, dos de las especies más importantes de nematodos noduladores, en las que se ha podido corroborar las proteínas anteriores, así como algunas nuevas de las que no se tenía conocimiento (Abad *et al.*, 2008; Opperman *et al.*, 2008). Se ha observado la compacidad de los genes en el genoma y su menor tamaño en comparación con *Cenorhabditis elegans*, así como el número de proteínas de secreción, con un número de 832 posibles proteínas en *M. hapla* (Opperman *et al.*, 2008), aunque algunas de ellas no puedan estar implicadas directamente en la patogénesis. Estos primeros esbozos de ambos genomas en nematodos parásitos de plantas, junto con los nematodos de vida libre *C. elegans* (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), *C. briggsae* (Stein *et al.*, 2003), *Pristionchus pacificus* (Dieterich *et al.*, 2008) y el esbozo de secuenciación del genoma del nematodo parásito de humanos, *Brugia malayi* (Ghedini *et al.*, 2007) pueden ayudar a la comprensión y mejor estudio de los nematodos parásitos de plantas.

TABLA 1.3.- Algunos de los genes más importantes implicados en la interacción planta-patógeno en el género *Meloidogyne*.

Genes implicados en la interacción planta patógeno en el género <i>Meloidogyne</i> ^a					
Entrada Gene Bank	Nombre	Producto génico	Localización ^b	Especie ^c	Referencia
Proteínas que modifican la pared celular					
AF100549	<i>Mi-eng1</i>	B-1,4-endoglucanasa	GSV	<i>M. incognita</i>	Rosso <i>et al.</i> , 1999
AY098646	<i>Mi-pg-1</i>	Poligalacturonasa	GSV	<i>M. incognita</i>	Jaubert <i>et al.</i> , 2002b
AF224342	<i>Mi-xyf-1</i>	B-1,4-endoxilanasas	GSV	<i>M. incognita</i>	Dautova <i>et al.</i> , 2001
AF049139	<i>Mi-cbp-1</i>	Proteína de unión a celulosa	GSV	<i>M. incognita</i>	Ding <i>et al.</i> , 1998
AF455757	<i>Mj-pef-1</i>	Pectato liasa	GF	<i>M. javanica</i>	Doyle y Lambert, 2002
Protección frente a la respuesta defensiva de la planta					
-	<i>MCO1225</i>	Proteína de unión a ácidos grasos y retinol	E	<i>M. chitwoodi</i>	Roze <i>et al.</i> , 2008
Probables genes de parasitismo					
AY134440	<i>msp21</i>	Fosfatasa ácida	GSV	<i>M. incognita</i>	Huang <i>et al.</i> , 2003
AF095949	<i>Mj-cm-1</i>	Corismato mutasa	GSV	<i>M. javanica</i>	Lambert <i>et al.</i> , 1999; Huang <i>et al.</i> , 2005
AY426718	<i>Mi-14-3-3b</i>	Proteína 14-3-3	GD	<i>M. incognita</i>	Jaubert <i>et al.</i> , 2004
DQ087264	16D10	Factor de transcripción	Probable gen de parasitismo	<i>M. incognita</i>	Huang <i>et al.</i> , 2006 ^a
AY142117	<i>Msp34</i>	"sodium/calcium/potassium exchanger"	GSV	<i>M. incognita</i>	Huang <i>et al.</i> , 2003
AF402771	<i>Mi-crt</i>	Calreticulina	GSV	<i>M. incognita</i>	Jaubert <i>et al.</i> , 2002a
AF013289	<i>Mi-msp-1</i>	"Venom allergen like protein"	GSV	<i>M. incognita</i>	Ding <i>et al.</i> , 2000
-	-	SXP/RAL-2	n. d. (prob. E y A)	<i>M. chitwoodi</i>	Roze <i>et al.</i> , 2008

^a: Sólo se han considerado genes expresados en órganos de secreción (incluyendo epidermis) y codificando para proteínas determinadas experimentalmente para ser secretadas ó conteniendo un péptido señal para la secreción. Genes pioneros (sin similitud con secuencias presentes en bases de datos) no han sido considerados (adaptada de Vanholme *et al.*, 2004 + revisión personal).

^b: GF, glándulas faringeads; GSV, glándula sub-ventral; GD, glándula dorsal; E, epidermis; A, anfidios.

^c: observados en otras especies del género *Meloidogyne*.

1.4.2.3.- Señales no-proteicas

Los nematodos formadores de nódulos secretan conjugados de auxinas y citoquininas que pueden interferir en el balance hormonal de la célula vegetal (De Meutter *et al.*, 2003). Muchos de los cambios producidos en la raíz durante la infección del nematodo como: hipertrofia, hiperplasia, inducción de raíces laterales, cariocinesis sin citocinesis y la rotura de paredes celulares, pueden ser parcialmente inducidos mediante la aplicación de auxinas endógenas (Giebel, 1974; Fan y Machlachlan, 1967), como se ha mencionado anteriormente.

La presencia de compuestos inferiores a 3 KDa en las secreciones de juveniles de *Globodera rostochiensis* co-estimulan la proliferación de protoplastos de hoja de tabaco en la presencia de

análogos sintéticos de auxinas y citoquininas (Goverse *et al.*, 1999). Estos compuestos mitogénicos parecen ser co-responsables de la formación del sitio de alimentación inducido por el nematodo (Vanholme *et al.*, 2004). Muchas de estas sustancias no-proteicas aún no caracterizadas podrían tener un papel importante en la formación de los sitios de alimentación.

1.4.3.- EFECTO SISTÉMICO DE LA INTERACCIÓN PLANTA-NEMATODO SOBRE LAS FUSARIOSIS VASCULARES

Los efectos sobre la resistencia a la Fusariosis Vascular producidos por la interacción planta-nematodo han sido bien documentados desde el punto de vista agronómico, pero no así en los efectos bioquímicos ó moleculares, en los que solo se han estudiado algunos aspectos parciales que se van a enumerar en los siguientes párrafos.

La infección por nematodos formadores de nódulos tiene efectos sistémicos en la fisiología de la planta, algunos de ellos observables claramente, como la disminución de la tasa fotosintética (Melakeberhan *et al.*, 1986) u otros efectos producidos por la obstrucción de los haces vasculares en el eje de la raíz al crecer las células gigantes y producirse la formación de los tejidos anexos del nódulo.

Se ha descrito que la infección de las plantas por nematodos noduladores origina frecuentemente una disminución de su respuesta defensiva contra patógenos fúngicos vasculares. Así, se ha observado un mayor crecimiento de las hifas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *nicotianae* (Johns.) Snyder & Hansen por encima de la zona infectada por nematodos en tabaco (Melendez y Powell, 1967) y en tomate (Orion y Hoestra, 1974; Webster, 1977). También, la inoculación de tallos de plantas infectadas por *M. incognita* con una suspensión de conidias de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* indujo un aumento de la severidad de la enfermedad, e incluso una pérdida de resistencia al aumentar el número de nematodos inoculados (Hillocks, 1986).

Mediante la técnica de "split-root" se ha observado que la inoculación conjunta de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* y *M. incognita* en el suelo en una de las partes de la raíz aumentaba la severidad de la enfermedad (Hillocks, 1986, Harris y Ferris, 1991c), mientras que al inocular ambos patógenos en partes radicales separadas no se observaba ningún efecto sistémico (Harris y Ferris, 1991c).

La disminución de la síntesis de compuestos defensivos como las fitoalexinas, por la infección con nematodos noduladores, muestra cierta divergencia dependiendo del sistema utilizado para el estudio. En la mayoría de los estudios se observan disminuciones de fitoalexinas, como en algodón

(Bell, 1969), alfalfa (Khan y Minton, 1979), y *Cajanus cajan*. En este último caso, la disminución era más acusada en el cultivar resistente, provocando la pérdida de resistencia (Marley y Hillocks, 1993); mientras que en otros estudios en algodón no se produjo ningún efecto en la acumulación de sesquiterpenoides por la infección de *M. incognita* (Hillocks, 1985).

El desarrollo cronológico de las interacciones es un factor muy importante en el aumento de la severidad de la infección por *F. oxysporum* f. spp. en plantas infectadas por *Meloidogyne* spp. Así, la Fusariosis Vascular del tabaco resultó más severa cuando plantas de cultivares resistentes fueron inoculadas con *M. incognita*, *M. arenaria*, ó *M. javanica* 2 ó 4 semanas antes de la inoculación con *F. oxysporum* f. sp. *nicotianae*, que cuando se efectuó la inoculación de forma simultánea con ambos patógenos (Porter y Powell, 1967): Resultados similares se han descrito en la interacción triple de *M. javanica* y *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E. F. Smith) Snyder & Hansen y *Vigna unguiculata* (Harris y Ferris, 1991c).

Las células gigantes, por su elevada actividad metabólica y alto contenido en nutrientes, podrían constituir polos de atracción para ciertos patógenos, principalmente vasculares. Sin embargo, no hay evidencia de que sean penetradas por estos patógenos para alcanzar el cilindro vascular, aunque sí puedan serlo con posterioridad, una vez que el hongo se ha establecido en el xilema. Así, estudios histopatológicos en cultivares de tomate, susceptible y resistente a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, inoculados con *M. javanica* 3 semanas antes a la inoculación con el hongo, mostraron que éste no las penetraba inicialmente para alcanzar el xilema. La penetración de las células gigantes se producía con posterioridad (1 semana más tarde), momento en el que se podían apreciar cambios ultraestructurales en las células gigantes y el hongo estaba creciendo por el xilema. Todos estos efectos se repiten en el cultivar resistente que pierde la resistencia, con la excepción de que se retrasan, (Fattah y Webster, 1983).

La pérdida de resistencia y aumento de severidad en algunos cultivares podría deberse a la disminución de la respuesta defensiva exterior a las células gigantes. Este efecto sistémico podría estar correlacionado con la obstrucción de algunas hormonas vegetales en la formación del sitio de alimentación y la deformación de los haces vasculares alrededor de éste, ó los sumideros metabólicos que constituyen las células gigantes, aunque hay que mencionar que el efecto de la disrupción de las hormonas en la raíz es temporal. También se ha observado que la pérdida de la resistencia en algunos cultivares se ve ampliamente favorecida por la diferencia en la inoculación temporal y la forma/densidad de inóculo aplicada.

OBJETIVOS

Como se ha indicado anteriormente, las Fusariosis Vasculares causadas por diversas formas especiales de *F. oxysporum* constituyen enfermedades de gran interés en la agricultura dado su amplísima distribución a nivel mundial y el alto número de especies vegetales de importancia económica que las padecen. Sin embargo, los mecanismos de patogenicidad y de resistencia que operan en estos sistemas siguen siendo, en general, bastante desconocidos y el control de muchas Fusariosis Vasculares constituye, aún en la actualidad, un problema sin resolver. La Fusariosis Vascular de garbanzo causada por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* es una de las principales enfermedades de esta leguminosa en todas las zonas donde se cultiva. Las medidas de lucha contra la Fusariosis Vascular del garbanzo son: el adelanto de la fecha de siembra, labores profundas durante el periodo estival, tratamiento de las semillas con fungicidas protectores, sistémicos o sus mezclas, o con antagonistas fúngicos y bacterianos. Sin embargo, la estrategia de control más práctica y económicamente eficiente es la utilización de cultivares resistentes, cuya eficiencia se ve amenazada por la variabilidad patogénica de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y la potencial coinfección de la planta por nematodos fitoparásitos que pueden interactuar anulando la resistencia raza-específica al hongo. En recientes investigaciones en nuestro laboratorio, la infección de garbanzo con *M. artiellia* incrementó la severidad de la reacción a la infección con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 en los cultivares parcialmente resistentes a dicha raza, independientemente de la densidad de inóculo del hongo utilizada. Por el contrario, en los cultivares con resistencia completa a la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* la influencia de la coinfección con *M. artiellia* varió según el genotipo vegetal y la densidad de inóculo del hongo. Así, la coinfección con los dos patógenos anuló la resistencia completa de 'CA336.14.3.0' al hongo, independientemente de la densidad de inóculo de éste y de la población del nematodo utilizada. Sin embargo, en 'UC 27' dicha anulación de la resistencia completa sólo tuvo lugar con la mayor de las densidades de inóculo estudiadas. Finalmente, ninguna de las densidades de inóculo de *M. artiellia* y *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 utilizadas anuló la resistencia completa de 'ICC 14216K' a dicha raza.

Por ello, esta Tesis Doctoral se propuso analizar los posibles mecanismos involucrados en la pérdida/mantenimiento de la resistencia a la Fusariosis Vascular de garbanzo considerando los diversos tipos de escenarios posibles, como la interacción con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5, *M. artiellia*, y la combinación de ambos, tanto en cultivares con resistencia inestable a la Fusariosis

Vascular ('CA336.14.3.0') como con resistencia estable ('ICC14216K'). De cara al estudio de dichos mecanismos, se seleccionaron dos aproximaciones, una de análisis proteómico (un método amplio de investigación, en el que en principio no se hace ninguna restricción respecto a las posibles respuestas sometidas a estudio) y otra de análisis de la expresión génica (circunscrito a la expresión de una selección de genes relacionados con la patogénesis).

El gran desarrollo de la proteómica en los últimos años ha sido originado por varios motivos, como la innovación en las técnicas de extracción, separación y tinción de proteínas, los grandes avances introducidos en la técnica de espectrometría de masas y el aumento del número de secuencias disponibles en las diversas bases de datos para la identificación de proteínas. La proteómica tiene como principal ventaja que permite el estudio global de las proteínas (esto es, del proteoma) en un momento y condiciones experimentales determinadas, siendo ésta una información más próxima a la actividad celular que la que puedan reflejar los estudios de transcriptómica, dado el carácter inmediato de ejecutores de la información génica que tienen las proteínas.

Los estudios de expresión génica se han realizado utilizando la técnica PCR a tiempo real, elegida por su alta sensibilidad y, por tanto, por requerir poca cantidad de muestra, habiéndose centrado en dos grupos de genes, uno de genes relacionados con la ruta fenilpropanoide y otro funcionalmente menos homogéneo de genes diversos relacionados con la patogénesis. La selección del primer grupo está justificada por la implicación de estos genes en la biosíntesis de las fitoalexinas isoflavonoides de garbanzo medicarpina y maackiaina (Stevenson, 1995; Stevenson, 1997; Cachinero *et al.*, 2002) y por la posible interferencia que en esta ruta puede ejercer la infección de nematodos, dado el carácter de proteína de parasitismo que tiene en éstos la enzima corismato mutasa (una enzima de la ruta del shikimato, previa a la ruta fenilpropanoide) (Doyle y Lambert, 2003). A su vez, dentro del segundo grupo, la selección se hizo con el objetivo de poder evidenciar mecanismos apuntados por los resultados de los estudios de proteómica (caso, por ejemplo, de quitinasa clase I y catalasa).

Ambos tipos de estudios se han desarrollado en diferentes periodos temporales y con muestreos tanto generales como selectivos (nódulos, microdissección por láser) de tejidos infectados, intentando tanto solapar al máximo la posible respuesta de la planta a los dos patógenos implicados en la interacción, como concentrar todo lo posible esta respuesta al objeto de poder percibirla de forma más precisa.

De acuerdo con lo anterior, el objetivo general planteado para esta Tesis Doctoral fue el de determinar los mecanismos moleculares que subyacen en la pérdida/mantenimiento de la resistencia a la Fusariosis Vascular del garbanzo que se produce cuando las plantas están

coinfectadas por el nematodo nodulador de cereales y leguminosas, *M. artiellia*. De forma más concreta, los objetivos específicos incluyen:

1) Analizar comparativamente los perfiles proteicos expresados en raíces de garbanzo de genotipos seleccionados no infectados o infectados por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y/o *M. artiellia*, en diferentes periodos de tiempo, así como en diferentes muestreos.

2) Determinar la posibilidad de alguna respuesta sistémica en la interacción de ambos patógenos en la planta, principalmente en el cultivar que pierde la resistencia en la coinfección de ambos patógenos, mediante técnicas de “*split-root*”.

3) Analizar la expresión de genes relacionados con la patogénesis en la Fusariosis Vascular del garbanzo utilizando diversos tejidos radicales en un curso de infección y técnicas de microdissección que permitan estudiar diferencialmente las células gigantes inducidas por el nematodo y el tejido cortical para evitar diluciones de la respuesta en el caso de la respuesta producida por el nematodo.

CAPÍTULO II: ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS INTERACCIONES DE *MELOIDOGYNE ARTIELLIA* Y *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CICERIS* RAZA 5 CON GARBANZO.

2.1.- INTRODUCCIÓN

En investigaciones recientes en nuestro laboratorio, sobre la interacción entre *M. artiellia* y la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* utilizando cultivares con resistencia completa al hongo, los resultados indicaron que la influencia del nematodo sobre la resistencia de la planta varió según el genotipo vegetal y la densidad de inóculo del hongo. Así, la coinfección por los dos patógenos anuló la resistencia completa de 'CA336.14.3.0' al hongo, independientemente de la densidad de inóculo de éste y de la población del nematodo utilizado (Castillo *et al.*, 2003). Sin embargo, en 'ICC14216K' la resistencia completa se mantuvo estable independientemente de las densidades de inóculo y la población del nematodo estudiada. En consecuencia, estos datos confirman la complejidad de las interacciones entre nematodos fitoparásitos y hongos fitopatógenos, citada anteriormente en la introducción general de esta Tesis. Los mecanismos que pueden estar implicados en las interacciones referidas, aunque son todavía poco conocidos, parecen ser más de naturaleza biológica y/o bioquímica que mecánica. A pesar de que la interacción entre los dos patógenos puede comenzar en la rizosfera, donde los exudados radicales de plantas infectadas por nematodos pueden verse alterados, la fase más importante de la misma se produce tras la penetración de ambos patógenos en la planta huésped (Khan, 1993). En algunas interacciones entre nematodos y hongos fitopatógenos se ha demostrado que el parasitismo por el nematodo reduce o bloquea la síntesis de compuestos defensivos de la planta frente a la infección por el hongo; p.ej. alteraciones en la producción de rishitina en raíces y tilosas en tallos en la interacción *Meloidogyne-Fusarium* en plantas de tomate (Noguera *et al.*, 1982), y reducción de la síntesis de cajanol, fitoalexina implicada en la respuesta resistente de *Cajanus cajan* a *Fusarium udum*, por *M. incognita* y *M. javanica* (Marley y Hillocks, 1994).

Los análisis proteómicos se han convertido en un potente instrumento para la caracterización funcional de respuestas defensivas de plantas, aunque actualmente la mayoría de estudios en esta línea se siguen realizando en el ámbito de la transcriptómica (microarrays, etc.), debido a la mayor facilidad de extracción y la posibilidad de amplificación de la respuesta. Sin embargo, las proteínas y no los transcritos, son las responsables más directas de los distintos fenotipos en plantas ó tejidos.

Así, en muchos casos, no suelen coincidir los estudios proteómicos y los de expresión génica (genes específicos ó microarrays), pudiendo no estar correlacionado el número de transcritos de un gen con la cantidad de proteína expresada. Las modificaciones post-transcripcionales solo se pueden determinar a través del estudio de proteínas, y actualmente se está llegando al nivel de experimentos a gran escala en todo el proteoma con técnicas como el enriquecimiento cromatográfico, tinciones especiales, mejoras en la espectrometría de masas, etc. Los estudios proteómicos tienen ciertas limitaciones, por ejemplo algunas proteínas importantes en las interacciones planta-microorganismo pueden expresarse a niveles indetectables con las técnicas actuales ó, en el caso que esté relacionada una modificación post-traduccional muy rápida ó débil, puede ser muy difícil su muestreo y monitorización. Otro aspecto a tener en cuenta, es el grado de secuenciación del organismo a estudiar, para tener mayor ó menor éxito en las identificaciones posteriores.

Con las premisas anteriores, en este capítulo se aborda la interacción *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5-*M. artiellia* en raíces de garbanzo mediante técnicas proteómicas, con el objetivo de determinar qué factores bioquímicos se ven involucrados en la pérdida/mantenimiento de la resistencia a la Fusariosis Vascular del Garbanzo por la co-infección simultánea con *M. artiellia*. Para ello, se han estudiado diversos periodos temporales, desde fases tempranas de la interacción (4 y 8 DAI; Days After Inoculation= días después de la inoculación), hasta fases más avanzadas (35-40 DAI), e incluyendo diferentes muestreos ó subproteomas (raíz completa, nódulos producidos por el nematodo, fluido apoplástico). Asimismo, se ha estudiado si la supresión de la resistencia a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* por el nematodo tiene un carácter sistémico en la planta. Para ello, se han realizado estudios mediante técnicas de “*split-root*”, inoculando cada patógeno por separado en ambas mitades de la raíz al objeto de determinar si la respuesta defensiva (aumento/disminución) provocada por el nematodo es sistémica. En todos los casos, se ha intentado descifrar el mecanismo/s responsable de la respuesta de pérdida/mantenimiento de la resistencia a la FVG en la co-infección de ambos patógenos.

Para analizar los resultados de algunas de las interacciones estudiadas se han utilizado herramientas informáticas desarrolladas para el análisis de la expresión génica en microarrays, como es el programa NIA Array Analysis (Sharov *et al.*, 2005), siguiéndose las pautas de estudios proteómicos similares realizados en plántulas de tomate (Brumbarova *et al.*, 2008). Mediante esta aproximación se pueden estudiar un mayor número de proteínas conjuntamente, lo que permite mejorar el análisis, así como obtener relaciones más fáciles de interpretar en experimentos con varios parámetros, en nuestro caso, líneas de garbanzo e inoculaciones con patógenos.

2.2.- INTRODUCCIÓN A LAS TÉCNICAS PROTEÓMICAS EN PLANTAS

“Proteómica” significa etimológicamente el estudio de proteomas (Patterson y Abersold, 2003; Wilkins *et al.*, 1996), y “proteoma” se puede definir como el equivalente proteico de un genoma (“*the protein equivalent of a genome*”) (Williams, 1994) o, de una manera más completa, como “el patrón de proteínas de un organismo, célula, orgánulo ó fluido corporal, determinado cuantitativamente en un momento preciso y bajo determinadas condiciones” (Lottspeich, 1999).

Las herramientas básicas de la proteómica actual se asientan en dos técnicas principales: i) la electroforesis en gel y/o la cromatografía líquida (HPLC), como método de separación y selección de proteínas/péptidos diferenciales; y ii) la espectrometría de masas, como método de identificación y secuenciación. Las técnicas proteómicas se benefician de los conocimientos existentes sobre el genoma y el proteoma humano y de otras especies animales y vegetales. Esta información se encuentra disponible en bases de datos de libre acceso y puede utilizarse mediante programas de búsqueda que relacionan las secuencias en la base de datos con los datos de los espectros obtenidos.

Hay diversos pasos en la estrategia analítica, como son el muestreo, la preparación de la muestra, el posible fraccionamiento de ésta (debido a la complejidad del proteoma ó buscando una mayor especificidad en el estudio), la separación mediante técnicas de electroforesis o cromatografía mono o bi(multi)dimensional, los procesos de obtención de imágenes y análisis de datos, y por último, la identificación de las proteínas seleccionadas. Otra estrategia es el “*Shotgun proteomics*”, la cual persigue una visión más global en el estudio. Analiza de forma directa todo el proteoma, tras la digestión preliminar de la muestra, separación de la compleja mezcla de péptidos resultante mediante cromatografía multidimensional e identificación de las proteínas. En ambos casos las técnicas proteómicas dan una visión global de las proteínas involucradas en las interacciones.

No obstante, la proteómica tiene ciertas limitaciones como: i) la imposibilidad de amplificación de los niveles de proteínas (no existe una tecnología de amplificación tipo PCR), que hace que el resultado de los análisis sea muy dependiente de la cuantía de la respuesta y de la sensibilidad de detección del sistema analítico (resolución geles, tinciones, sensibilidad espectrometría de masas, etc.); ii) el proteoma es más complejo que el transcriptoma, varias proteínas pueden ser producidas por el mismo gen (diferente “*splicing*”, modificaciones post-traduccionales, etc.); iii) las grandes diferencias de concentración que suelen darse entre proteínas de la misma muestra; y iv) los diferentes tipos de células en cada órgano o tejido tienen su propia “firma proteómica”.

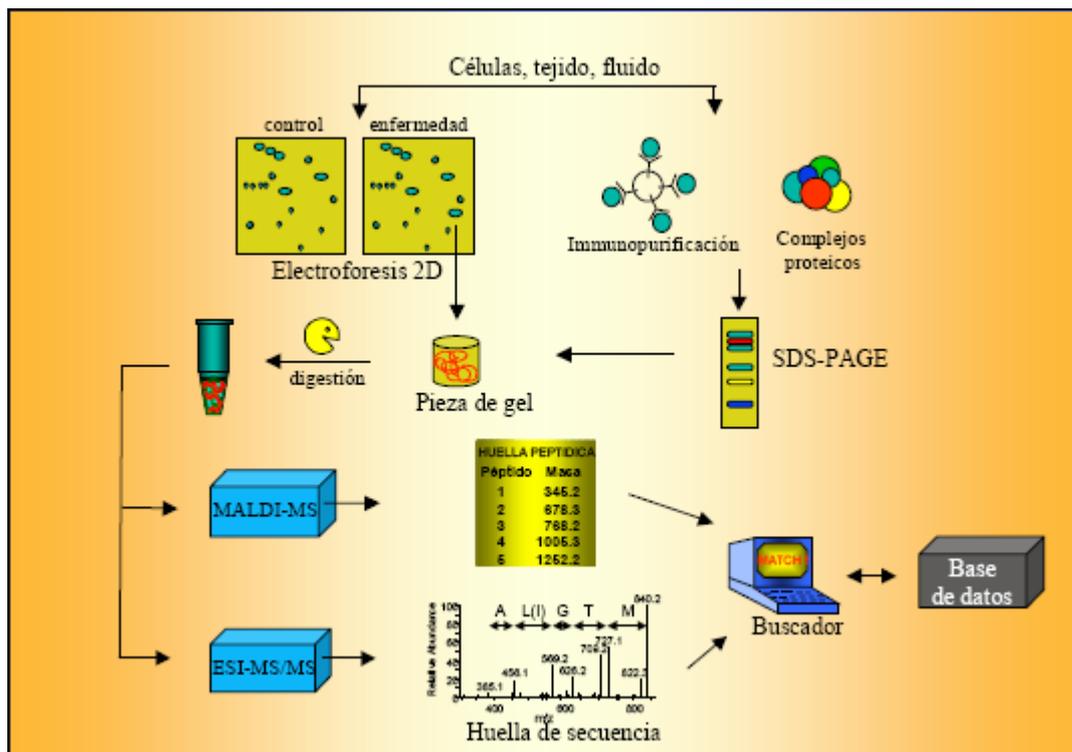


Figura 2.1.- Esquema de un estudio proteómico diferencial en gel. Se selecciona el tejido de estudio, de las muestras representativas se extraen las proteínas y se separan mediante gel de acrilamida, inmunopurificación, complejos proteicos, etc. Las proteínas diferenciales se aíslan del gel, se digieren mediante una proteasa (generalmente tripsina) y se intenta determinar el peso de los distintos fragmentos ó la secuencia de estos, ó bien mediante el aislamiento de estos fragmentos obtener el espectro de fragmentación. Estos datos se compararán mediante motores de búsqueda que coteja nuestros datos con los de las bases de datos para determinar posibles identificaciones (extraído de Abián, 2004).

Para estudios proteómicos, los extractos proteicos de muestras vegetales son generalmente más difíciles de preparar que los de origen animal debido a la rigidez de las paredes celulares de las plantas y a la acumulación de grandes cantidades de compuestos secundarios en la vacuola, los cuales al liberarse después de la disrupción del tejido pueden precipitar/degradar las proteínas (Cánovas *et al.*, 2004). Los protocolos de extracción más utilizados y apropiados para plantas son la precipitación mediante ácido tricloroacético/acetona y la extracción mediante fenol (Carpentier *et al.*, 2005), lo que permite la extracción simultánea de proteínas y ARN mensajeros (Dumas-Gaudot *et al.*, 2004), y precipitación de las proteínas extraídas con acetato amónico y metanol. Dependiendo de la situación biológica y el objetivo de estudio en que se vayan a aplicar las técnicas proteómicas, se deben optimizar los protocolos, separaciones, concentración de proteínas minoritarias, etc. Para este propósito hay diversas revisiones en proteómica de plantas en las que se resumen diversos problemas junto con distintas estrategias para abordarlos (Cánovas *et al.*, 2004; Jorrín *et al.*, 2007).

Un área atractiva dentro de la proteómica vegetal es la que se refiere a la proteómica de expresión diferencial en interacciones de plantas con patógenos y, dentro de la misma, la que se

centra a nivel de la raíz. Sin embargo, ambas líneas se pueden considerar francamente minoritarias dentro de sus ámbitos de inscripción. Así, los estudios de respuesta a patógenos son relativamente minoritarios dentro de los de proteómica de plantas, como lo son, dentro de aquéllos, los que se refieren al proteoma de la raíz. Sin embargo, las proteínas relacionadas con la resistencia a enfermedades representaron en *Arabidopsis thaliana* el 13% de las proteínas radicales, y el 7% de la foliares (Mooney *et al.*, 2006), datos que indican que los tejidos radicales constituyen un buen modelo para el estudio de las interacciones planta-patógeno (Metha *et al.*, 2008b). El análisis del proteoma radical presenta problemas singulares debido a algunas características inherentes de sus tejidos, como el bajo volumen citoplasmático y las elevadas concentraciones que suelen contener de sustancias interferentes como pigmentos ó compuestos fenólicos (Metha *et al.*, 2008b). Pese a ello, como se destaca en una reciente revisión, el descubrimiento de proteínas radicales relacionadas con la defensa de las plantas constituye un reto prometedor de cara a la identificación de proteínas y genes agronómicamente importantes (Metha *et al.*, 2008b). Algunos resultados de los estudios más bien escasos realizados en esta línea de “*Rootomics*” son los que se indican en la Tabla 2.1.

TABLA 2.1.- Proteínas radicales diferencialmente expresadas durante las interacciones planta-microorganismo e identificadas mediante estudios proteómicos (Metha *et al.*, 2008b)

Proteína	Planta	Patógeno/estímulo	Referencia
Proteína de respuesta a enfermedades pi 49	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Aphanomyces euteiches</i>	Colditz <i>et al.</i> , 2004
Proteína de respuesta a ABA ABR17	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Aphanomyces euteiches</i>	Colditz <i>et al.</i> , 2004
Proteína PR de la clase 10 (PR10)	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Aphanomyces euteiches</i>	Colditz <i>et al.</i> , 2004
Isoliquiritigenina 2-O-metiltransferasa	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Aphanomyces euteiches</i>	Colditz <i>et al.</i> , 2004
Glutación-S-transferasa	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Glomus mosseae</i>	Bestel-Corre <i>et al.</i> , 2002
Citocromo-c-oxidasa	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Glomus mosseae</i>	Bestel-Corre <i>et al.</i> , 2002
Fucosidasa	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Glomus mosseae</i>	Bestel-Corre <i>et al.</i> , 2002
Proteína PR Pbr1	<i>Oryza sativa</i>	<i>Azoarcus</i> sp.	Miché <i>et al.</i> , 2006
Proteína PR RSOsPR10	<i>Oryza sativa</i>	<i>Azoarcus</i> sp.	Miché <i>et al.</i> , 2006
Superóxido dismutasa de Cu/Zn	Clavel cultivar Woogenellup	<i>Rhizibium leguminosarum</i> bv. Trifolii	Morris y Djordjevic, 2001
Precursor de la caperonina 21	Clavel cultivar Woogenellup	<i>Rhizibium leguminosarum</i> bv. Trifolii	Morris y Djordjevic, 2001
L-ascorbato peroxidasa	<i>Medicago truncatula</i>	Tratamiento con N-acil homoserina lactona (AHL)	Mathesius <i>et al.</i> , 2003
Proteína de respuesta a la inducción de la hipersensitividad (HIR1)	<i>Medicago truncatula</i>	Tratamiento con N-acil homoserina lactona (AHL)	Mathesius <i>et al.</i> , 2003

Proteína	Planta	Patógeno/estímulo	Referencia
Superóxido dismutasa	<i>Medicago truncatula</i>	Tratamiento con N-acil homoserina lactona (AHL)	Mathesius <i>et al.</i> , 2003
Proteína PR10-1	<i>Medicago truncatula</i>	Tratamiento con N-acil homoserina lactona (AHL)	Mathesius <i>et al.</i> , 2003
Peroxidasa	<i>Medicago truncatula</i>	Tratamiento con N-acil homoserina lactona (AHL)	Mathesius <i>et al.</i> , 2003
Aconitato hidratasa	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Van Noorden <i>et al.</i> , 2007
Enolasa	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Van Noorden <i>et al.</i> , 2007
Proteína PR10	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Van Noorden <i>et al.</i> , 2007
Proteína de choque térmico 70	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Van Noorden <i>et al.</i> , 2007
Precursor de la proteína disulfuro isomerasa	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Van Noorden <i>et al.</i> , 2007
Quitinasa	<i>Coffea canephora</i>	<i>Meloidogyne paranaensis</i>	Metha <i>et al.</i> 2008b
Proteína PR de la clase 10 (PR10)	<i>Coffea canephora</i>	<i>Meloidogyne paranaensis</i>	Metha <i>et al.</i> 2008b
Quinona reductasa 2	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	Callahan <i>et al.</i> , 1997
14kDa polipéptido	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Meloidogyne incognita</i>	Callahan <i>et al.</i> , 1997

Entre las proteínas más citadas en los estudios proteómicos respecto a la respuesta defensiva de las plantas son las proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs), incluyendo thaumatinas, glucanasas, peroxidasa y quitinasas; otro grupo importante son las relacionadas con la respuesta a estreses bióticos, como glutatión transferasas, superóxido dismutasas y proteínas de choque térmico (Metha *et al.*, 2008a).

Desde el punto de vista más específico de nuestros patosistemas planta-*Fusarium oxysporum* (Fusariosis Vascular) y planta-*Meloidogyne* spp (nematodos noduladores), no son muchos los artículos que han estudiado estas interacciones utilizando las herramientas proteómicas.

En la interacción planta- *forma specialis F. oxysporum* se ha estudiado principalmente el proteoma del fluido xilemático (Rep *et al.*, 2002; 2003; Houterman *et al.*, 2007) y principalmente el patosistema tomate-*F. oxysporum* f. sp. *licopersici*, con buenos resultados, al ser principalmente el cilindro vascular la zona que intenta colonizar el hongo. Desde el punto de vista del proteoma global, el estudio del proteoma de la interacción remolacha-*F. oxysporum* f. p. *betae* en raíces inoculadas *versus* raíces control mediante cromatografía líquida multidimensional. Esta tecnología ha permitido diferenciar a 950 picos cromatográficos tras la digestión del proteoma con tripsina, observándose una variación en éstos del 12 % para la línea resistente, y del 8 % para la línea susceptible (Larson *et al.*, 2007). El secretoma de *F. oxysporum*, y concretamente el de la f. sp. *ciceris*, ha sido estudiada para determinar proteínas extracelulares que pudieran actuar como factores de virulencia entre razas y en diversas condiciones en el medio de cultivo, así también con actividades

enzimáticas (Pérez Artés y Tena, 1990; Jorge, 2003; Jorge *et al.*, 2005, 2006), si bien ninguno de estos trabajos han utilizado una aproximación proteómica tal como ahora se concibe.

La interacción planta-*Meloidogyne* spp ha sido estudiada principalmente mediante expresión génica con técnicas como las de hibridación diferencial de librerías génicas de cDNA (escrutinio diferencial e hibridación substractiva) (Lambert y Williamson, 1993; Van der Eycken *et al.*, 1996; Lambert *et al.*, 1999b), “*differential display*” ó huellas digitales genéticas de ARN (Vercauteren *et al.*, 2001; Wang *et al.*; 2003), cDNA-AFLP y micromatrices (Jammes *et al.*, 2005; Escobar y Fenoll, 2007), y análisis de promotores (Goddijin *et al.*, 1993; Karczmarek *et al.*, 2004). Entre los escasos estudios proteómicos, cabe citar el de Callahan *et al.* (1997) en el que se observa una mancha electroforética diferencial de 14 KDa en cultivares resistentes de algodón inoculadas con *M. incognita* a los 8 DAI; sin embargo, no se pudo identificar la proteína. Otros estudios proteómicos, de las interacciones incompatibles entre algodón-*M. incognita* y café- *M. paranaensis*, han mostrado la expresión de manchas electroforéticas diferenciales al comparar las raíces inoculadas con raíces sin inocular: en la primera interacción se identificó una quinona reductasa II, mientras que en la segunda se identificaron una quitinasa de clase III y una proteína PR de clase 10 (Metha *et al.*, 2008b), no apareciendo hasta la actualidad estudios enfocados a la interacción compatible entre plantas y nematodos noduladores. Sin embargo, el secretoma de los juveniles móviles está siendo estudiado extensivamente, siendo más difícil el estudio del secretoma en hembras adultas por la dificultad de obtención de las muestras, al encontrarse embebidas en la raíz. El secretoma de las glándulas faríngeas se puede obtener mediante drogas que afectan al sistema nervioso de estos nematodos, como el resorcinol y la serotonina, obteniéndose con aproximación en gel unas 40 manchas electroforéticas, de las cuales solo se pudieron identificar 7 proteínas (Jaubert *et al.*, 2002), mientras con una aproximación de identificación directa del secretoma mediante nanoLC ESI MS/MS se han podido identificar hasta 486 proteínas (Bellafiore *et al.*, 2008). También se ha comparado el proteoma total de hembras maduras de diferentes especies y aislados (Navas *et al.*, 2002), aunque los estudios a este respecto son más bien escasos. Actualmente, con el primer esbozo de la secuenciación de los genomas de *M. incognita* (Abad *et al.*, 2008) y *M. hapla* (Opperman *et al.*, 2008), se vislumbra un mejor panorama de cara a la identificación de proteínas en los futuros estudios proteómicos.

En garbanzo, se han realizado recientemente diversos trabajos de proteómica relacionados con el estudio de proteínas de la matriz extracelular (Bhushan *et al.*, 2006) y la respuesta de este mismo sub-proteoma a situaciones de stress por sequía (Bhushan *et al.*, 2007). En el primer trabajo se observaron más de 450 manchas electroforéticas, identificándose 131 proteínas, y en el segundo

se observaron alrededor de 420 manchas electroforéticas, y se identificaron 186 proteínas afectadas por el tratamiento en la línea JG-62. También se ha estudiado el proteoma nuclear de garbanzo, detectándose 600 manchas electroforéticas, pudiéndose identificar 150 proteínas mediante cromatografía líquida como técnica de separación de péptidos y electroespray acoplado con espectrometría de masas para determinar la masa de los iones generados; el mayor porcentaje de proteínas identificadas estuvo relacionado con la señalización y regulación génica (36%), mientras que el 17% lo estuvo con el replicación y transcripción del ADN (Pandey *et al.*, 2006). También este mismo grupo ha estudiado la respuesta del proteoma nuclear a las situaciones de estrés hídrico, constatando que 205 proteínas eran modificadas, de las que se pudieron identificar 147 (Pandey *et al.*, 2008).

2.3.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1.- INÓCULO DE *MELOIDOGYNE ARTIELLIA*

La población de *M. artiellia* usada en los estudios descritos en este capítulo fue obtenida de raíces infectadas de plantas de garbanzo procedentes de campos comerciales situados en Castel del Monte (provincia de Bari), Sur de Italia. Para ello, se seleccionó una masa de huevos de *M. artiellia* de un único nódulo, que contenía solo una hembra de nematodo, de una raíz de garbanzo, que fue desinfectada con 1% NaOCl durante 4 minutos y posteriormente sometida a 4 lavados en agua destilada estéril para la eliminación del desinfectante. Esta masa de huevos desinfectada se depositó alrededor del sistema radical de plantas de garbanzo (cv. UC27) de 2-3 semanas de edad y cultivadas en una mezcla de suelo (arena/limo, 2:1, v/v) esterilizado. Las plantas se cultivaron durante 3 a 4 meses a 21 ± 1 °C con un fotoperiodo de 14 horas de luz fluorescente a 360 ± 25 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. El inóculo de nematodos para los experimentos se incrementó extrayendo los huevos con el procedimiento NaOCl (Hussey y Barker, 1973), y reinoculando sucesivamente en nuevas plantas hasta alcanzar la cantidad deseada. Para ello, las raíces infectadas se lavaron con agua, se cortaron en segmentos de 1-2 cm de longitud, y se agitaron durante 3 minutos en una solución 1% NaOCl. Posteriormente, la suspensión se filtró por tamices de 75 μm y 5 μm de apertura consecutivamente, y los huevos retenidos en el tamiz de 5 μm se lavaron varias veces para eliminar cualquier resto de NaOCl y se resuspendieron en agua destilada estéril. Para evaluar la densidad del inóculo de *M. artiellia* aplicada en cada uno de los experimentos, en la suspensión basal obtenida se determinó la población de huevos mediante dilución (1:100) a partir de alícuotas de 1 ml (repetidas 10 veces de forma independiente). Para inocular las plantas con *M. artiellia*, se añadió

alrededor de la radícula de una semilla germinada, en el momento de la siembra, una suspensión de diferente volumen en cada experimento, conteniendo huevos o juveniles de segunda edad (J2) de *M. artiellia*. Las plantas que sirvieron como control se trataron de igual forma que las inoculadas, pero empleando agua destilada estéril sin inóculo del nematodo.

En el caso de los experimentos con J2 solamente (experimento de penetración y geles preliminares de proteómica), las masas de huevos adheridas a las hembras fueron tomadas individualmente mediante pinzas y depositadas en tamices de 90 μm , que sólo permiten el paso de los J2s recién eclosionados. Los tamices se cubrieron con agua estéril hasta el nivel de las masas de huevos, dejándose en oscuridad y a una temperatura constante de 21 ± 1 °C. Cada tres días se retiraron los nematodos, se contaron los individuos viables y se ajustó su concentración para su posterior inoculación en plantas

2.3.2.- INÓCULO DE *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CICERIS*

En todos los experimentos realizados se ha utilizado el aislado Foc-8012 perteneciente a la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc-5) (Jiménez-Díaz *et al.*, 1989b). Este aislado, que se obtuvo de plantas de garbanzo infectadas del sur de España, ocasiona Marchitez Vascular en los cultivares susceptibles (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985b). Foc-8012 forma parte de la micoteca del Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba, España.

El cultivo activo de Foc-8012 se obtuvo de pequeñas alícuotas de suelo infestado, colocadas sobre agar patata dextrosa (APD) (20 g de agar, 250 g de patata, 20 g D-glucosa por litro de agua desionizada) en placas petri, que se incubaron a 25° C y un fotoperiodo de 12 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta (NUV) de $54 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 7 días. Como inóculo, se utilizaron clamidosporas obtenidas de un sustrato colonizado por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, que consistió en una mezcla de arena, harina de maíz y agua destilada (AMA) en proporción 9:2:1 en peso (Nene y Haware, 1980; Trapero Casas, 1983). La arena seca y tamizada se mezcló con la harina de maíz y el agua, y la mezcla se distribuyó en matraces Erlenmeyer de 1.000 ml (400 g / matraz) y se esterilizó en autoclave (121°C, 75 min, dos veces en días consecutivos). Al sustrato esterilizado se añadieron 18 discos de agar de 5 mm de diámetro, tomados de un cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de 7 días de crecimiento en APD en las condiciones anteriores. Los matraces se incubaron a 25 °C y un fotoperiodo de 12h día⁻¹ de luz blanca y NUV de $36 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Cada 2-3 días, los matraces se agitaron con el fin de distribuir el inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y favorecer la colonización homogénea de la mezcla por éste. A los 15 días de incubación, el

sustrato colonizado por el hongo se mezcló con suelo esterilizado en proporción 1:12 en peso. El suelo utilizado fue una mezcla de arena y limo (1:1 en peso) esterilizada en autoclave (121°C, 75 min, dos veces en días consecutivos). La mezcla resultante se distribuyó en matraces Erlenmeyer de 1.000 ml (400 g / matraz) y se incubó a 25°C en oscuridad durante 6 semanas, en el curso de las cuales los matraces se agitaron periódicamente para facilitar la colonización homogénea del sustrato por el hongo. Tras el periodo de incubación, el sustrato infestado se sometió a secado en estufa de calor seco a 30°C durante 3-4 días, tras los cuales se almacenó a 4°C hasta su utilización. La existencia de clamidosporas en el sustrato se determinó mediante observaciones microscópicas.

Las estimaciones del inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 para la infestación del suelo se determinaron por el método de dilución en placa. Para ello, de cada mezcla de suelo infestado utilizada en los distintos experimentos, se muestrearon al azar pequeñas cantidades de suelo del volumen global, y dichas muestras se mezclaron para componer una mezcla única de un peso aproximado de 50 g en cada experimento. De dicha mezcla se utilizaron tres submuestras de 1 g, cada una de las cuales se incorporó a matraces Erlenmeyer con 100 ml de agar-agua estéril al 0,1%. La suspensión se homogeneizó en un agitador magnético durante 5 min y alícuotas de 1 ml de ésta se distribuyeron en placas petri con medio VOPA (200 ml jugo V8; 3 g CaCO₃; 5 g D-glucosa; 2 g extracto de levadura; 5 g oxgall; 20 g agar; 800 ml agua desionizada; 100 mg aureomicina; 300 mg sulfato de estreptomicina; 500 mg pentacloro-nitrobenceno) (tres placas por muestra de suelo) y las placas se incubaron en una cámara a 25°C en oscuridad. Tras 4-5 días de incubación se identificaron y contabilizaron las colonias de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* para determinar el número de propágulos (ufc) por gramo de suelo. En cada uno de los experimentos, la densidad de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el suelo se determinó inmediatamente después de la incorporación del patógeno al mismo.

2.3.3.-MATERIAL VEGETAL

Para los distintos experimentos, se utilizaron dos líneas de garbanzo, CA 336.14.3.0 e ICC 14216K, que fueron seleccionadas para el estudio basándose en la reacción diferencial a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 tras su interacción con el nematodo *M. artiellia*, aún siendo ambas susceptibles al mismo (Castillo *et al.*, 2003; Navas Cortés *et al.*, 2008). La línea CA 336.14.3.0 se muestra resistente a la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* tanto a bajas como altas densidades de inóculo (3.000 y 30.000 clamidosporas/g suelo, respectivamente), pero esta resistencia se muestra inestable, independientemente de la densidad del inóculo fúngico, cuando las plantas son coinfectadas con *M. artiellia*; sin embargo, la línea de garbanzo ICC 14216K, también resistente a la

raza 5 a baja y alta densidad de inóculo, mantiene este carácter cuando es coinfectada con *M. artiellia*. La línea ICC14216K proviene de programas de mejora del ICRISAT (International Crops Research Institute for Semiarid Tropics, Hyderabad, India), mientras que la línea CA336.14.3.0, que proviene de líneas avanzadas (F₆ - F₇) en programas de mejora de resistencia a la FVG, en los que se usó la línea "desi" 81001 como fuente de resistencia, fue desarrollada por el grupo de Sanidad Vegetal (AGR-136), el Departamento de Agronomía y Mejora del CIDA-Córdoba, la Junta de Andalucía y Koipesol Semillas, S.A., siendo además resistente a un aislado altamente virulento de *D. rabiei* (Navas-Cortés *et al.*, 1998b) y a las razas 0, 1, 5 y 6 de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (Jiménez Díaz, *no publicado*).

Adicionalmente, en el experimento de fluido xilemático se introdujo la línea de garbanzo JG-62, seleccionada por ser compatible con todas la razas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y poder así suministrar información sobre la respuesta de susceptibilidad a la enfermedad.

2.3.4.- DETERMINACIÓN DE LAS FASES PARASÍTICAS DE *M. ARTIELLIA* Y EVALUACIÓN DE LA PENETRACIÓN

2.3.4.1.- Fases del ciclo parasítico de *M. artiellia*

Para determinar los diferentes hitos del ciclo parasítico de *M. artiellia* en plantas de garbanzo, semillas del cultivar UC 27 (que se había mostrado susceptible a *M. artiellia*, Castillo *et al.*, 2003; Navas Cortés *et al.*, 2008) se desinfectaron superficialmente con una solución de NaOCl al 20% durante 3 min. Posteriormente las semillas se germinaron en cámaras húmedas a 25°C en oscuridad durante 48 h, con objeto de utilizar semillas con una la longitud de radícula estandarizada. Las semillas germinadas se sembraron en macetas de arcilla de 7,5 cm de diámetro conteniendo 400 cm³ de una mezcla de suelo (arena: limo; 2:1, v/v) esterilizado e infestado con el aislado de *M. artiellia* en el momento de la siembra. Las plántulas se mantuvieron en una cámara de crecimiento ajustada a 25 ± 1° C y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y NUV a 360± 25 µEm⁻²s⁻¹ durante el tiempo de incubación del experimento. Estas condiciones son favorables para la infección y reproducción de *M. artiellia* (Di Vito y Greco, 1988b; Castillo *et al.*, 2003). Las plántulas se regaron diariamente con agua corriente de acuerdo a sus necesidades y semanalmente con 100 ml de solución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950). Se utilizaron 3 repeticiones por cada periodo temporal estudiado y se inocularon 400 J2s/plántula. Para estandarizar el proceso parasítico en el tiempo, 48 horas después de la inoculación las plántulas se transplantaron a otras macetas con la misma

mezcla de suelo esterilizado sin inocular, con objeto de evitar posibles infecciones secundarias posteriores que pudieran confundir las observaciones. Para las observaciones se seleccionaron diversos periodos temporales que incluyeron 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 26, 31 y 38 DAI.

En cada uno de los periodos temporales seleccionados, las raíces se lavaron con agua corriente, para eliminar las partículas de suelo adherido a la superficie, y se tiñeron con fucsina ácida, siguiendo el protocolo de Byrd *et al.* (1983), con algunas modificaciones para tener en cuenta que la raíz primaria en garbanzo por su mayor grosor presenta cierta dificultad en la observación de los nematodos en su interior. Las raíces completas se mantuvieron en agitación con una solución de 150 ml de agua más 90 ml de lejía comercial (5,25 % de NaOCl) durante 6 minutos, luego se lavaron en agua corriente a flujo constante durante 45 segundos, dejándose 15 minutos en agua para eliminar cualquier resto de lejía que pudiera inhibir la tinción con fucsina ácida. Las raíces se secaron superficialmente y se introdujeron en la solución de tinción [150 ml de agua destilada más 5 ml de solución stock de tinción (0,35 gr. de fucsina ácida en 25 ml de ácido acético, llevado a un volumen final de 100 ml con agua destilada)]. Esta solución con las raíces se calentó hasta ebullición durante 30 segundos; posteriormente, las raíces se lavaron con agua destilada para eliminar la fucsina superficial y se secaron superficialmente con papel de filtro. Para desteñir, se utilizó glicerol acidificado (20-30 ml con unas gotas de HCl 5 N), calentándose hasta apariencia translúcida. Las raíces se pueden almacenar en esta solución hasta ser examinadas. Los nematodos, después del desteñido, presentan un color rojo brillante frente a las raíces que se muestran transparentes o translúcidas.

El estudio de las fases de desarrollo de los nematodos y su situación en la raíz se realizó mediante observaciones con microscopio estereoscópico Leica MS5 (Leica) y, para los detalles de penetración, con microscopio Laborlux (Leitz).

2.3.4.2.- Penetración de juveniles de segunda edad de *M. artiellia* en las dos líneas de garbanzo en periodos iniciales

El objetivo de este experimento fue determinar si la penetración de J2s de *M. artiellia* en fases iniciales era similar en las dos líneas de garbanzo consideradas en este estudio, para relacionar posibles respuestas de la planta con el mismo nivel de infección de nematodos en la raíz. Para ello, se inocularon 1.000 J2s/planta en recipientes de plástico estériles de 50 cm³ para facilitar el contacto entre nematodos y la raíz de garbanzo. El experimento se llevó a cabo con un diseño completamente al azar con 20 repeticiones por línea y utilizando una plántula por recipiente. Las plántulas se mantuvieron en una cámara de crecimiento ajustada a las mismas condiciones

ambientales indicadas en el apartado 2.3.4.1. La tasa de penetración de J2s se determinó mediante la evaluación del número de J2s presentes en las raíces de cada una de las plántulas a las 48 horas posteriores a la inoculación.

Para la extracción de J2s de las radículas infectadas, éstas se lavaron en agua corriente, para eliminar los restos de arena y limo, y se cortaron en trozos de 0,5-1,0 cm de longitud, que se depositaron en una batidora y se homogeneizaron en un volumen de 100-150 ml a 12.000 rpm durante 2-3 min. La suspensión homogeneizada se filtró por un tamiz de 20 cm de diámetro y un diámetro de poro de 5 μm . El contenido de este tamiz se pasó a un tubo de centrifuga al cual se le añadió una cucharadita de caolín y la mezcla se centrifugó a 1.800 rpm durante 5 min. Posteriormente, el sobrenadante se eliminó y al precipitado se añadieron 250 ml de MgSO_4 con una densidad de 1,15-1,17 g/cm^3 . Esta suspensión se agitó durante 15-20 s y se centrifugó a 1.500 rpm durante 3 min. Tras esta segunda centrifugación, el sobrenadante se vertió de nuevo sobre el tamiz de 5 μm de diámetro de poro y el contenido de éste se depositó en una placa o en un frasco para su recuento (Coolen, 1979).

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un análisis de varianza y comparación de medias mediante el test de mínima diferencia significativa (LSD), utilizando el programa Statistix 8.0 (NH Analytical Software, Roseville, MN). Previamente a la realización del análisis, los valores del número de nematodos en la raíz fueron transformados mediante $\log(X+1)$ para homogeneizar las varianzas y ajustar los datos a una distribución normal.

2.3.5.- FASES INICIALES DE LA INTERACCIÓN (4 y 8 DAI)

En este experimento se estudió la respuesta proteómica de ambas líneas de garbanzo en periodos iniciales de la interacción, a los 4 y 8 DAI. Las semillas germinadas, seleccionadas por uniformidad (con raíces de 1 a 2 cm de longitud), se plantaron individualmente en frascos de plástico estériles de 100 cm^3 de volumen y conteniendo una mezcla de suelo (arena/limo, 2:1, v/v) esterilizado e infestado con 0 ó 30.000 clamidosporas de *Foc-5* por gramo de suelo. El experimento se llevó a cabo con un diseño completamente al azar con 3 repeticiones por cada tiempo de muestreo y línea, cada repetición consistente en 6 raíces de plántulas a los 4 DAI y 8 DAI. Las plántulas se mantuvieron en una cámara de crecimiento ajustada a las mismas condiciones ambientales indicadas en el apartado 2.3.4.1 durante el tiempo de incubación del experimento. A los 4 y 8 DAI las raíces se lavaron primero con agua, para eliminar las partículas de suelo, y luego con agua destilada estéril, se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido y se mantuvieron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta la extracción de proteínas.

2.3.6.- FASES AVANZADAS DE LA INTERACCIÓN (35-40 DAI)

Para estudiar las respuestas proteicas en fases avanzadas de la interacción en el patosistema garbanzo-*Foc-5*-*M. artiellia* se utilizaron plantas de 35-40 DAI. Como en los experimentos anteriores, las semillas germinadas se seleccionaron por uniformidad y se sembraron en macetas de arcilla de 15 cm. de diámetro (cuatro semillas por maceta) en una mezcla de suelo (arena/limo, 2:1, v/v) esterilizado. El suelo se infestó con 0 ó 30.000 clamidosporas de *Foc-5* por gramo de suelo en combinación con 0 ó 20 huevos + J2 por centímetro cúbico de suelo. Se realizaron tres repeticiones biológicas por cada tratamiento, consistentes en el material vegetal obtenido de cuatro plantas/maceta. Los cuatro tratamientos fueron (Fig. 2.2): (i) suelo estéril; (ii) suelo infestado con *M. artiellia*; (iii) suelo infestado con *Foc-5*; y (iv) suelo infestado con *M. artiellia* y *Foc-5*. El inóculo de *M. artiellia* se añadió en 5 ml de agua destilada estéril y en el centro de las cuatro semillas, a la altura de las raíces, lo que se efectuó en el momento de sembrar las semillas germinadas, para favorecer la colonización de éstas por el nematodo. En los tratamientos sin nematodo, se añadieron 5 ml de agua destilada estéril.

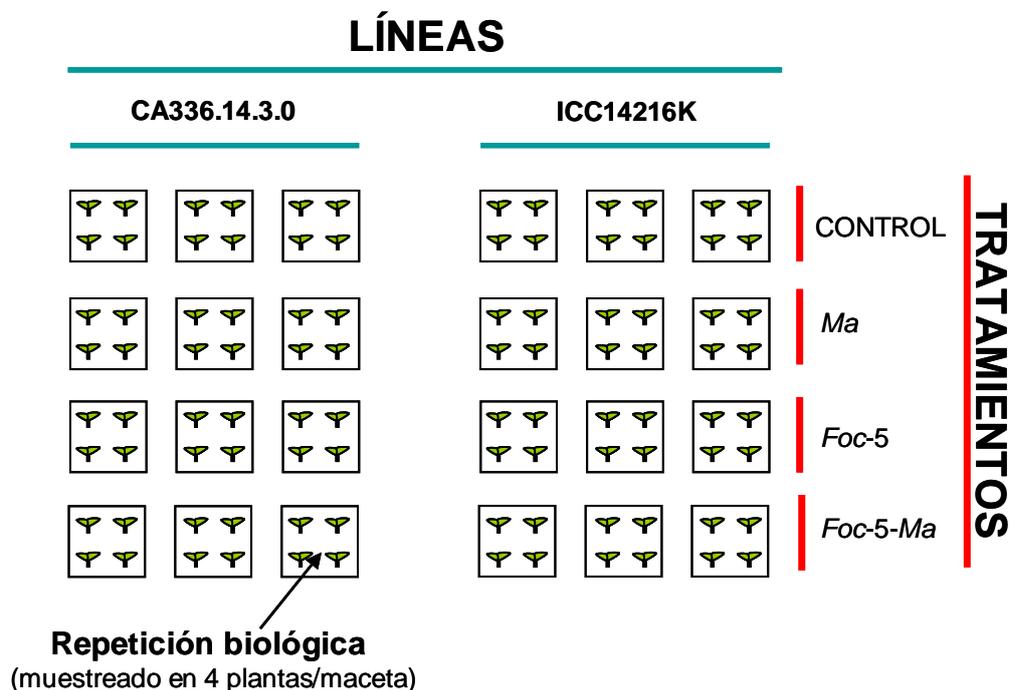


Figura 2.2.- Tratamientos para el estudio proteómico en fases avanzadas de la interacción (35-40 DAI) en el patosistema garbanzo-*Foc-5*-*M. artiellia*. Control, plantas sin inocular; *Ma*, plantas inoculadas con 20 huevos + J2/cm³ de suelo de *M. artiellia*; *Foc-5*, plantas inoculadas con 30.000 clamidosporas/g de suelo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5; *Foc-5-Ma*, plantas inoculadas simultáneamente con 30.000 clamidosporas/g de suelo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 y 20 huevos + J2/cm³ de suelo *M. artiellia*.

Al final del experimento (35-40 DAI), se separaron las raíces de cada grupo de plantas y se lavaron con agua corriente, para eliminar las partículas de suelo adheridas, y posteriormente con agua destilada estéril. Este periodo de muestreo se seleccionó de acuerdo a estudios previos de la interacción de garbanzo-*M.artiellia* (Volvas *et al.*, 2005), en los cuales se habían demostrado elevados niveles de infección, así como un buen desarrollo de las células gigantes, sin que se apreciaran grandes daños en la planta. En dicho periodo la hembra de *M. artiellia* está completamente desarrollada y presenta una deposición inicial de huevos en la matriz gelatinosa (Di Vito y Greco, 1988a; Volvas *et al.*, 2005).

Con objeto de eliminar proteínas constitutivas del nematodo y concentrar la muestra en la respuesta de la planta, en los tratamientos con *M. artiellia* (tratamientos ii y iv), la hembra junto con la matriz gelatinosa conteniendo huevos se eliminó cuidadosamente con pinzas (Fig. 2.3). La parte nodulada de la raíz se seccionó por ambas partes utilizando un bisturí estéril, y se depositó en agua destilada estéril, hasta que la cantidad fuera suficiente para manipularse (aproximadamente 50 nódulos). Posteriormente los nódulos seccionados se secaron superficialmente con papel de filtro uno a uno, y se depositaron en un tubo de microcentrífuga, congelándose rápidamente con nitrógeno líquido, proceso que se repitió hasta conseguir 300 mg de material vegetal, que fue la cantidad elegida para cada repetición biológica. En los tratamientos control (i) y *Foc-5* (iii) se utilizó el mismo procedimiento anterior, aunque en estos casos al no existir nodulación en la raíz, se seleccionaron raíces de la misma edad que las raíces que contenían los nódulos del nematodo. Todas las muestra se almacenaron a -80 °C hasta su extracción. La cantidad de material vegetal de raíz cosechada se fijó atendiendo, por un lado, al rendimiento del procedimiento de extracción utilizado y por otro a la dificultad para obtener material vegetal de nódulos del nematodo, debido a la laboriosidad de la tarea de localización de las hembras y su separación de la raíz de la planta con las pinzas de micro-manipulación.

Este método de recolección de material puede ser interesante, en estudios proteómicos en Fitonematología, para concentrar la respuesta y eliminar/reducir al mínimo la contaminación por proteínas constitutivas del nematodo. *M. artiellia* puede, así mismo, ser un buen nematodo modelo para aplicar esta técnica por la escasa nodulación que origina en las plantas huéspedes que parasita, lo que contrasta con otras especies de *Meloidogyne* (Volvas *et al.*, 2005), las cuales producen una mayor división de células adyacentes a las células gigantes, con la posible dilución de la respuesta de éstas.

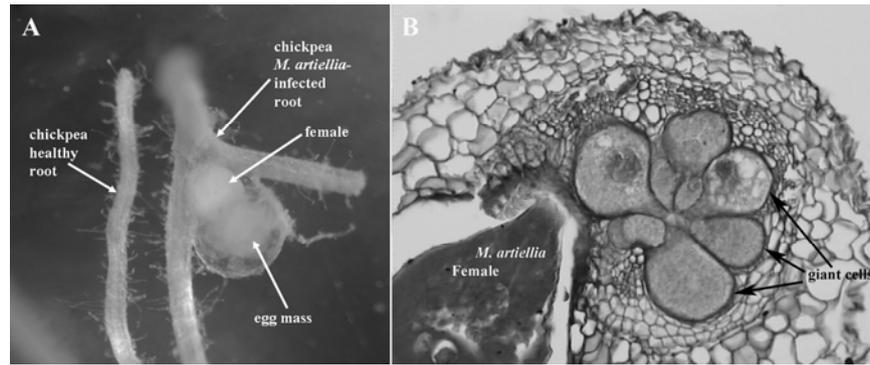


Figura 2.3.- Sitio de alimentación y nódulo producido por *M. artiellia* en raíces de garbanzo. A, Comparación entre raíces de garbanzo infectadas por *M. artiellia* y raíces sanas, donde se observa la escasa nodulación en la raíz, la hembra sobresaliendo de ésta y los huevos incluidos en la matriz gelatinosa que produce; B, Sección transversal del sitio de alimentación en garbanzo inducido por *M. artiellia*.

2.3.7.- ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN EN EL FLUIDO APOPLÁSTICO

En este caso se realizaron dos tipos de experimentos, con raíces intactas y con raíces divididas (experimento de “*split-root*”), en el que se inocularon los patógenos en diferentes partes radicales de la planta. Inicialmente se intentó obtener fluido xilemático cortando el tallo de las plantas de garbanzo (CA336.14.3.0 e ICC14216K) cerca del nivel del suelo ó insertando agujas hipodérmicas en la base del tallo. Sin embargo, este método que funciona muy bien en especies como tomate (Rep *et al.*, 2003) y en la interacción de esta planta con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, resultó infructuoso con garbanzo, probablemente debido a un bajo valor de presión radical. Por ello, se utilizó como fluido apoplástico el resultante de la infiltración de los espacios extracelulares de la raíz con un medio extractante, tal como se describe más adelante (sección 2.3.8.2).

2.3.7.1.- Fluído apoplástico en raíces intactas

En el experimento se incluyó una línea susceptible (JG62) a la FVG en relación con la cual se establecieron los tiempos de muestreo en nuestras líneas de estudio CA336.14.3.0 e ICC14216K. Para ello, las semillas germinadas y seleccionadas (como en experimentos anteriores) de las líneas CA336.14.3.0 y ICC14216K, y de la línea JG62 (susceptible a *Foc-5*), se sembraron en la misma mezcla de suelo esterilizado infestado con 0 ó 30,000 clamidosporas de *Foc-5* por gramo de suelo, y una planta por cada maceta (100 cm³). El experimento se llevó a cabo con un diseño completamente al azar con 4 repeticiones por cultivar y utilizando una plántula por maceta. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento ajustada a las mismas condiciones

ambientales indicadas en el apartado 2.3.4.1. Los tiempos de muestreo se establecieron de acuerdo con la sintomatología de "JG62", correspondiendo al inicio (aproximadamente 14 DAI) y a la plena expresión de los síntomas de la enfermedad (18 DAI).

2.3.7.2.- Fluido apoplástico en raíces divididas mediante la técnica de "*split-root*"

Para la formación de plantas con el sistema radicular dividido en dos partes iguales se utilizó un procedimiento similar al de Kaur y Singh (2007), con pequeñas modificaciones. Las semillas germinadas como en los experimentos anteriores, se seleccionaron por uniformidad (con raíces de 1 a 2 cm de longitud) y se plantaron en una mezcla de suelo (arena/limo, 2:1, v/v) esterilizado, creciéndose durante 4 días en bandejas de plástico. Este procedimiento permitió la formación de raíces secundarias de algunos milímetros, junto con el crecimiento de la raíz principal. Tras descartar las plantas con pocas raíces secundarias o con un desarrollo asimétrico de éstas, a las restantes les fue cortada la raíz principal con un bisturí estéril dejando suficiente cantidad de raíces secundarias (2-3 cm debajo de los cotiledones), tras lo cual se volvieron a plantar en la misma mezcla de suelo esterilizado en bandejas de plástico. A los 5-6 días posteriores se consiguió un crecimiento de las raíces secundarias de unos 4-5 cm, con lo que las plantas pudieron ser manipuladas y colocadas en las macetas adaptadas para separar las dos mitades radicales. Para ello se utilizaron macetas de plástico (500 cm³) que presentaban una incisión entre ambas para poder colocar la planta y estaban unidas entre sí mediante cinta adherente (Fig. 2.5).

En este experimento se planteó el estudio de la interacción de las líneas de garbanzo CA336.14.3.0 e ICC14216K con ambos patógenos utilizando las mismas densidades de inóculo que en experimentos anteriores y los tratamientos indicados en la Fig. 2.4. Las inoculaciones de los patógenos se realizaron, como se ha descrito anteriormente, en el momento de disponer la planta sobre las macetas. El experimento se llevó a cabo con un diseño completamente al azar con 4 repeticiones por cultivar y utilizando una plántula por recipiente. Las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento ajustada a las mismas condiciones ambientales indicadas en el apartado 2.3.4.1 durante 40 días.

Al final del experimento se determinaron los pesos de ambas partes radicales de cada planta, con objeto de determinar si existía alguna influencia sistémica en los diferentes tratamientos. El análisis estadístico se realizó mediante el test T de muestras pareadas, en el cual los datos de cada parte radical de la planta están asociados, al pertenecer a la misma planta, utilizándose el programa Statistix 8.0 (NH Analytical Software, Roseville, MN).

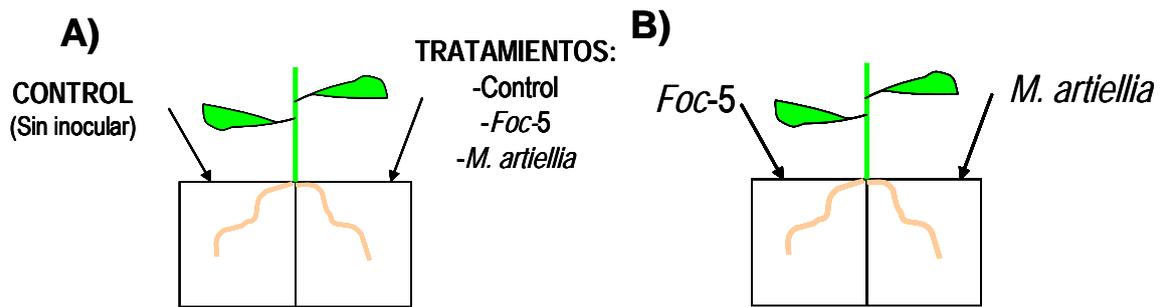


Figura 2.4.- Esquema de inoculaciones en el experimento de "split-root". A) Una parte de las raíces no se inoculó, mientras que en la otra se hicieron los tratamientos de Control (sin inocular), *Foc-5*, (30.000 clamidosporas/ g. suelo) y *M. artiellia* (20 huevos-juveniles / cm³ de suelo); B) Una parte de las raíces se inoculó con *Foc-5* (30.000 clamidosporas / g suelo) y la otra con *M. artiellia* (20 huevos-juveniles / cm³ de suelo). Los tratamientos se realizaron con ambas líneas de garbanzo CA336.14.3.0 e ICC14216K.



Figura 2.5.- Planta de la línea CA336.14.3.0 en el experimento de "split-root" a los 40 DAI.

2.3.8.- EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

2.3.8.1.- Experimentos en periodos iniciales de la interacción (4-8 DAI) y en fases avanzadas (35-40 DAI)

El material vegetal cosechado fue reducido a polvo en un mortero preenfriado con nitrógeno líquido. En el caso del material vegetal procedente de nódulos se utilizó todo el material disponible

para la extracción de proteínas, mientras que con el procedente de raíces, solo se utilizó un gramo para la extracción, como se recomienda en el protocolo utilizado (Dumas-Gaudot *et al.*, 2004), en los experimentos de 4-8 DAI y 300 mg en los de 35-40 DAI. El material vegetal convertido en polvo, sin permitir su descongelación, se homogenizó mediante agitación con la maza en el mismo mortero con 10 mL de tampón de lisis (0,5 M Tris-HCl conteniendo 0,7 M de sacarosa, 50 mM EDTA, 0,1 M KCl, 10 mM thiourea, 2 mM PMSF y 2 % v/v β -mercaptoetanol). Posteriormente, se añadieron 10 mL de fenol tamponado (pH 8) y se agitó durante 30 min, tras lo cual la fase fenólica, separada por centrifugación, se lavó con otros 10 mL de tampón de lisis. Se recuperó la fase fenólica y las proteínas fueron precipitadas añadiendo 5 volúmenes de metanol conteniendo 0,1 M de acetato amónico durante toda la noche a -20 °C. El precipitado, obtenido por centrifugación, se lavó con metanol y acetona preenfriados a -20 °C, se secó con corriente de aire y se resuspendió en 200 μ L de tampón de solubilización conteniendo 9 M urea, 4 % w/v CHAPS, 0,5 % v/v Tritón X-100, 100 mM DTT y 2 % v/v biolytes pH 3-10 (Bio-Rad). Los lípidos y ácidos nucleicos se eliminaron con ultracentrifugación durante 30 min y el contenido de proteína del sobrenadante fue analizado mediante el método Bradford, usando ovalbumina como estándar. Las muestras se mantuvieron a -80 °C hasta su posterior uso en el iso-electroenfoque.

Se realizaron algunos geles pequeños preliminares para determinar la distribución electroforética de las proteínas de raíz de garbanzo, utilizándose tiras de isoelectroenfoque (IEF) de 7 cm, gradiente pH 3-10 lineal (Bio-Rad). Con este experimento se determinó que la mayoría de las proteínas estaban dentro del rango de 3-7 de pH en la tira. Así, en el experimento de 4-8 DAI se utilizó un gradiente de 4-7 de pH (17 cm), mientras que en el experimento a los 35-40 DAI se optó por utilizar un gradiente no-lineal de 3-10 de pH (17 cm) para escrutar más el proteoma. Se procesaron tres réplicas biológicas de cada tratamiento y genotipo de garbanzo, cada una consistente en una extracción independiente de diferentes muestras de plantas. El IEF se realizó disponiendo las tiras en los pocillos de la cámara de IEF contactando el gel con los electrodos. Las tiras se cargaron con 500 μ g ó 100 μ g de proteína, en respectivamente los experimentos de 4-8DAI (en que la tinción se hizo con Coomassie) o de 35-40DAI (en que se tiñó con Sypro Ruby), en un volumen final de 300 μ L conteniendo 9 M urea, 4 % CHAPS, 0,5 % v/v Tritón X-100, 100 mM DTT, mientras que en los geles pequeños preliminares se utilizó un volumen de 125 μ L del mismo tampón de solubilización y 150 μ g de proteína. Cada tira, junto con el tampón de rehidratación y de carga, se selló con aceite mineral para evitar la evaporación y mejorar la circulación de corriente eléctrica y todo el conjunto se dejó en la fase de absorción y rehidratación durante 16 horas. El isoelectroenfoque, tanto para las tiras de 7 cm como las de 17 cm, se llevó a cabo en un PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad) en diversas fases: fase 1, gradiente lineal hasta 250 V en 20 minutos; fase 2,

gradiente lineal hasta 4.000 V en 2 horas (7 cm) ó 10.000 V en 2,5 horas (17 cm); fase 3, gradiente exponencial hasta 4.000 V a 10.000 Vh⁻¹ (7 cm) ó 10.000 V a 40.000 Vh⁻¹ (17 cm). La temperatura de trabajo fue de 20 °C. Después del isoelectroenfoco, las tiras se almacenaron a 20 °C o se equilibraron inmediatamente incubándolas con agitación, primero en una solución conteniendo 50 mM Tris-HCl, pH 8,8, 6 M urea, 30 % glicerol (p/v), 2 % SDS (p/v), 2 % DTT (p/v) durante 15 min, y seguidamente en una solución de igual composición que la anterior pero conteniendo además 135 mM de iodoacetamida, también durante 15 min. Después de este paso, las tiras fueron utilizadas inmediatamente para realizar la segunda dimensión.

Para realizar la segunda dimensión (SDS-PAGE), las tiras de IEF se aplicaron a láminas de cristal conteniendo geles con 11 % SDS-poliacrilamida y la electroforesis se llevó a cabo a 50 mA/gel hasta que el frente de bromofenol llegó a la parte inferior del gel, utilizándose una Bio-Rad PROTEAN Plus Dodeca Cell. Tras el desarrollo, los geles de muestras de las fases iniciales de la interacción (4-8 DAI) fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue G-250 de acuerdo a las instrucciones recomendadas por el fabricante (CBB G-250; Merck, Darmstadt, Germany). Con muestras del experimento de 35-40 DAI, los geles se tiñeron con Sypro Ruby (Bio-Rad, Hercules, CA) durante 20 horas según el protocolo de Mathesius *et al.* (2001). Las imágenes de los geles teñidos con Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250; Merck, Darmstadt, Germany), fueron digitalizadas con un densitómetro GS-800 (Bio-Rad), mientras que las de los geles teñidos con Sypro Ruby se digitalizaron mediante FX-ProPlus (532 nm) MAC (Bio-Rad), con una longitud de onda de excitación de 300 nm y de emisión de 610. Las imágenes digitalizadas se analizaron con el programa PDQuest™ (Bio-Rad) usando 10 veces el fondo del gel como criterio mínimo para presencia-ausencia de manchas electroforéticas. El análisis fue re-evaluado mediante inspección visual, prestando mayor atención a las manchas electroforéticas más drásticamente alteradas en los tratamientos o con mayores diferencias constitutivas entre genotipos. Para compensar la variación de la tinción entre geles, las intensidades individuales se normalizaron respecto a la intensidad total del gel. Las masas moleculares de las proteínas fueron determinadas mediante comparación con marcadores estándar de proteínas (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, BioRad) y el punto isoeléctrico (pI) se determinó mediante la migración de las manchas electroforéticas en las tiras de isoelectroenfoco de 17 cm (pH 4-7 lineal), comparando la posición y la longitud de las tiras. Algunas de estas asignaciones de pI a manchas electroforéticas específicas en los geles con rango de pH lineal se utilizaron como referencia (al observarse las mismas manchas electroforéticas en los geles de rango de pH no-lineales) para determinar aproximadamente el pI de las manchas electroforéticas en las tiras no-lineales en el experimento de 35-40 DAI. Todos los tratamientos, con sus repeticiones, fueron estudiados en la misma comparación. El programa creó una tabla con la

cuantificación de las densidades ópticas de las manchas electroforéticas normalizadas, de las cuales, aquellas seleccionadas por sus diferencias se revisaron visualmente para comprobar la cuantificación proporcionada por el programa.

Con los datos obtenidos del experimento de las fases iniciales de la interacción, al ser un análisis de control-tratamiento, se realizó un análisis de varianza con comparación de medias mediante el test de mínima diferencia significativa (LSD) usando Statistix 8.0 (NH Analytical Software, Roseville, MN). Antes del análisis, los valores fueron normalizados mediante la transformación $\log_{10}(X)$ para determinar diferencias estadísticamente significativas en la (Gomez y Gomez, 1984; Urfer *et al.*, 2006).

En el experimento de las fases más avanzadas de la interacción (35-40 DAI), las cuantificaciones de las proteínas se estudiaron mediante el programa NIA Array Analysis (Sharov *et al.*, 2005), el cual selecciona manchas electroforéticas estadísticamente válidas mediante el análisis de varianza (ANOVA). Se siguieron varios pasos en el estudio: i) se realizó una agrupación jerárquica (“hierarchical clustering”) para revisar el conjunto de datos, y los resultados se representaron en un dendograma; ii) el conjunto de datos fue analizado mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA) usando los siguientes parámetros: tipo de matriz de covarianza, tres componentes principales, un nivel de cambio del doble de nivel de proteína y un nivel de correlación de 0,4 para las agrupaciones; los resultados del análisis PCA fueron representados en un diagrama bidimensional en el que las situaciones experimentales están situadas en el mismo área del gráfico; iii) las comparaciones dos a dos entre los promedios de la expresión de la proteínas se realizaron con los siguientes parámetros: 0,5 FDR (“False Discovery Rate”) y un nivel del doble de expresión; iv) los histogramas representando el \log de los promedios de los valores de cada proteína fueron descargados usando el programa. Las manchas electroforéticas que presentaron algún comportamiento cualitativo (manchas electroforéticas con un comportamiento de aparición/desaparición respecto a su nivel en las plantas sin inocular) fueron estudiadas mediante un análisis de varianza y test de mínima diferencia significativa (LSD) usando Statistix 8.0 (NH Analytical Software, Roseville, MN); antes del análisis, los valores fueron normalizados mediante la transformación $\log_{10}(X)$, eliminando anteriormente del análisis los valores que eran cero.

2.3.8.2.- Fluido apoplástico

La contaminación de proteínas citoplasmáticas se determinó mediante medida de la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), siguiéndose la metodología utilizada por García-Limones (2003) en garbanzo. La mezcla de ensayo contenía tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7,6,

MgCl₂ 6,9 mM, glucosa 6-P 1 mM, NADP⁺ 0,39 mM y de entre 60 a 200 µL de extracto enzimático (fluido apoplástico). La reacción se inició con la adición del NADP⁺ y se registró la formación de NADPH siguiendo el aumento de la absorbancia a 340 nm ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Una unidad de actividad G6PDH es definida como la cantidad de enzima que produce 1 µmol min⁻¹ de NADPH bajo las condiciones de ensayo anteriores. Esta actividad del fluido apoplástico, expresada como porcentaje de la actividad de extractos brutos de tejido radical obtenidos por homogeneización en el mismo buffer, se consideró como grado de contaminación citoplasmática de aquel.

En un principio se intentó obtener el fluido extracelular sin utilizar ningún tipo de solución de extracción. Para ello, las raíces se limpiaron cuidadosamente de cualquier partícula de suelo adherida, mediante lavados con agua y posteriormente con agua destilada, y se introdujeron en tubos de centrifuga (10 ml, 1,5 cm de diámetro) a los que se les había acoplado un tubo eppendorf en el fondo y sobre él una rejilla, de forma que el posible fluido xilemático-intercelular fuese cayendo dentro del tubo y no estuviese en contacto directo con las raíces. El fluido se recolectó mediante centrifugación (10 min, 2.900 *g*, 4°C) (García Limones, 2003). Sin embargo, el contenido de proteínas fue muy escaso (datos no mostrados).

En un segundo experimento, las muestras de raíces se suspendieron en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 6, conteniendo 40 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂ y 5 mM de ascorbato sódico sometándose a 20 periodos de presión negativa en Speed-Vac (Concentrator 5301, Eppendorf), durante 30 s cada uno (García-Limones, 2003). Las soluciones de infiltración se recogieron por centrifugación, tal como se describió para el fluido xilemático, manteniéndose en frío hasta su procesamiento.

Los extractos de proteínas apoplásticas se desalinizaron mediante diálisis, a través de una membrana de celulosa de 12 KDa de corte (Sigma), realizada frente a 2000 volúmenes de agua mili-Q a 4°C durante 12 horas, y posteriormente se concentraron mediante liofilización (Flexi-dry™, FTS Systems).

La separación de proteínas mediante SDS-PAGE se realizó usando el sistema Mini-PROTEAN II (Bio-Rad), de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Para ello, se utilizaron geles de poliacrilamida al 12% T, para el gel concentrador, y 3% T, para el separador. Las muestras se mezclaron en proporción 1:1 (v/v) con tampón de carga [Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, 4% (p/v) de SDS, 20% (v/v) de glicerol, 0,05% (p/v) de azul de bromofenol y 20 mM de DTT] y se calentaron a 95°C durante 10 min. En todos los pocillos se cargó la misma cantidad de proteína. Como tampón de carrera se usó Tris 25 mM, glicina 195 mM, pH 8,3, conteniendo 0,1% (p/v) de SDS. El desarrollo electroforético se efectuó a 200 V durante, aproximadamente, 50 min. Se emplearon marcadores de peso molecular para SDS-PAGE de 10 a 250 KDa (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad).

Tras el desarrollo de la electroforesis, los geles se tiñeron con Coomassie siguiendo el protocolo siguiente (Neuhoff *et al.*, 1985): incubación con agitación durante una hora en solución de tinción [Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) 0,1 % (p/v), metanol 40 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v)], seguida de similar incubación en la solución de desteñido [metanol 40 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v)] hasta decoloración completa, y finalmente mantenimiento en agua destilada. Las diferencias de manchas electroforéticas entre las distintas inoculaciones se evaluaron visualmente, al obtenerse electroforegramas bastante simples.

2.3.9.- DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS EN GEL E IDENTIFICACIÓN POR HUELLA PEPTÍDICA

Las proteínas de interés se recortaron del gel automáticamente en una estación Investigator ProPic (Genomic Solutions). Los fragmentos de gel resultantes se digirieron con tripsina, también de manera automática, en una estación ProGest (Genomic Solutions) con las siguientes condiciones: dos pasos de desteñido de 30 minutos con 40% acetonitrilo/200mM bicarbonato amónico; dos rondas de lavado con 25mM bicarbonato amónico durante 5 minutos y 25mM bicarbonato amónico/50% acetonitrilo durante 15 minutos, respectivamente; deshidratación con 100% acetonitrilo durante 5 minutos y secado de la muestra; hidratación con 10 μ L de tripsina a 12,5 ng/ μ L en 25mM bicarbonato amónico durante 10 minutos a temperatura ambiente y posterior digestión a 37°C durante 12 horas. La digestión se detuvo añadiendo a cada muestra 10 μ L de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5% en agua.

Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina se purificaron de manera automática en una estación ProMS (Genomic Solutions), mediante una microcolumna de resina C18 (ZipTip, Millipore), eluyéndose directamente con una solución de matriz (3 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidoxicinámico en 70% acetonitrilo/0,1% TFA) sobre la placa MALDI en un volumen de 1 μ L. Tras la co-cristalización sobre la placa, las muestras se analizaron en el rango m/z de 800 a 4000 Da mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para obtener la huella peptídica (MS), usándose un espectrómetro 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) en modo automático. Se realizó calibración interna de los espectros utilizando las relaciones masa/carga (m/z) de los péptidos resultantes de la autólisis de la tripsina porcina ($M+H^+=842.509$, $M+H^+=2211.104$), obteniéndose de esta manera una precisión en la medida de las m/z de ± 20 ppm. De cada muestra se obtuvieron espectros de fragmentación (MS/MS) de las tres m/z más intensas.

La identificación de proteínas se realizó combinando los espectros MS y sus correspondientes MS/MS usando MASCOT (MatrixScience, UK) como motor de búsqueda sobre la base de datos MSDB, limitando la categoría taxonómica a (Plantas, Mamíferos,... según las muestras), con carbamidometilación completa de los residuos de cisteína y oxidación parcial de los residuos de metionina. El error máximo permitido en la búsqueda fue de 100 ppm y el número máximo de errores en el corte de la proteasa fue uno.

La asignación de funciones metabólicas se realizó mediante la clasificación de la proteína en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL, así como en artículos relacionados con la proteína en estudio.

2.4.- RESULTADOS

2.4.1.- FASES DEL CICLO PARASÍTICO DE *MELOIDOGYNE ARTIELLIA*

Los periodos observados determinaron los hitos más importantes en el ciclo parasítico de *M. artiellia*, entre ellos (Fig. 2.6):

- 1 DAI: no había penetrado ningún juvenil en las raíces.
- 2 DAI: se observan juveniles de segunda edad penetrando la raíz y migrando intercelularmente en el parénquima cortical.
- 4 DAI: los juveniles de segunda edad se han fijado en las proximidades del cilindro vascular y han estimulado la formación del sitio de alimentación.
- 8 DAI: se observa que los juveniles de segunda edad están anclados en el punto de alimentación y engrosando, pero sin apreciarse todavía ninguna muda de la cutícula.
- 14 DAI: los juveniles de segunda edad han realizado las dos mudas, siendo por tanto J4, y se observan más engrosados que en la fase anterior.
- 18 DAI: se puede observar el sitio de alimentación en la raíz decolorada sin seccionar y los nematodos han pasado al estado adulto.
- 21 DAI: se observa cierta degradación de las células del córtex en la zona posterior de la hembra, lo cual nos puede indicar la cercanía de la deposición de huevos y de la matriz gelatinosa secretada por las glándulas rectales que los envuelve.
- 26 DAI: se observan algunas hembras con la masa gelatinosa englobando a un número reducido de huevos.

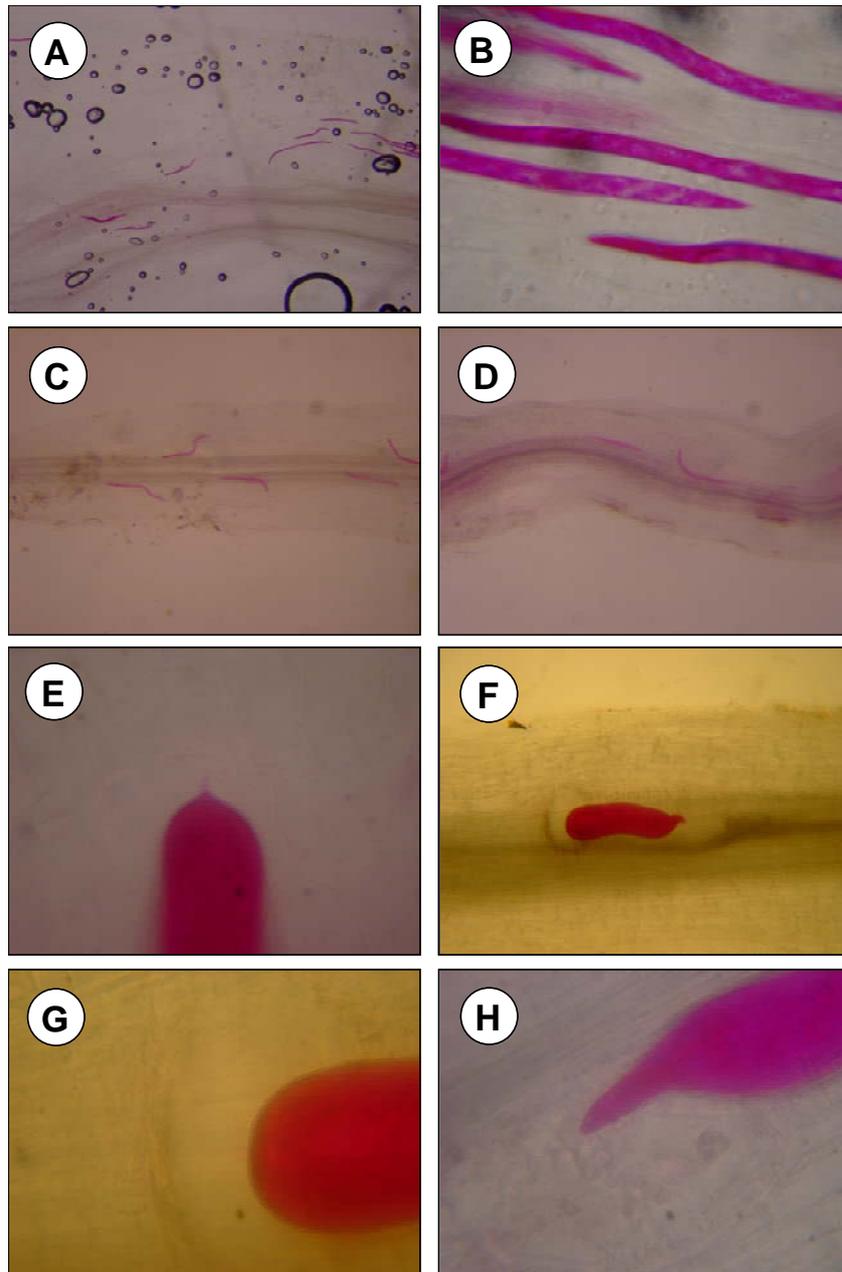


Figura 2.6.- Diferentes estadios del ciclo parasítico de *M. artiellia* en garbanzo (línea CA336.14.3.0). A) y B) 2 DAI, migración intercelular de los juveniles de segunda edad en el córtex; C) 4 DAI, fijación de los nematodos al córtex de la raíz e inicio de la formación del sitio de alimentación; D) 8 DAI, engrosamientos de los juveniles de segunda edad; E) 18 DAI, juvenil de cuarto estadio junto con la degradación de las células del córtex asociada a la formación de la matriz gelatinosa; F) 18 DAI, hembra adulta en la raíz, se observa el sitio de alimentación y la formación de la matriz gelatinosa junto con la degradación de las células del córtex; G) detalle de la parte posterior de la hembra observándose cierta degradación de las células del córtex; H) detalle del sitio de alimentación a los 18 DAI

2.4.2.- TEST DE PENETRACIÓN DE 'CA336.14.3.0' E 'ICC14216K' EN PERIODOS INICIALES DE LA INTERACCIÓN

El número medio de juveniles de segunda edad de *M. artiellia*, que habían penetrado en la raíz a las 48 horas después de la inoculación, fue de $849,5 \pm 74,6$ para la línea CA336.14.3.0 y $836,3 \pm 74,3$ para la línea ICC14216K, lo que supone que ambas líneas, con unos porcentajes superiores al 80%, no presentan diferencias significativas de penetración (Fig. 2.7).

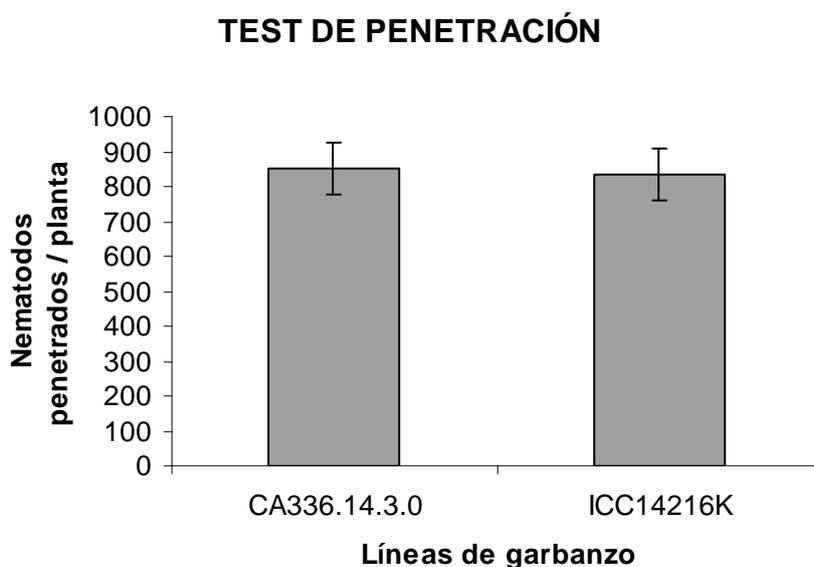


Figura 2.7.- Número de juveniles de segunda edad de *M. artiellia* penetrados en la raíz de plántulas de garbanzo (líneas CA33614.3.0 e ICC14216K) a las 48 horas posteriores a la inoculación. Los valores representados son la media \pm desviación estándar (n= 40).

2.4.3.- RESPUESTA PROTEÓMICA EN FASES INICIALES DE LA INTERACCIÓN (4 Y 8 DAI)

En un experimento inicial se consideró la posibilidad de realizar diversos muestreos, como 2, 4, 8 y 18 DAI, a tiempos coincidentes con los siguientes hitos principales en la biología de *M. artiellia* y la germinación de clamidosporas de *Foc-5*: 2 DAI, penetración y migración intercelular del nematodo y posible primer contacto con clamidosporas germinadas cercanas a la raíz; 4 DAI, primera interacción alimenticia y fijación del nematodo en la planta, inicio de la formación del sitio de alimentación; 8 DAI, fase de alimentación del nematodo y desarrollo completo de las células gigantes; 18 DAI, desarrollo completo de la hembra y secreción de enzimas por las glándulas

anales, lo que permite degradar el tejido vegetal para poder sobresalir el cuerpo de la hembra y comenzar la producción de la masa gelatinosa y huevos. Se analizaron los diversos periodos iniciales mediante experimentos proteómicos preliminares, para determinar en qué momento hacer mayor esfuerzo en la obtención de material vegetal y determinar posibles efectos de dilución de la respuesta en el total de proteínas de la planta (las técnicas proteómicas no permiten la amplificación de la respuesta, por lo que una posible dilución de ésta hasta límites indetectables siempre tiene que ser considerada). Los resultados de estos experimentos preliminares indicaron que a 2 DAI no se observaba respuesta proteómica en ninguna de las combinaciones del experimento, mientras que en los restantes tiempos (4, 8 y 18 DAI) sí se apreciaba alguna respuesta a la inoculación con *Foc-5* y ambos patógenos, pero no a la inoculación simple con *M. artiellia*. La falta de respuesta específica al nematodo a todos los tiempos ensayados se interpretó que podría deberse a la dilución de ésta dado su carácter localizado en puntos discretos del tejido radical muestreado, mientras que la falta de respuesta al hongo a 2 DAI se interpretó que podría deberse a la falta de germinación de las clamidosporas y/o penetración del hongo a este tiempo.

A partir de los resultados anteriores, el experimento se redujo a la interacción de ambas líneas de garbanzo con *Foc-5* a los tiempos de 4 y 8 DAI. Las muestras correspondientes se analizaron mediante 2-DE, utilizándose IEF en el rango de pH 4-7 (lineal) en la primera dimensión y SDS-PAGE en geles del 11% en la segunda. Previamente, utilizando geles analíticos de pequeño tamaño (7 cm) y un rango más amplio de pH (3-10, lineal), se había concluido que aquéllas eran condiciones idóneas para la resolución de las proteínas de las muestras. Los geles se compararon entre sí para determinar las posibles diferencias, tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo, dentro de cada línea por efecto de los tratamientos y tiempos de inoculación, así como las posibles diferencias constitutivas entre las dos líneas.

El promedio de manchas electroforéticas bien definidas fue en todos los casos de alrededor de 500, siendo la mayoría de ellas reproducibles entre geles y tratamientos (Fig. 2.8). En cualquier caso, sólo se tomaron en consideración las manchas electroforéticas (spots) que se encontraban al menos en dos de las tres repeticiones biológicas realizadas.

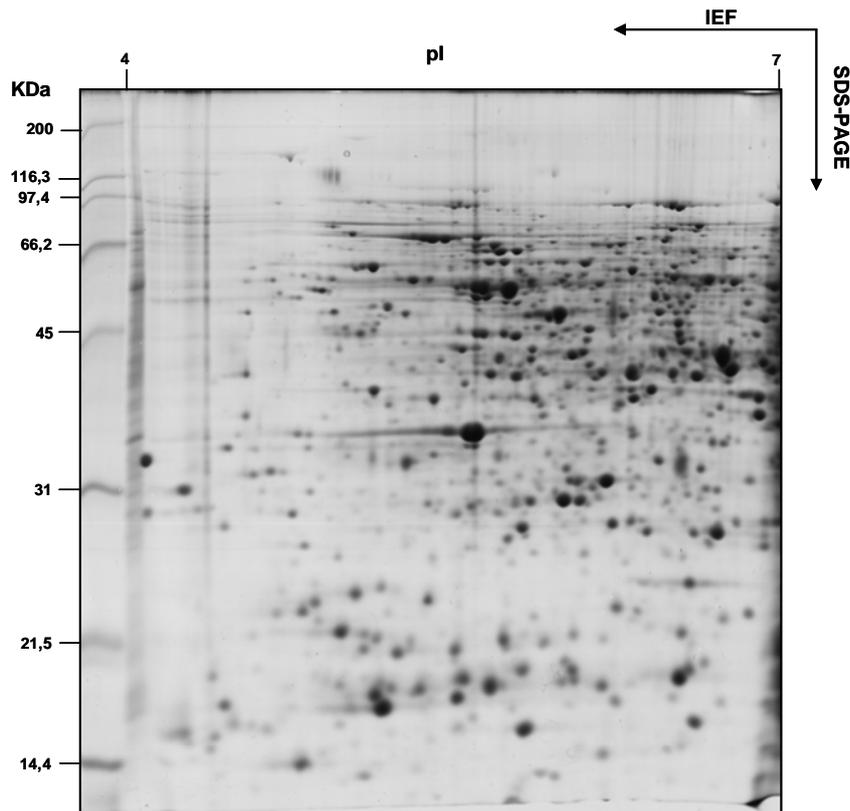


Figura 2.8.- Gel bidimensional de raíces de la línea de garbanzo ICC14216K a los 8 DAI. Teñido con Coomassie G-250 (Bio-Rad), los marcadores de peso molecular están situados a la izquierda del gel y el punto isoelectrico en la parte superior (4 – 7 lineal). Se cargaron 500 µg de proteína en cada gel. Gel realizado con tiras de isoelectroenfoque de 17 cm de longitud.

En el primer periodo de muestreo, 4 DAI, se observaron 15 diferencias, distribuidas como sigue: 5 diferencias comparando controles con plantas inoculadas de 'CA336.14.3.0' (Fig. 2.9A); 3 comparando controles y plantas inoculadas de 'ICC14216K' (Fig. 2.9B); y 7 proteínas diferenciales al comparar las plantas sin inocular de ambos genotipos (Fig. 2.11A).

En el segundo tiempo de muestreo, 8 DAI, también se observaron 15 diferencias, distribuidas como sigue: 5 diferencias comparando controles con plantas inoculadas de 'CA336.14.3.0' (Fig. 2.10); ninguna diferencia comparando controles y plantas inoculadas en 'ICC14216K'; y 10 proteínas diferenciales al comparar las plantas sin inocular de ambos genotipos (Fig. 2.11B).

Solamente una proteína estuvo repetida en la comparación entre los controles de ambos genotipos, la proteína SSP1107 en 4 DAI y la SSP1008 en 8 DAI, siempre mostrando un mayor nivel en 'ICC14216K' que en 'CA336 14.3.0'.

Así pues, la respuesta a la inoculación con *Foc-5* en fases iniciales de la interacción fue bastante débil, lo cual resulta especialmente aplicable a la línea ICC14216K que a los 8 DAI no mostró respuesta alguna. Comparativamente, las diferencias más notables se observaron al comparar las plantas no inoculadas de las dos líneas en ambos periodos.

Entre las anteriores 30 proteínas cuya presencia mostró diferencias cualitativas o cuantitativas, 22 fueron identificadas con proteínas que, salvo en un caso, tuvieron asignadas funciones (Tablas 2.2-2.5). Sólo 4 de las identificaciones, lo fueron con proteínas de garbanzo, mientras que el resto fueron identificaciones por homología con proteínas de otras especies (3 de otras leguminosas, 7 de cereales, 4 de *Arabidopsis*, 2 de *Nicotiana tabacum*, y una de *Elaeagnus umbellata* Thumb y de *Saussurea medusa* Maxim). Pese a lo anterior, una mayoría de las proteínas presentaron una buena puntuación en la identificación realizada por el motor de búsqueda en bases de datos MASCOT. La no identificación de las 8 proteínas diferenciales restantes, puede ser debida a que no se encuentren representadas en las bases de datos ó a que no estén en concentración suficiente en el gel para generar buenos espectros para la búsqueda en las bases de datos. Todas las proteínas diferenciales con función conocida se encontraron presentes tanto en las plantas inoculadas como en los controles sin inocular, por lo que en ningún caso se trata de proteínas contaminantes constitutivas del hongo.

Respecto a las proteínas identificadas cuya presencia se modificó cuantitativamente en respuesta a la inoculación con *Foc-5*, en 'CA336.14.3.0' se detectó a los 4 DAI una disminución en el contenido respecto al control de dos isoformas de S-adenosil-L-metionina sintasa, identificadas en *Arabidopsis thaliana* y *Elaeagnus umbellata*, y un incremento de una proteína ribosomal identificada en *Hordeum vulgare* (Tabla 2.2); mientras que a 8 DAI, se observó una disminución de los contenidos de tres proteínas identificadas con, respectivamente, una chalcona isomerasa de *Saussurea medusa*, un fragmento de una probable subunidad beta 3 del proteasoma de *Nicotiana tabacum* y una proteína de glicosilación reversible y función a nivel de la modificación de la pared celular procedente de *Phaseolus vulgaris* (Tabla 2.4). A su vez, la única identificación con función conocida efectuada en 'ICC14216K' correspondió a la de un enzima glicolítico, la fructosa bisfosfato aldolasa de garbanzo, cuyo contenido a 4 DAI decreció respecto al control (Tabla 2.2).

Frente a las siete modificaciones anteriores que pudieron asociarse a la respuesta a *Foc-5*, un número exactamente doble fue el que correspondió a las proteínas de función conocida cuya presencia constitutiva en ambas líneas varió bien de forma cuantitativa o cualitativa, cosa esta última que sólo ocurrió en un caso (la de una proteína, identificada con una probable proteína ribosomal S12 de arroz, que sólo se detectó a 8 DAI en los controles de 'CA336.14.3.0'; Tabla 2.5). Así, en fases iniciales (4 DAI) se observaron mayores contenidos constitutivos en 'ICC14216K', respecto a 'CA336.14.3.0', de 5 proteínas, mientras que sucedió lo contrario con 2 proteínas. A destacar que 4 de las anteriores 7 proteínas fueron identificadas con proteínas de estrés y respuesta defensiva, tres de ellas del propio garbanzo (Tabla 2.3). En concreto, estas 4 proteínas funcionalmente relacionadas con respuestas al estrés y/o patógenos se identificaron,

respectivamente, con: 1) un fragmento de una proteína hipotética de 10,3 KDa, identificada en *C. arietinum*, la cual se encuentra a un menor nivel en 'ICC14216K'; 2) una proteína de resistencia a enfermedades, la rps 4, identificada en *Arabidopsis thaliana*; 3) una proteína relacionada con la patogénesis identificada en *C. arietinum*; y 4) una proteína inducida por ácido abscísico, también identificada en *C. arietinum*, presentándose las 3 últimas en un mayor nivel en 'ICC14216K'. En 8 DAI, fueron sólo 2 las proteínas de función conocida que estuvieron presentes en mayor cantidad en 'ICC14216K' que en 'CA336.14.3.0', sucediendo lo contrario con otras 4 proteínas mientras que una adicional, la ya comentada proteína con analogía a la probable proteína ribosomal S12 de arroz, se detectó únicamente en 'CA336.14.3.0' (Tabla 2.5). Entre estas proteínas, que funcionalmente constituyen un conjunto más diverso que el expresado diferencialmente entre líneas a 4 DAI, se podrían destacar las identificadas con: 1) "TGB12K proteína de interacción 2" de *N. tabacum*, que se encuadra funcionalmente en la respuesta al estrés y/o patógenos; 2) un dominio de tioredoxina identificado en *Medicago truncatula*, con posible función antioxidante; 3) una proteína de tipo citocromo P-450; y 4) un probable elemento transponible de *Oryza sativa*, todas las anteriores, salvo la última, con un mayor nivel en 'CA336.14.3.0' que en 'ICC14216K' (Tabla 2.5).

En resumen, las proteínas identificadas muestran que, desde el punto de vista de la interacción planta-patógeno, las funciones modificadas en orden decreciente de importancia son (entre paréntesis se indica el número de proteínas afectadas): metabolismo (3), síntesis y degradación de proteínas (2), y metabolismo secundario (1). A su vez, la comparación entre plantas sin inocular muestra que las diferencias se circunscriben a las siguientes funciones en orden decreciente de importancia (entre paréntesis se indica el número de proteínas afectadas): estrés y respuesta defensiva (5), unión a nucleótidos (3), metabolismo (2), transporte de electrones (2), síntesis y degradación de proteínas (1), y transporte (1).

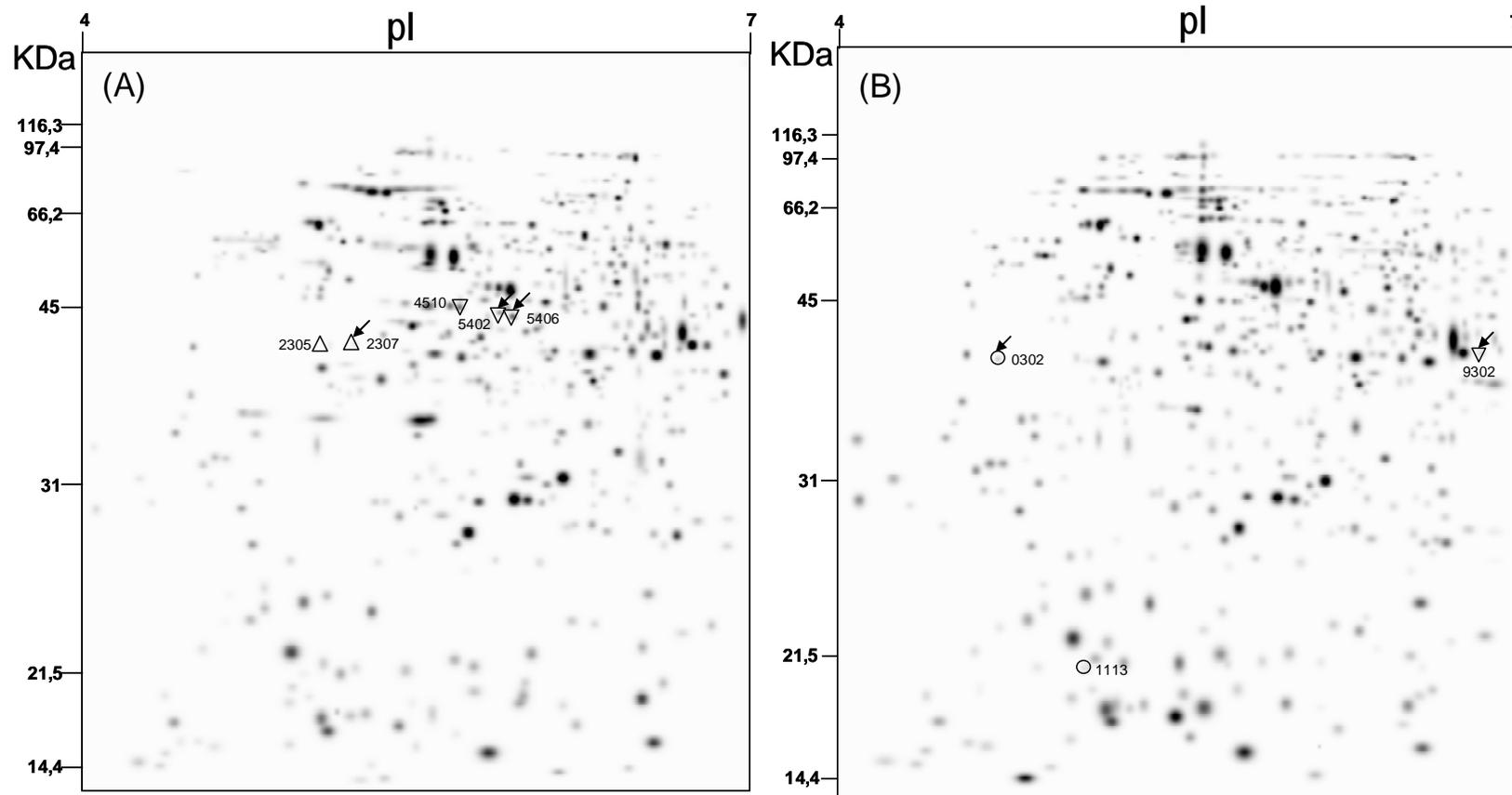


Figura 2.9.- Geles virtuales maestros del proteoma radical de las líneas de garbanzo CA336.14.30 e ICC14216K a los 4 DAI mostrando las manchas electroforéticas diferenciales entre la plantas inoculadas y sin inocular con *Foc-5*. (A) línea CA336.14.30 y (B) línea ICC14216K. Las manchas electroforéticas diferenciales están nombradas en el gel por su número de localización y las flechas indican la identificación correcta. Triángulo con vértice hacia arriba, significa un incremento de contenido respecto a las plantas sin inocular; triángulo con vértice hacia abajo, significa una disminución de contenido respecto a los plantas sin inocular; círculo, regulación cualitativa (aparición ó desaparición) respecto a las plantas sin inocular. Los marcadores de peso molecular están situados en la derecha, expresados en KDa y el punto isoelectrico en la parte superior del gel. Se cargaron 500 μ g de proteína por gel.

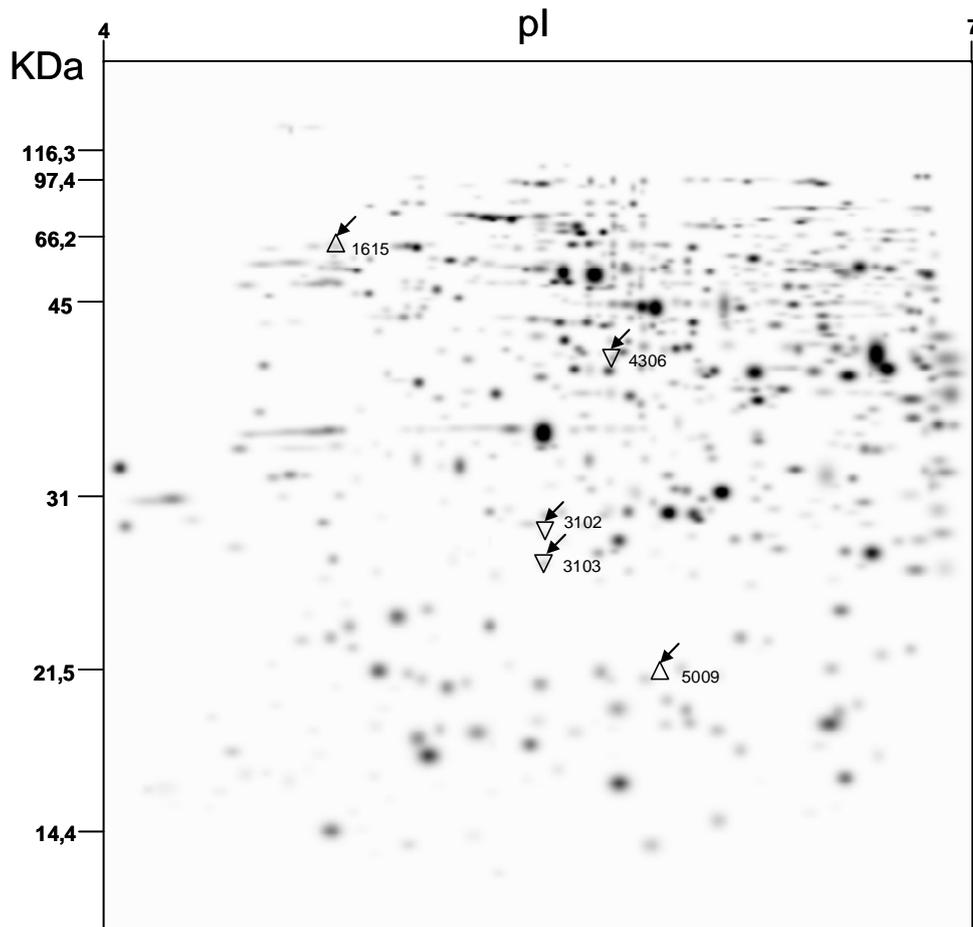


Figura 2.10.- Gel virtual maestro del proteoma radical de la línea de garbanzo CA336.14.3.0 a los 8 DAI mostrando las manchas electroforéticas diferenciales entre la plantas inoculadas y sin inocular con *Foc-5*. Las manchas electroforéticas diferenciales están nombradas en el gel por su número de localización y las flechas indican la identificación correcta. Triángulo con vértice hacia arriba, significa un incremento de contenido respecto a las plantas sin inocular; triángulo con vértice hacia abajo, significa una disminución de contenido respecto a las plantas sin inocular; círculo, regulación cualitativa (aparición ó desaparición) respecto a las plantas sin inocular. Los marcadores de peso molecular están situados en la derecha, expresados en KDa y el punto isoeléctrico en la parte superior del gel. Se cargaron 500 μ g de proteína por gel.

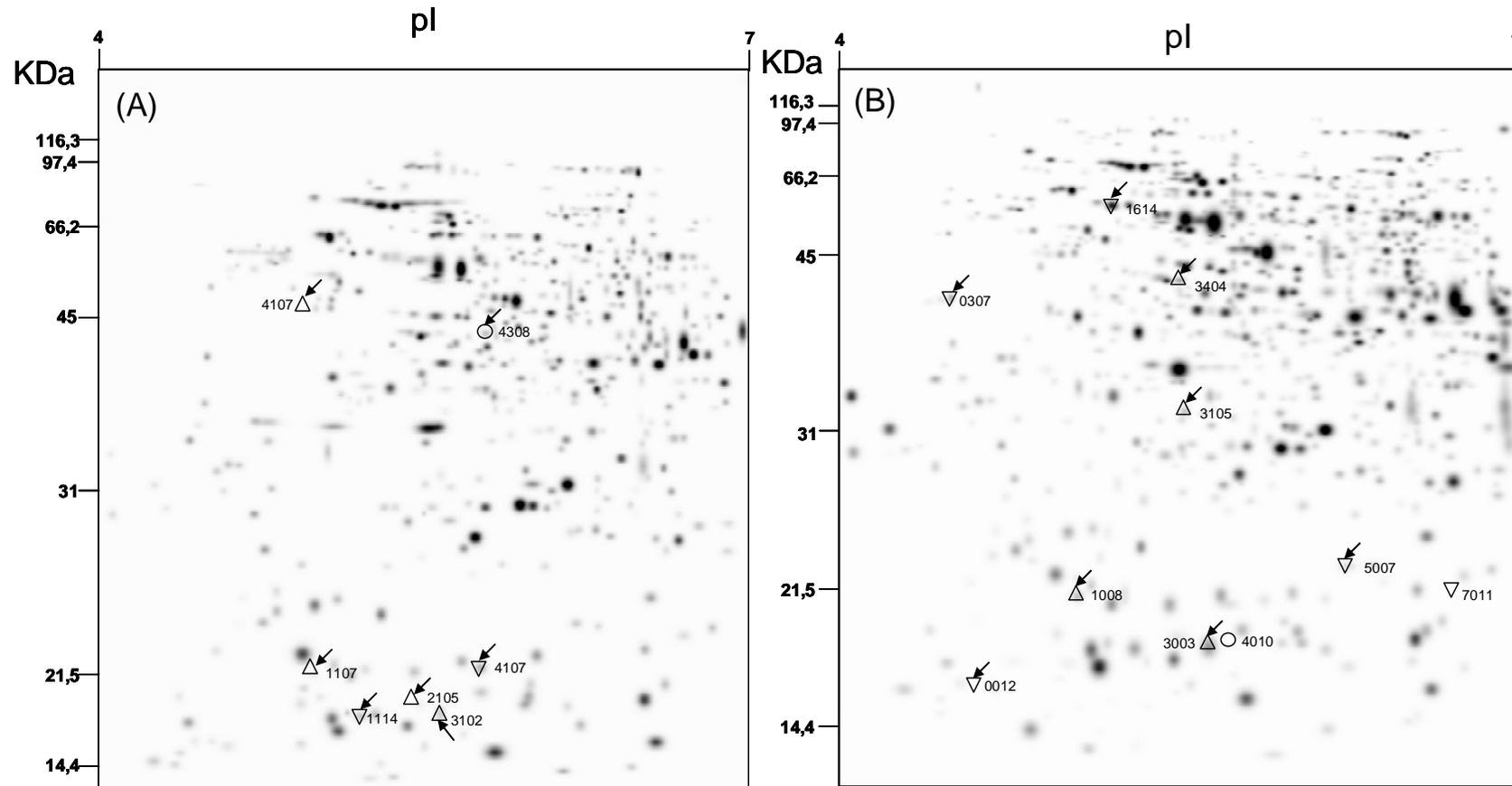


Figura 2.11.- Geles virtuales maestros del proteoma radical de las líneas de garbanzo CA336.14.3.0 e ICC14216K a los 4 y 8 DAI mostrando las manchas electroforéticas diferenciales entre ambas líneas en plantas sin inocular. (A) 4 DAI y (B) 8 DAI. Las proteínas están nombradas en el gel por su número de localización y las flechas indican la identificación correcta. Triángulo con vértice hacia arriba, significa un contenido superior en 'ICC14216K' respecto a 'CA336.14.3.0'; triángulo con vértice hacia abajo, significa un contenido inferior en 'ICC14216K' respecto a 'CA336.14.3.0'; círculo, cambio cualitativo (aparición ó desaparición). Los marcadores de peso molecular están situados en la derecha, expresados en KDa y el punto isoelectrico en la parte superior del gel. Se cargaron 500 µg de proteína por gel.

TABLA 2.2. Proteínas modificadas en raíces de garbanzo (líneas CA 336.14.3.0 e ICC14216K) inoculadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* raza 5 a los 4 DAI.

N°	Proteína	Especie	MASCOT ^c	Masa molecular (KDa) (observada/teórica)	Punto isoelectrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Posible función ^a	Intensidad		
								Tratamiento ^b	(ppm) ^d	
CA336.14.3.0 - 4 DAI										
Sobre-expresadas (cuantitativamente ó cualitativamente)										
SSP2305	No identificada			41,79	5,13			Control	202,2±138,8	b
								<i>Foc-5</i>	1.003,4±333,7	a
SSP2307	Proteína ribosomal L24 (P50888)	<i>Hordeum vulgare</i>	94(10)	41,89/18,56	5,24/10,56	50	Síntesis y degradación de proteínas	Control	334,8±198,8	b
								<i>Foc-5</i>	1.097,7±70,4	a
Reprimidas (cuantitativamente ó cualitativamente)										
SSP4510	No identificada			46,43	5,71			Control	396,6±192,1	a
								<i>Foc-5</i>	127,5±24,7	b
SSP5402	S-adenosilmetionina sintetasa (P23686)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	235(10)	44,60/40,62	5,89/8,77	26	Metabolismo	Control	817,4±105,2	a
								<i>Foc-5</i>	189,8±41,6	b
SSP5406	S-adenosilmetionina sintetasa (Q9AT56)	<i>Elaeagnus umbellata</i>	238(7)	44,23/43,53	5,95/6,27	19	Metabolismo	Control	1.666,3±286,4	a
								<i>Foc-5</i>	385,2±78,3	b
ICC14216K - 4 DAI										
Sobre-expresadas (cuantitativamente ó cualitativamente)										
SSP302	X1 (Fragmento) (Q3T7E5)	<i>Zea mays</i> subsp. <i>parviglumis</i>	87(13)	39,77/	4,76/8,5	19	Desconocida	Control	-	
								<i>Foc-5</i>	474,2±26,0	
SSP1113	No identificada			20,11	5,14			Control	-	
								<i>Foc-5</i>	685,9±73,9	
Reprimidas (cuantitativamente ó cualitativamente)										
SSP9302	Fructosa-bifosfato aldolasa, citoplasmática (O65735)	<i>Cicer arietinum</i>	227(16)	40,24/38,60	6,86/6,21	44	Metabolismo	Control	2.649,8±903,4	a
								<i>Foc-5</i>	815,9±140,5	b

^a Las proteínas han sido clasificadas según las funciones asignadas en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL así como en la literatura científica. Algunas proteínas pueden poseer múltiples funciones, seleccionándose la más importante para clasificar las proteínas en categorías.

^b Control = plantas no inoculadas. *Foc-5* = plantas inoculadas con 30.000 clamidosporas por g de suelo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5.

^c *Mascot score*^e y, entre paréntesis, número de péptidos coincidentes en la identificación.

^d ppm = partes por millón de proteína en cada tratamiento. Las medias seguidas por letras muestran su posible separación entre tratamientos mediante el test LSD. Los datos fueron transformados mediante $\log(X)$ para su análisis, las medias \pm desviación estándar sin transformar son representadas en esta tabla.

TABLA 2.3. Proteínas constitutivas diferenciales en raíces de garbanzo (líneas CA 336.14.3.0 e ICC14216K) al comparar los controles sin inocular de ambas líneas a los 4 DAI.

N°	Proteína	Especie	MASCOT ^c	Masa Molecular (KDa) (observada/teórica)	Punto isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Posible función ^a	Intensidad		
								Tratamientos ^b	(ppm) ^d	
Nivel superior en ICC14216K										
SSP1107	OSJNBb0118P14.10 protein (Q7XVG0)	<i>Oryza sativa</i>	92 (14)	21,53/108,43	4,36/5,85	17	Unión a nucleótidos	CA336.14.3.0	188,2±116,5	b
								ICC14216K	1.761,5±250,5	a
SSP1403	Proteína de resistencia a enfermedades rps 4 (imported) (T51141)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	77 (18)	47,2/13,95	4,40/8,24	16	Estrés y respuesta defensiva	CA336.14.3.0	64,9±56,2	b
								ICC14216K	282,2±110,0	a
SSP2105	Probable proteína sensible a ácido abscísico (ABA) (Q9SMK8)	<i>Cicer arietinum</i>	150 (11)	18,51/16,66	4,99/5,17	22	Estrés y respuesta defensiva	CA336.14.3.0	484,1±477,2	b
								ICC14216K	3.245,7±1821,7	a
SSP3102	Proteína PR (Q39450)	<i>Cicer arietinum</i>	164(9)	17,80/16,93	5,13/5,48	21	Estrés y respuesta defensiva	CA336.14.3.0	2.630,8±1771,4	b
								ICC14216K	11.355,3±3493,7	a
SSP4308	Fosfoglicerato kinasa, citosólica (EC 2.7.2.3) (Q9LKJ2)	<i>Pisum sativum</i>	114(10)	41,31/42,25	5,34/5,73	34	Metabolismo	CA336.14.3.0	-	b
								ICC14216K	314,8±128,0	a
Nivel inferior en ICC14216K										
SSP1114	Proteína hipotética de 10,3 KDa (fragmento) (Q9LEN3)	<i>Cicer arietinum</i>	85 (6)	17,90/10,38	4,59/4,7	15	Estrés y respuesta defensiva	CA336.14.3.0	1.096,3±818,9	a
								ICC14216K	72,4±358,1	b
SSP4107	Factor de iniciación de la transcripción eucariótico 5A-2 (Q10CJ2)	<i>Oryza sativa</i>	113 (2)	21,60/13,64	5,2/6,69	19	Unión a nucleótidos	CA336.14.3.0	2.621,4±187,0	a
								ICC14216K	50,2±14,6	b

^a Las proteínas han sido clasificadas según las funciones asignadas en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL así como en la literatura científica. Algunas proteínas pueden poseer múltiples funciones, seleccionándose la más importante para clasificar las proteínas en categorías.

^b Plantas control no inoculadas.

^c *Mascot score*^e y, entre paréntesis, número de péptidos coincidentes en la identificación.

^d ppm = partes por millón de proteína en cada tratamiento. Las medias seguidas por letras muestran su posible separación entre tratamientos mediante el test LSD. Los datos fueron transformados mediante $\log(X)$ para su análisis, las medias \pm desviación estándar sin transformar son representadas en esta tabla.

TABLA 2.4. Proteínas modificadas en raíces de garbanzo (línea CA 336.14.3.0) inoculadas con *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* raza 5 a los 8 DAI.

N°	Proteína	Especie	MASCOT ^c	Masa molecular (observada/teórica)	Punto isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Posible función ^a	Intensidad		
								Tratamientos ^b	(ppm) ^d	
CA336.14.3.0 - 8 DAI										
Sobre-expresadas (cuantitativamente ó cualitativamente)										
SSP1615	No identificada		-	58,84	4,83	-	-	Control	32,9±21,2	b
								<i>Foc-5</i>	226,2±66,0	a
SSP5009	No identificada		-	22,18	5,95	-	-	Control	18,2±19,9	b
								<i>Foc-5</i>	113,6±28,7	a
Reprimidas (cuantitativamente ó cualitativamente)										
SSP3102	Chalcona isomerasa (Q8LKP9)	<i>Saussurea medusa</i>	67(3)	29,30/24,98	5,52/4,95	16	Metabolismo secundario	Control	254,9±28,9	a
								<i>Foc-5</i>	84,4±37,3	b
SSP3103	Probable subunidad beta 3 del proteasoma (fragmento) (Q93X33)	<i>Nicotiana tabacum</i>	290(14)	27,65/20,12	5,53/5,08	55	Síntesis y degradación de proteínas	Control	584,9±83,1	a
								<i>Foc-5</i>	249,6±103,9	b
SSP4306	Proteína glicosilada reversiblemente (Q69F96)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	222(22)	41,82/40,74	5,77/6,24	33	Proteínas modificadoras de la pared celular	Control	866,5±140,9	a
								<i>Foc-5</i>	305,1±86,2	b

^a Las proteínas han sido clasificadas según las funciones asignadas en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL así como en la literatura científica. Algunas proteínas pueden poseer múltiples funciones, seleccionándose la más importante para clasificar las proteínas en categorías.

^b Control = plantas no inoculadas. *Foc-5* = plantas inoculadas con 30.000 clamidosporas por g de suelo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5.

^c *Mascot score*^b y, entre paréntesis, número de péptidos coincidentes en la identificación.

^d ppm = partes por millón de proteína en cada tratamiento. Las medias seguidas por letras muestran su posible separación entre tratamientos mediante el test LSD. Los datos fueron transformados mediante $\log(X)$ para su análisis, las medias \pm desviación estándar sin transformar son representadas en esta tabla.

TABLA 2.5. Proteínas constitutivas diferenciales en raíces de garbanzo (líneas CA 336.14.3.0 e ICC14216K) al comparar los controles sin inocular de ambas líneas a los 8 DAI.

N°	Proteína	Especie	MASCOT ^c	Masa molecular (observada/teórica)	Punto isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura	Posible función ^a	Intensidad		
								Tratamientos ^b	(ppm) ^d	
Nivel superior en ICC14216K										
SSP1008	OSJNBb0118P14.10 protein (Q7XVG0)	<i>Oryza sativa</i>	92 (14)	21,12/108,43	5,03/5,85	17	Unión a nucleótidos	CA336.14.3.0	93,7±68,1	b
								ICC14216K	1.221,6±526,7	a
SSP3003	Probable elemento transposable (Q8LME)	<i>Oryza sativa</i>	63 (14)	17,94/82,51	5,60/9,02	15	Unión a nucleótidos	CA336.14.3.0	1.088,9±300,3	b
								ICC14216K	3.965,7±941,2	a
SSP3105	Kinesin-like protein (Q9M0X6)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	74 (15)	32,24/88,39	5,5/6,99	16	Transporte	CA336.14.3.0	217,1±49,5	b
								ICC14216K	554,9±224,3	a
Nivel inferior en ICC14216K										
SSP0012	Citocromo P450 (protein-like) (Fragmento).- (CYP86B1) (Q9FMY1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	75 (13)	15,93/64,80	4,62/6,5	23	Transporte de electrones	CA336.14.3.0	330,5±54,2	a
								ICC14216K	24,6±24,5	b
SSP0307	TGB12K proteína interacción 2 (Q84P56)	<i>Nicotiana tabacum</i>	232 (5)	40,50/37,54	4,48/4,46	18	Estrés y respuesta defensiva	CA336.14.3.0	1.358,8±95,9	a
								ICC14216K	750,8±181,7	b
SSP1614	AP004308 NID (sacarosa sintasa) (BAC16025)	<i>Oryza sativa</i>	186 (6)	56,02/53,72	5,12/5,15	12	Metabolismo	CA336.14.3.0	2.361,4±333,7	a
								ICC14216K	876,4±118,4	b
SSP3404	Dominio tioredoxin 2 (Q1T4Z3)	<i>Medicago truncatula</i>	457 (11)	41,98/40,74	5,47/5,38	41	Transporte de electrones	CA336.14.3.0	3.292,0±69,0	a
								ICC14216K	1.405,7±403,6	b
SSP4010	Probable proteína ribosomal S12 (Q6ZLP8)	<i>Oryza sativa</i>	128 (5)	18,02/15,13	5,7/5,33	21	Síntesis y degradación de proteínas	CA336.14.3.0	248,5±140,2	
								ICC14216K		
SSP5007	No identificada			22,75	6,20	24		CA336.14.3.0	1.923,1±229,7	a
								ICC14216K	1.020,0±228,0	b
SSP7011	No identificada			21,13	6,6			CA336.14.3.0	180,3±82,4	a
								ICC14216K	46,2±9,9	b

^a Las proteínas han sido clasificadas según las funciones asignadas en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL así como en la literatura científica. Algunas proteínas pueden poseer múltiples funciones, seleccionándose la más importante para clasificar las proteínas en categorías.

^b Plantas control no inoculadas.

^c Mascot score^e y, entre paréntesis, número de péptidos coincidentes en la identificación.

^d ppm = partes por millón de proteína en cada tratamiento. Las medias seguidas por letras muestran su posible separación entre tratamientos mediante el test LSD. Los datos fueron transformados mediante $\log(X)$ para su análisis, las medias \pm desviación estándar sin transformar son representadas en esta tabla.

2.4.4.- RESPUESTA PROTEÓMICA DE NÓDULOS PRODUCIDOS POR *M. ARTIELLIA* EN RAÍCES GARBANZO EN FASES AVANZADAS DE LA INTERACCIÓN (35-40 DAI)

Este estudio se realizó en un periodo temporal que permitiera una mayor respuesta que la obtenida los periodos anteriores (4-8 DAI). El tiempo seleccionado se corresponde con el de máximo tamaño del sitio de alimentación; en él la hembra está completamente desarrollada y presenta la matriz gelatinosa con huevos en el exterior de la raíz (Volvas *et al.*, 2005), hecho éste último que facilita la identificación de los sitios de alimentación. Los geles preliminares se realizaron con extractos de muestras obtenidas sin la eliminación completa de la hembra, observándose una elevada contaminación por proteínas constitutivas del nematodo (gel no mostrado), probablemente debido a la mayor proporción de proteínas en los tejidos animales en comparación con los vegetales. Por ello, se implantó un método de toma de muestra en el que se eliminó cuidadosamente con pinzas la hembra de *M. artiellia* junto con la matriz gelatinosa conteniendo huevos. Se siguió la misma estrategia de comparación de geles de proteínas entre plantas inoculadas (con los patógenos individual ó conjuntamente) y sin inocular de cada línea, así como entre plantas sin inocular de ambas líneas.

En este caso para la separación por IEF (primera dimensión) se usaron tiras electroforéticas de un rango más amplio, desde 3 a 10 (no lineal), para poder observar de una forma más general la respuesta de la planta. Debido a la dificultad de obtención de las muestras de nódulos, la cantidad de proteína aplicada por gel (100 µg) se redujo sensiblemente respecto al experimento anterior, resolviéndose aproximadamente unas 350 manchas electroforéticas en los geles teñidos con Sypro-Ruby (Bio-Rad). El colorante Sypro Ruby (Bio-Rad) es más sensible que Coomassie G-250, con lo que el número de manchas electroforéticas fue apropiado para el análisis; al usarse un pH no lineal, también se pudo obtener una mejor resolución de manchas electroforéticas en todo el gel (Fig. 2.12).

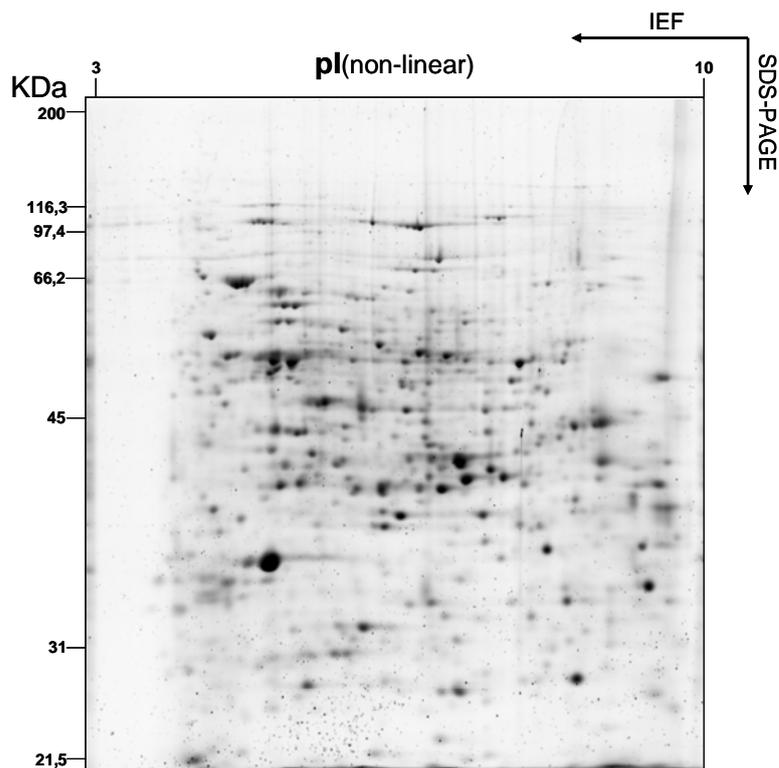


Figura 2.12.- Gel bidimensional de nódulos de raíces secundarias de la línea de garbanzo ICC14216K causados por *M. artiellia* a los 35-40 DAI. Los marcadores de peso molecular están situados a la izquierda del gel y el punto isoeléctrico en la parte superior (3 – 10 no-lineal). Se cargaron 100 µg de proteína en cada gel con tiras de isoelectroenfoque de 17 cm y la tinción se hizo con Sypro Ruby (Bio-Rad).

Aunque ambos genotipos son resistentes a la Fusariosis Vascular, *M. artiellia* puede infectar a ambas líneas, observándose a este periodo de muestreo mayor envejecimiento en las raíces de 'CA336.14.3.0' que en las de 'ICC14216K', línea esta última que muestra un ligero mayor grosor de las raíces secundarias.

Se siguió una estrategia de análisis de los resultados de expresión de proteínas similar a la empleada en Brumbarova *et al.* (2008). El estudio se puede sintetizar en diversas etapas, en las cuales se ha usado el programa NIA Array Analysis (Sharov *et al.*, 2005) para los análisis estadísticos:

- 1) Elección de manchas electroforéticas con posibles diferencias en la expresión (observándose en tablas de cuantificación proporcionadas por el programa PDQuest™ de Bio-Rad).

- 2) Agrupaciones jerárquicas de los tratamientos y repeticiones, para determinar la similitud de respuesta entre tratamientos y la calidad de los datos obtenidos (reproducibilidad de los datos).

3) Agrupamiento mediante un análisis de componentes principales de las manchas electroforéticas, para determinar patrones de expresión y asociaciones entre proteínas y condiciones experimentales.

4) Determinación de las manchas electroforéticas estadísticamente significativas al comparar las diversas condiciones experimentales.

Para facilitar un mejor análisis y comprensión de los resultados, se han estudiado las posibles agrupaciones de manchas electroforéticas, en función de su expresión en las distintas condiciones del experimento. Así, la primera agrupación fue la de las manchas electroforéticas comunes a ambas líneas (modificadas en algún/os tratamiento/s), para determinar respuestas comunes ó diferenciales a los patógenos inoculados separada y/o simultáneamente. Una segunda agrupación de datos fue la del total de las manchas electroforéticas (comunes y específicas) diferencialmente expresadas en cada una de las líneas, para determinar las diferentes respuestas de las mismas. Otra agrupación fue la de las manchas electroforéticas que presentaban una modificación de carácter cualitativo (aparición/desaparición) en alguno de los tratamientos, las cuales se analizaron estadísticamente de manera diferente, y por último, la de las diferencias constitutivas en las plantas no inoculadas de ambas líneas.

En conjunto se eligieron 50 manchas electroforéticas en 'CA336.14.3.0' y 31 en 'ICC14216K' que presentaban un comportamiento diferencial (cuantitativo ó cualitativo) en alguno de los tratamientos respecto a los controles, de las que 18 fueron comunes a ambas líneas, mientras que sólo tres manchas electroforéticas mostraron diferencias al compararse los controles de ambas líneas. Para el estudio de agrupación mediante componentes principales, las 50 diferencias iniciales en 'CA336.14.3.0' se redujeron a 41, al no incluirse en el análisis las manchas electroforéticas que presentaban cambios cualitativos (apariciones ó desapariciones en el gel en algún/as combinación/es planta-patógeno), mientras que en 'ICC14216K', las 31 manchas electroforéticas iniciales se redujeron por este mismo motivo a 24. Las manchas electroforéticas comunes a ambas líneas, de un número inicial de 18, se redujeron a 15, al solo considerarse las que experimentaban cambios cuantitativos. Los datos normalizados de las manchas electroforéticas mencionadas anteriormente se utilizaron para el estudio con el programa NIA Array Analysis (Sharov *et al.*, 2005).

2.4.4.1.- Agrupamiento jerárquico ("*hierarchical clustering*")

Se realizó un análisis de agrupación jerárquica en base al cuadrado de la distancia euclídea entre las diferentes proteínas. Dicha distancia se estimó a partir de las coordenadas obtenidas para cada una de las proteínas en el espacio vectorial definido por los tres factores extraídos en el análisis de componentes principales (indicado en las características del programa).

Mediante esta técnica se pueden determinar las similitudes en la expresión entre tratamientos con las manchas electroforéticas seleccionadas, cuantificando y visualizando las diferencias mediante ramas que se van uniendo a través de nudos en ramas más gruesas formando árboles que representan las agrupaciones ("*clusters*").

Por lo que respecta a las manchas electroforéticas comunes, los distintos tratamientos se agrupan en ambas líneas (Fig. 2.13A), con lo que se observa una clara influencia de cada tratamiento en la respuesta, que no parece estar condicionada por el fondo genético de las líneas de garbanzo. Otro resultado que se observa en el árbol, es el agrupamiento, por un lado, de los tratamientos con *Foc-5* (*Foc-5* y *Foc-5-Ma*), y por otro de los tratamientos control y con nematodo. La variabilidad de estas proteínas (a grandes rasgos) se ve mayormente explicada por el componente de tratamiento, más que por el de línea. Las variaciones causadas por *Foc-5* suelen ser más semejantes, agrupándose los tratamientos entre sí.

El análisis de todas las manchas electroforéticas modificadas en 'CA336.14.3.0' e 'ICC14216K' (Fig. 2.13B-C), muestra un comportamiento diferencial entre ambas líneas. Así, mientras en 'ICC14216K' ocurrió lo mismo que en el análisis de las manchas electroforéticas comunes, agrupándose por un lado los tratamientos con *Foc-5* y por otro los dos restantes (control y nematodo) (Fig. 2.13C), en 'CA336.14.3.0' el tratamiento con *M. artiellia* se separa claramente de los restantes, entre los cuales el tratamiento con *Foc-5* se asocia al control en un nudo, que a su vez se asocia a la combinación de ambos patógenos (Fig. 2.13B).

En conclusión, los tratamientos son bastantes diferenciales entre sí, al separarse claramente entre ellos. Así también, las manchas electroforéticas comunes responden, en su mayoría, de forma similar a las diversas inoculaciones de patógenos (hechas éstas tanto de forma separada como conjuntamente), pudiendo ser muy interesantes las proteínas que muestran un comportamiento diferencial entre líneas para explicar la posible pérdida/mantenimiento de la resistencia a *Foc-5* ó, desde el punto de vista global, las que muestran un carácter diferencial entre líneas.

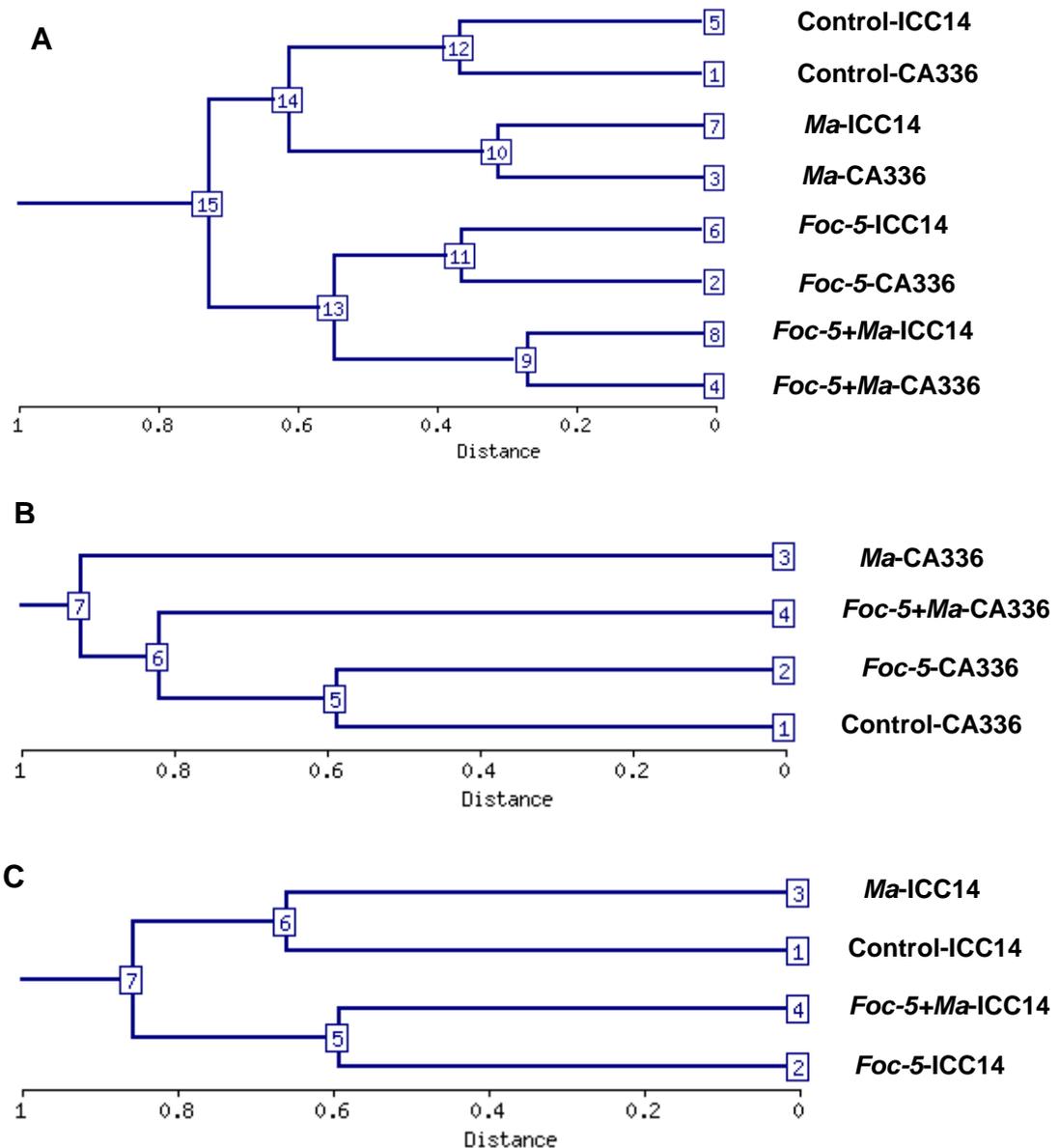


Figura 2.13.- Dendrograma mostrando el agrupamiento jerárquico de los tratamientos (control e inoculaciones individuales o conjunta con *M. artiellia* y *Foc-5*) en raíces de garbanzo a los 35-40 DAI. A, manchas electroforéticas comunes a ambas líneas; B, línea CA336.14.3.0; C, línea ICC14216K. *Ma*: *M. artiellia*; *Foc-5*: *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5. Las agrupaciones de expresión están enumeradas en A, desde 1 hasta 15 y en B y C, desde 1 hasta 7.

2.4.4.2.- Análisis de componentes principales.

El análisis de componentes principales ha permitido agrupar las diferentes manchas electroforéticas según sus patrones de expresión (Fig. 2.14), explicando cada uno de los diferentes componentes principales un porcentaje de la variabilidad asociada a los datos (Tabla 2.6).

Los datos de cuantificación de proteínas (manchas electroforéticas) se agruparon en columnas (repeticiones de cada tratamiento) y filas (proteínas). El análisis de componentes principales se realizó mediante el método de “Singular Value Decomposition (SVD)” que genera los autovectores de las filas y columnas de la matriz de datos transformados logarítmicamente (Gabriel 1971; Chapman *et al.*, 2002), lo que permite representar tratamientos y proteínas separadamente (Fig. 2.14), pudiéndose explorar relaciones de unos con otras. Los cambios de expresión proteica en un componente principal específico son medidos por la pendiente de la recta de regresión de los valores de la cuantificación proteica, transformados logarítmicamente, frente al correspondiente autovector multiplicado por el rango de valores que lo definen. Si el grado de cambio en la expresión excede un nivel definido por el usuario (en nuestro caso el doble de la expresión), entonces la proteína está asociada con este componente principal. La asociación de proteínas se va haciendo secuencialmente, comenzando por el primer componente principal. Las proteínas que ya hayan sido agrupadas en algún componente principal, no son asociadas con agrupaciones de los siguientes componentes principales (Sharov *et al.*, 2005).

Algunas manchas electroforéticas no han podido ser asociadas a ningún componente principal. Esto no ocurrió, sin embargo, en el estudio de las manchas electroforéticas comunes a ambas líneas (Fig. 2.14A), donde las 14 de las 15 proteínas que mostraron variaciones cuantitativas se asociaron a dos componentes principales, mientras que una proteína –SSP4103– se asoció al componente principal 4. En los casos de ‘CA336.14.3.0’ (Fig. 2.14B) e ‘ICC14216K’ (Fig. 2.14C) fueron 36 (del total de 41 reguladas cuantitativamente) y 23 (del total de 24) las manchas que resultaron asociadas a alguno de los componentes principales, respectivamente. El gráfico correspondiente a la distribución de las inoculaciones respecto a los diferentes componentes principales (Fig. 2.14) muestra que se separan entre ellas, presentándose cierta asociación entre algunos tratamientos. Así, en ‘CA336.14.3.0’ los distintos tratamientos se separan claramente, mientras que en ‘ICC14216K’ los tratamientos con *M. artiellia* parecen ser más similares entre sí que el resto.

El análisis de las manchas electroforéticas comunes determinó cuatro agrupaciones (“clusters”) (Fig. 2.14A, 2.15 y 2.16), dos asociadas al componente principal uno (correlación positiva y correlación negativa), otra asociada a la correlación negativa del componente principal 2, y una última agrupación, de solo una proteína, asociada a la correlación positiva del componente principal 4. La correlación positiva con el componente principal 1 estuvo asociada a una disminución de la expresión en relación con *M. artiellia*, mientras que la correlación negativa lo estuvo con el incremento de los niveles de las proteínas en las plantas inoculadas (tanto con

M. artiellia ó *Foc-5* separadamente, como con ambos patógenos conjuntamente). La correlación negativa del componente principal 2 agrupó las manchas electroforéticas que presentaron un incremento de expresión con *Foc-5* ó la combinación de ambos patógenos; sin embargo, algunas de las proteínas de la línea ICC14216K, como SSP5202 (quitinasa clase I) y SSP7106 (no identificada), presentaron un mayor incremento respecto al control, mostrando una respuesta diferencial con la línea CA336.14.3.0, a pesar de estar agrupadas conjuntamente (Figs. 2.15 y 2.16). La correlación positiva del componente principal 4, con la que solo se asoció una proteína, SSP 4103 (ascorbato peroxidasa), correspondió al incremento de expresión en el tratamiento conjunto con ambos patógenos.

El análisis correspondiente a la línea CA336.14.3.0 mostró cuatro agrupaciones de proteínas en dos componentes principales (Figs. 2.14B, 2.17 y 2.18). La correlación positiva del componente principal 1 parece estar asociada a un incremento de la concentración de proteínas en las plantas inoculadas con *M. artiellia* ó con ambos patógenos simultáneamente, aunque en algunos casos no se observa tan claramente esta relación (p. ej. en SSP4204 y SSP4504; Fig. 18), mientras que la respuesta a *Foc-5* puede ser bastante variable. La correlación negativa del componente 1, aunque bastante variable entre las distintas proteínas, parece estar principalmente asociada a un incremento en las plantas inoculadas con *Foc-5* y una disminución con las plantas inoculadas con *M. artiellia*. Las proteínas asociadas a la correlación positiva del componente principal 2 muestran una disminución en la inoculación simultánea con ambos patógenos, mientras que en la correlación negativa de este componente principal se observa una respuesta contraria en la mayoría de manchas electroforéticas.

El análisis de la línea ICC14216K estableció cuatro agrupaciones de proteínas dentro de tres componentes principales (Figs. 2.14C, 2.19 y 2.20). La correlación positiva con el componente principal 1 pareció estar asociada con una disminución de la expresión en plantas inoculadas con *M. artiellia*, aunque en el caso de la mancha electroforética SSP8805 no se aprecia claramente este patrón de expresión (Fig. 2.20). Sin embargo, la correlación negativa de este componente principal parece estar asociada a un incremento de expresión en la combinación de ambos patógenos, siendo variable, aunque mayoritariamente creciente, en el resto de los tratamientos. La correlación negativa con el componente principal 2 se asoció a proteínas que incrementaron su expresión en plantas inoculadas con *Foc-5* y con ambos patógenos. Por último, la correlación positiva con el componente principal 3 se asoció con un incremento en la inoculación conjunta con ambos patógenos y escasa respuesta en el resto de tratamientos.

TABLA 2.6.- Porcentaje acumulado de la variabilidad de los datos explicada mediante el estudio de los componentes principales.

Componentes principales	Manchas electroforéticas comunes	'CA336.14.3.0'	'ICC14216K'
PC1	60,90	61,75	66,02
PC2	81,92	91,94	89,52
PC3	91,22*	-	99,99
PC4	97,36	-	-

*Este PC tiene asociadas proteínas a la variabilidad, sin embargo, nuestro umbral de dos veces para considerar las diferencias significativas hace que no se observe ninguna mancha electroforética asociada al mismo.

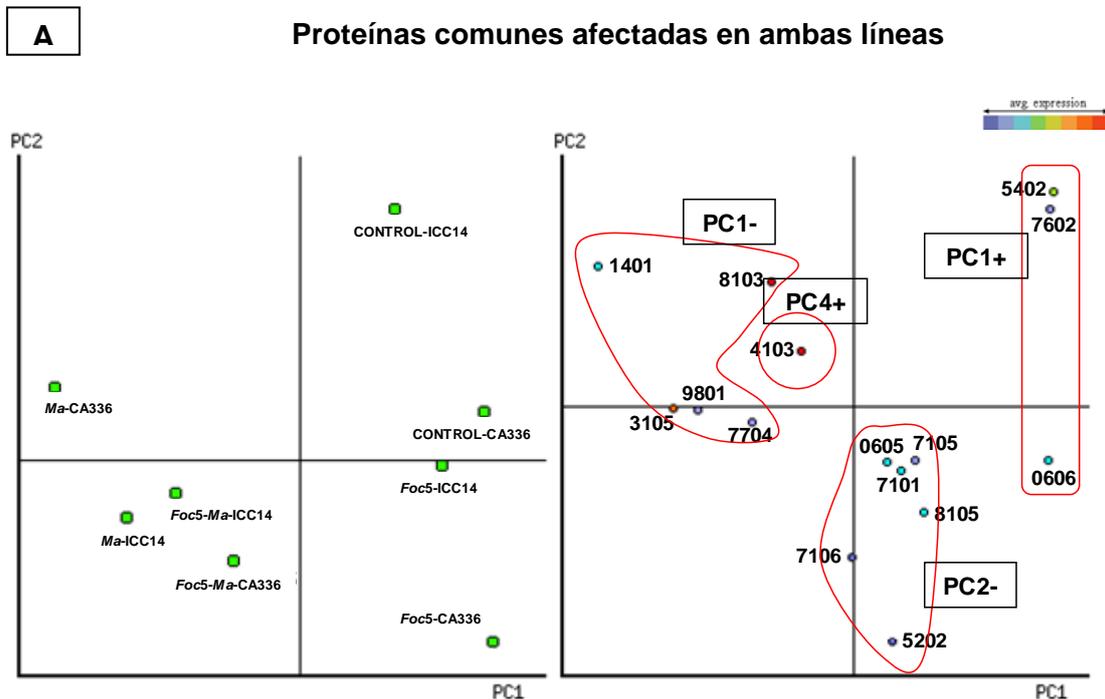


Figura 2.14.- Mapas bidimensionales mostrando las asociaciones entre tratamientos y manchas electroforéticas generadas mediante el análisis de componentes principales (PCA). Los tratamientos (izquierda) y las manchas electroforéticas (derecha) han sido representadas en los dos primeros componentes del espacio. PCA es una técnica de reducción dimensional que permite la expresión y visualización de manchas electroforéticas en un espacio de componentes reducidos ("reduced-components space") definido mediante los componentes principales. Una distancia más próxima entre tratamientos y manchas electroforéticas en el espacio definido por los componentes principales es indicativo de la similitud en los patrones de expresión. Las manchas electroforéticas correlativas a los componentes principales han sido mostradas en los gráficos mediante su identificación en el gel (SSP). Las manchas electroforéticas correlacionadas conjuntamente en el mismo componente principal están agrupadas mediante una línea. A, Manchas electroforéticas comunes; B, manchas electroforéticas en 'CA336.14.3.0'; C, Manchas electroforéticas en 'ICC14216K'. Abreviaturas: PC = Componente principal; *Foc5* = *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5; *Ma* = *M. artiellia*.

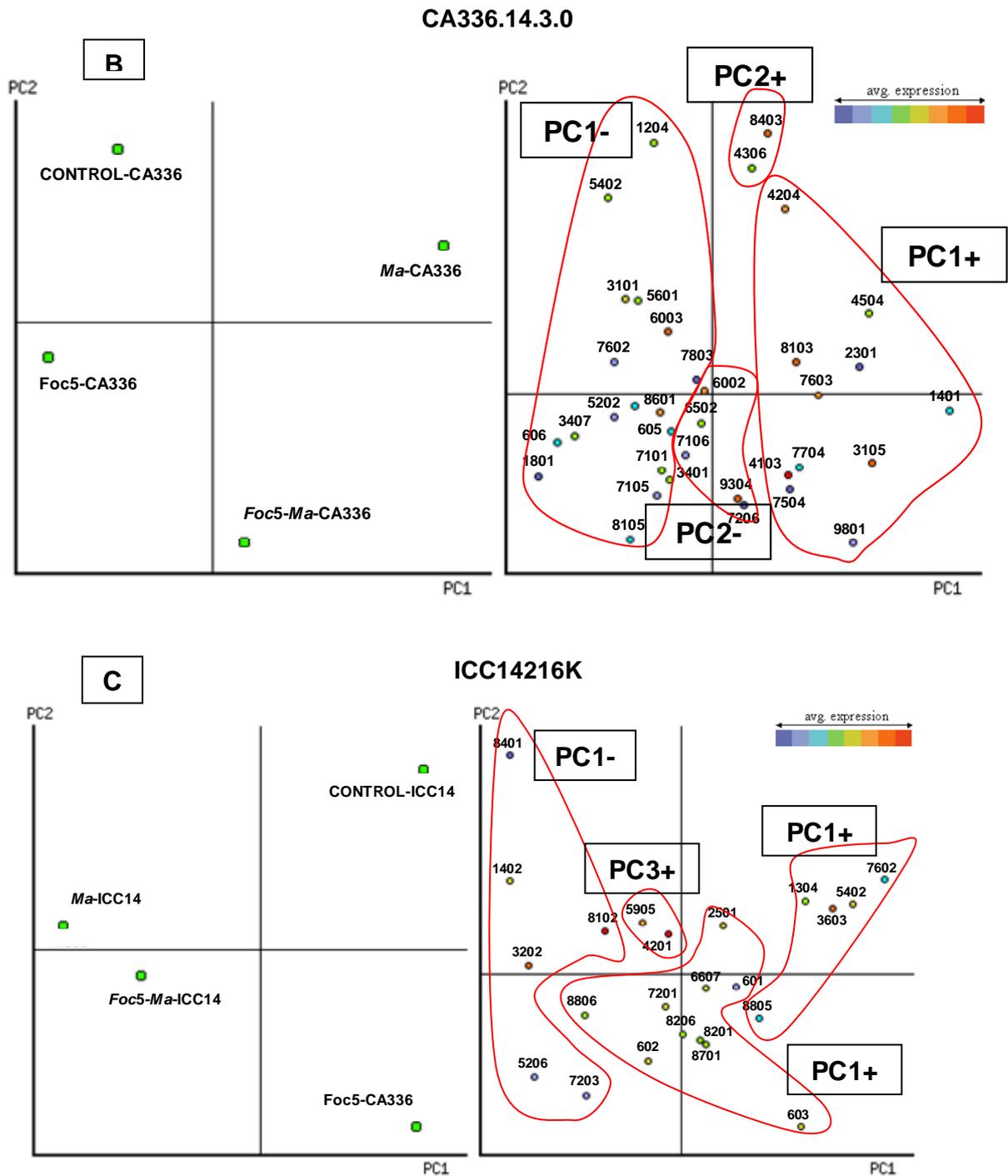


Figura 2.14 (continuación).- Mapas bidimensionales mostrando las asociaciones entre tratamientos y manchas electroforéticas generadas mediante el análisis de componentes principales (PCA). Los tratamientos (izquierda) y las manchas electroforéticas (derecha) han sido representadas en los dos primeros componentes del espacio. PCA es una técnica de reducción dimensional que permite la expresión y visualización de manchas electroforéticas en un espacio de componentes reducidos ("reduced-components space") definido mediante los componentes principales. Una distancia más próxima entre tratamientos y manchas electroforéticas en el espacio definido por los componentes principales es indicativo de la similitud en los patrones de expresión. Las manchas electroforéticas correlativas a los componentes principales han sido mostradas en los gráficos mediante su identificación en el gel (SSP). Las manchas electroforéticas correlacionadas conjuntamente en el mismo componente principal están agrupadas mediante una línea. A, Manchas electroforéticas comunes; B, manchas electroforéticas en 'CA336.14.3.0'; C, Manchas electroforéticas en 'ICC14216K'. Abreviaturas: PC = Componente principal; *Foc5* = *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5; *Ma* = *M. artiellia*.

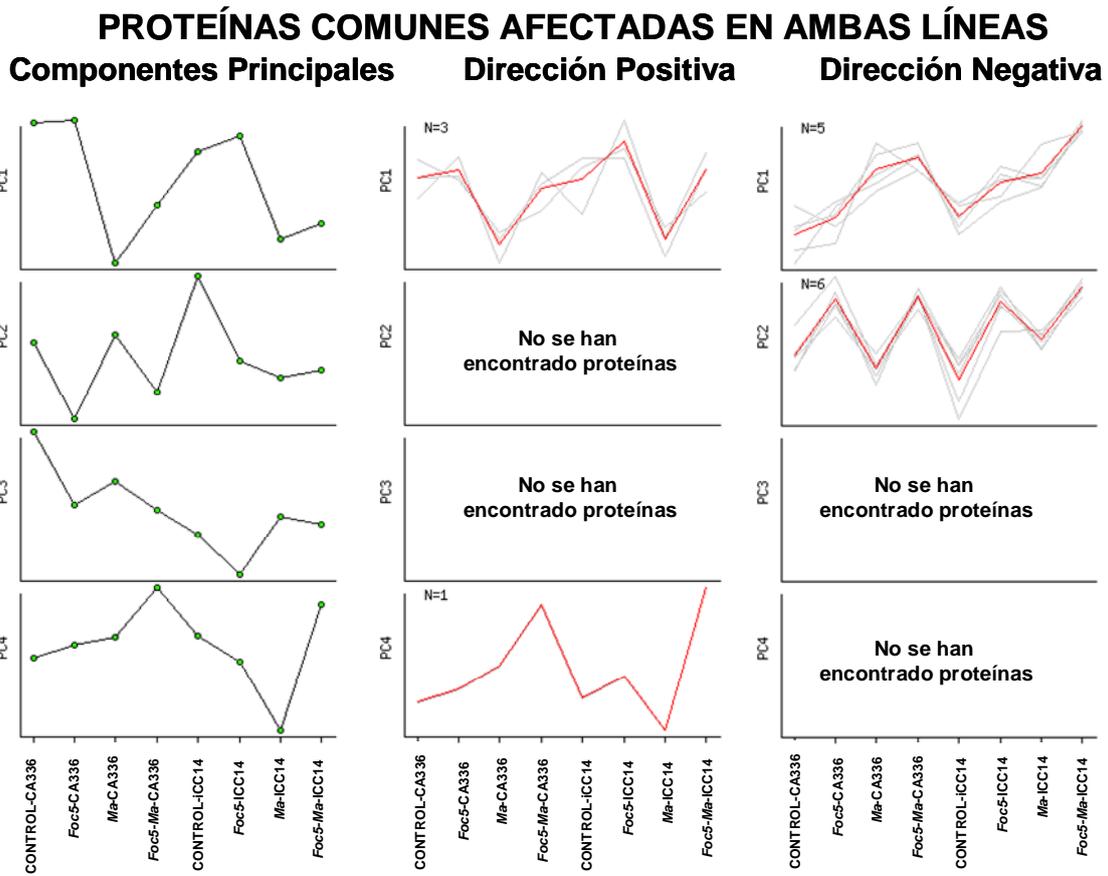


Figura 2.15.- Agrupaciones de proteínas reguladas de forma común en ambas líneas por los tratamientos, determinadas mediante el análisis de componentes principales (PCA). Para el componente principal 1 se han identificado dos agrupaciones de proteínas, las cuales están positiva y negativamente correlacionadas con dicho componente. Para los siguientes componentes principales, se ha observado un grupo de proteínas correlacionadas negativamente con el componente principal 2 y otro que se correlaciona positivamente con el componente principal 4. Según el método descrito por Sharov *et al.* (2005), el grado de cambio en la expresión de proteínas en un PC específico ha sido determinado por la pendiente de la recta de regresión del \log de la expresión de las proteínas versus el correspondiente autovector multiplicado por el rango de valores de éste. Si el cambio de expresión de la proteína supera el doble de su expresión, la mancha electroforética se considera asociada con el PC. Las agrupaciones de proteínas han sido realizadas secuencialmente, comenzando por el primer PC. Las proteínas que ya han sido agrupadas en un PC, no se incluyen en los sucesivos. Los componentes principales se muestran en la izquierda y el número de proteínas agrupadas se muestra en el extremo izquierdo de cada agrupación (N). Abreviaturas: PC = Componente principal; *Foc5* = *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* raza 5; *Ma* = *M. artiellia*.

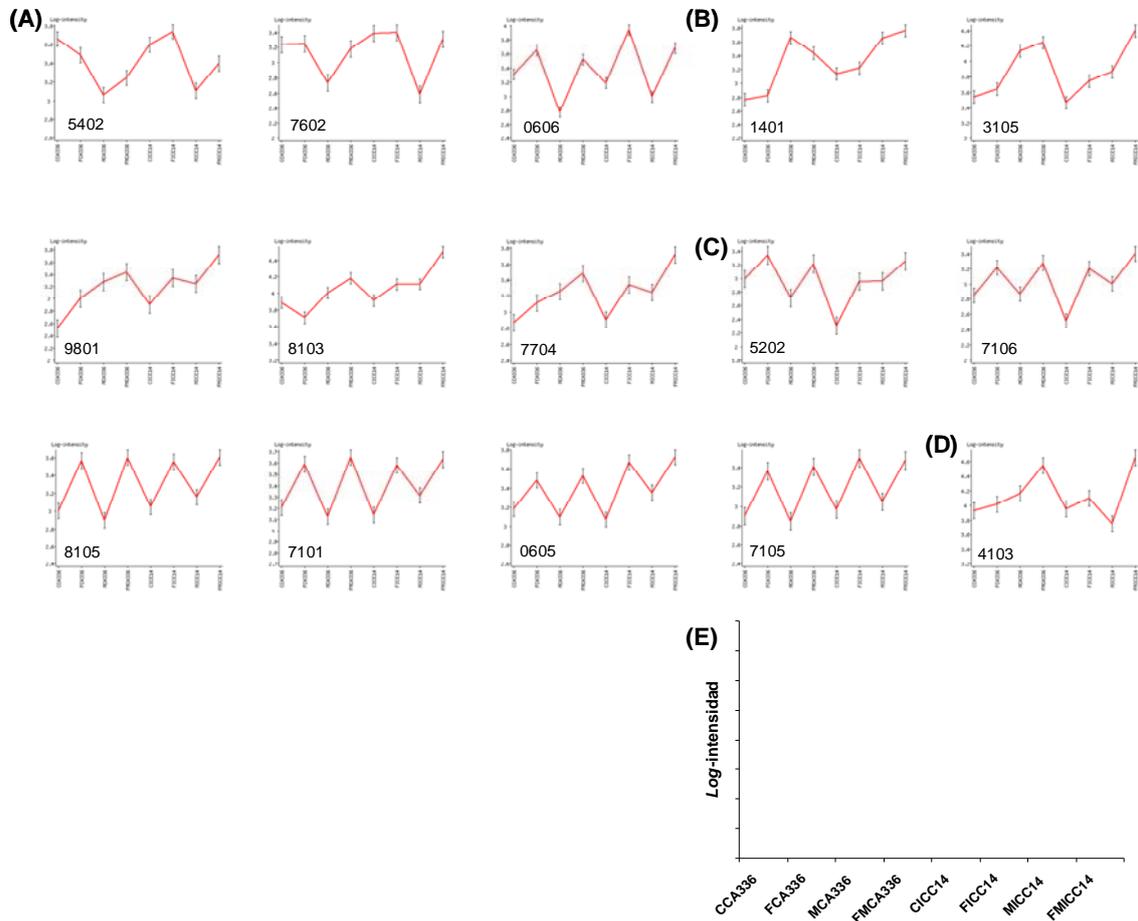


Figura 2.16.- Media de los *log* de la intensidad de las manchas electroforéticas asociadas a cada componente principal cuya expresión es modificada en ambas líneas. (A), Manchas electroforéticas positivamente correlacionadas con PC1; (B), Manchas electroforéticas negativamente correlacionadas con PC1; (C), Manchas electroforéticas negativamente correlacionadas con PC2; (D), Manchas electroforéticas positivamente correlacionadas con PC4; (E), leyenda para las gráficas A-D.

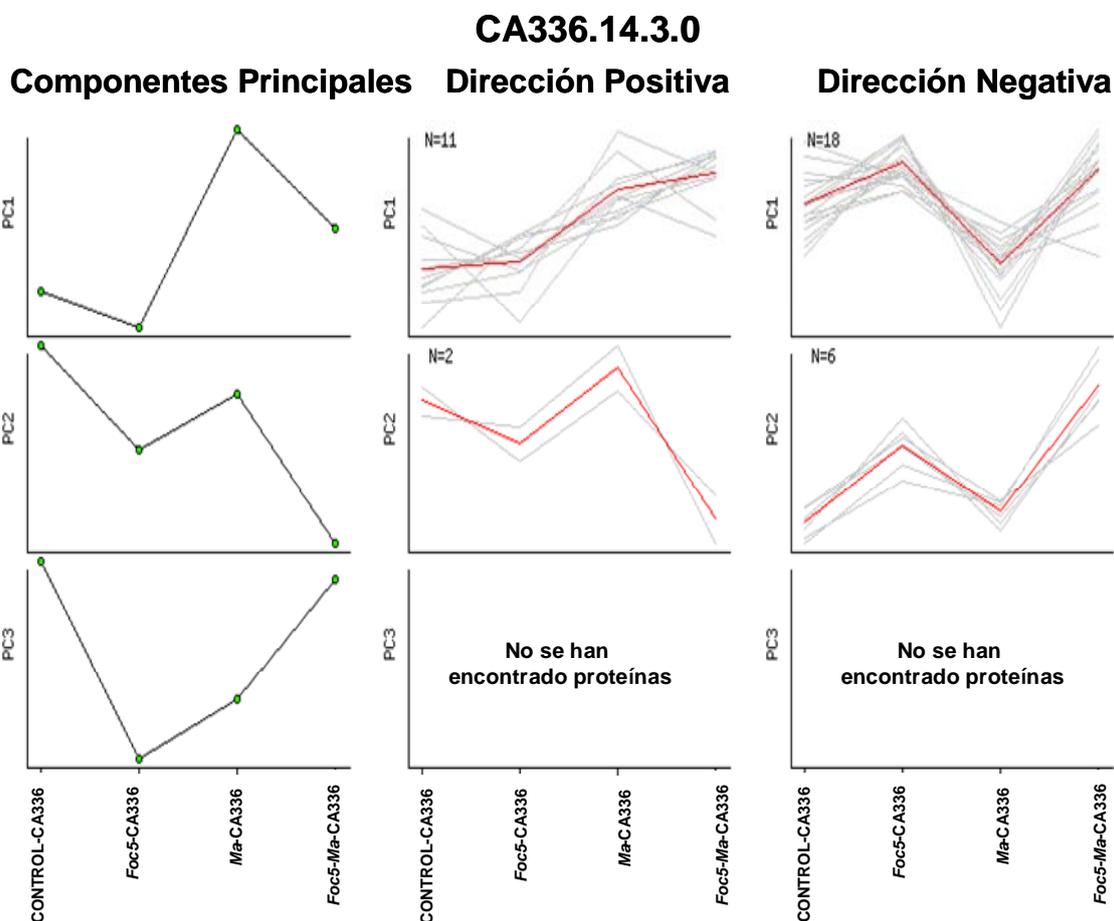


Figura 2.17.- Agrupaciones de proteínas reguladas en 'CA336.14.3.0' por los tratamientos, determinadas mediante el análisis de componentes principales (PCA). Para ambos componentes principales se han identificado dos agrupaciones de proteínas, las cuales están positiva y negativamente correlacionadas con su respectivo componente principal. Según el método descrito por Sharov *et al.*, (2005), el grado de cambio en la expresión de proteínas en un PC específico ha sido determinado por la pendiente de la recta de regresión del \log de la expresión de las proteínas versus el correspondiente autovector multiplicado por el rango de valores de éste. Si el cambio de expresión de la mancha electroforética supera el doble de su expresión, ésta se considera asociada con el PC. Las agrupaciones de proteínas han sido realizadas secuencialmente, comenzando por el primer PC. Las proteínas que ya han sido agrupadas en un PC no han sido asociadas en los consecutivos. Los componentes principales se muestran en la izquierda y el número de proteínas agrupadas se muestra en el extremo izquierdo de cada agrupación (N). Abreviaturas: PC = Componente principal; *Foc5* = *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* raza 5; *Ma* = *M. artiellia*.

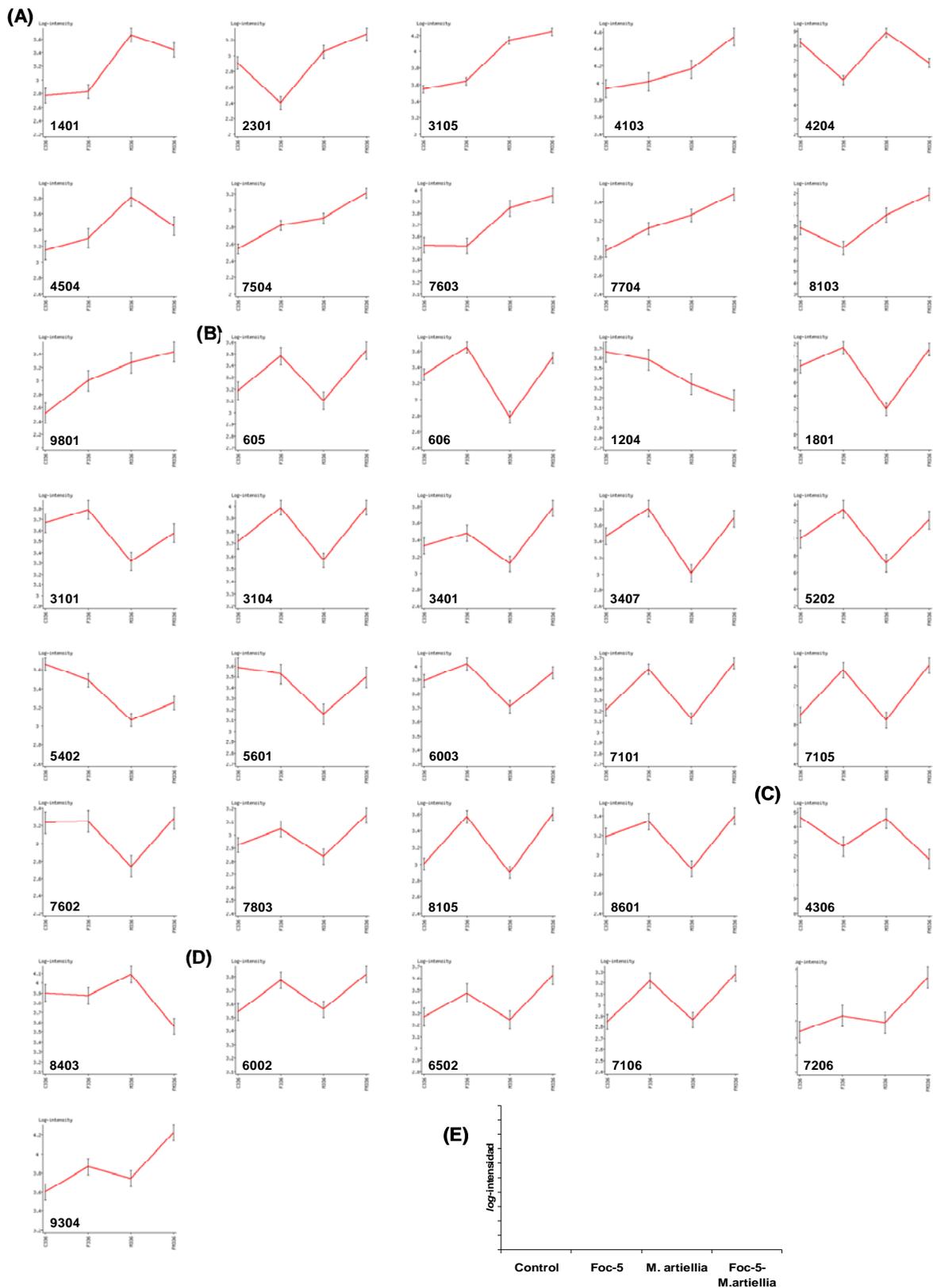


Figura 2.18.- Media de los *log* de la intensidad de las manchas electroforéticas asociadas a cada componente principal en la línea CA336.14.3.0. (A), Manchas electroforéticas positivamente correlacionadas con PC1; (B), Manchas electroforéticas negativamente correlacionadas con PC1; (C), Manchas electroforéticas positivamente correlacionadas con PC2; (D), Manchas electroforéticas negativamente correlacionadas con PC2; (E), leyenda para las gráficas A-D. De las manchas electroforéticas iniciales (41), cinco manchas electroforéticas no se asociaron a ningún componente principal.

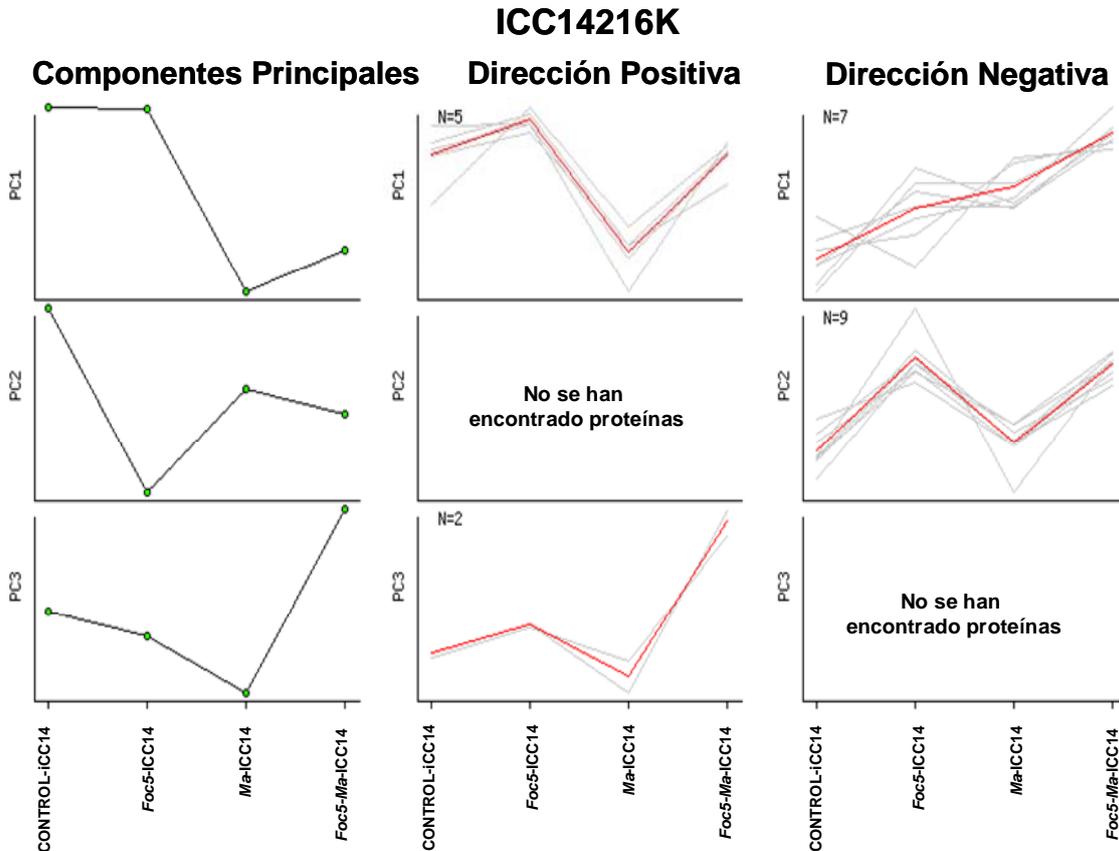


Figura 2.19.- Agrupaciones de proteínas reguladas en 'ICC14216K' por los tratamientos, y determinadas mediante el análisis de componentes principales (PCA). Para el componente principal 1 se han identificado dos agrupaciones de proteínas, las cuales están positivamente y negativamente correlacionadas; para el componente principal 2 solo se ha identificado una agrupación con correlación negativa; para el componente principal 3 solo se ha identificado una agrupación de proteínas correlacionada positivamente. Según el método descrito por Sharov *et al.*, (2005), el grado de cambio en la expresión de proteínas en un PC específico ha sido determinado por la pendiente de la recta de regresión del \log de la expresión de las proteínas versus el correspondiente autovector multiplicado por el rango de valores de éste. Si el cambio de expresión de la mancha electroforética supera el doble de su expresión, ésta se considera asociada con el PC. Las agrupaciones de proteínas han sido realizadas secuencialmente, comenzando por el primer PC. Las proteínas que ya han sido agrupadas en un PC, no se incluyen en los sucesivos. Los componentes principales se muestran en la izquierda y el número de proteínas agrupadas se muestra en el extremo izquierdo de cada agrupación (N). Abreviaturas: PC = Componente principal; *Foc5* = *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5; *Ma* = *M. artiellia*.

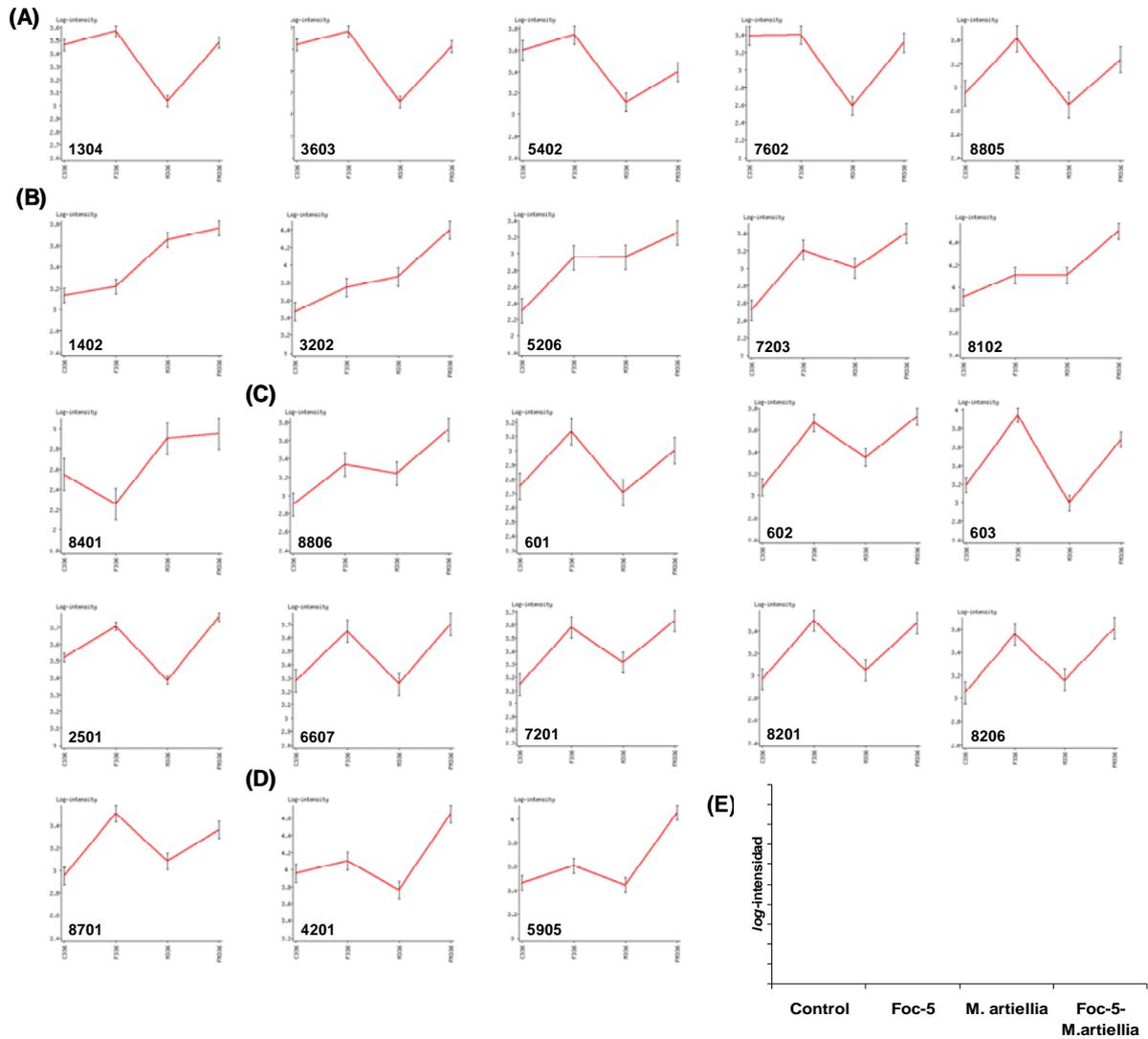


Figura 2.20.- Media de los *log* de la intensidad de las manchas electroforéticas asociadas a cada componente principal en la línea ICC14216K. (A), Manchas electroforéticas positivamente correlacionadas con PC1; (B), Manchas electroforéticas negativamente correlacionadas con PC1; (C), Manchas electroforéticas positivamente correlacionadas con PC2; (D), Manchas electroforéticas positivamente correlacionadas con PC3; (E), leyenda para las gráficas A-D. De las manchas electroforéticas iniciales (24), una mancha electroforética no se asoció a ningún componente principal.

2.4.4.3.- Análisis de los patrones de expresión de las manchas electroforéticas basados en comparaciones dos a dos ("*Pairwise comparisons*").

La comparación entre las plantas sin inocular e inoculadas con los diferentes patógenos, nos ha permitido determinar qué tratamientos afectaban significativamente a la presencia de las distintas manchas electroforéticas (Fig. 2.21). Las comparaciones más interesantes, desde el punto de vista de la interacción de la planta con los patógenos, pueden ser las establecidas entre los controles y las diferentes inoculaciones. Sin embargo, para determinar posibles efectos cuantitativos en la respuesta a la inoculación con un patógeno, cuando se efectuaba aquella de forma individual ó conjuntamente con el otro patógeno, se han realizado también las comparaciones entre los distintos tratamientos.

Este análisis permite apreciar con claridad que en ambas líneas la inoculación con *Foc-5*, bien individual o conjuntamente con el nematodo, cuando produjo cambios significativos respecto al control en la cantidad de una proteína, éstos fueron mayoritariamente (el caso de 'CA336.14.3.0') o siempre (el caso de 'ICC14216K') incrementos. Por el contrario, las proteínas que modificaron significativamente su expresión, respecto al control, por inoculación individual con *M. artiellia*, lo hicieron en número bastante similar unas de forma positiva y otras negativamente, ocurriendo así también en ambas líneas. Por número de proteínas reguladas significativamente respecto al control, la respuesta fue mayor a *M. artiellia* (un total de 23 regulaciones entre ambas líneas, 11 de ellas positivas) que a *Foc-5* (un total de 19 regulaciones entre ambas líneas, 18 de ellas positivas), siendo ambas claramente superadas por la de la inoculación conjunta con ambos patógenos, que produjo un total de 40 regulaciones entre ambas líneas, 36 de ellas positivas) (Fig. 2.21).

A su vez la comparación entre tratamientos indicó, por un lado, que, cuando se produjeron diferencias significativas en la respuesta a una inoculación simple frente a la otra, la situación más habitual [18 casos frente a 7 en 'CA336.14.3.0' y 14 frente a 2 en 'ICC14216K'; (Fig. 2.21)], fue a que se dieran mayores niveles con *Foc-5* que con *M. artiellia*. Por otro lado, también resultó evidente que la doble inoculación, frente a la inoculación simple, proporcionó un mayor número de regulaciones significativas, con claro predominio de las regulaciones positivas (indicativas de un cierto efecto aditivo o, incluso, sinérgico de las inoculaciones) frente a las negativas [un total de 33 frente a 6 en 'CA336.14.3.0' y 26 frente a 1 en 'ICC14216K'; (Fig. 2.21)]. El incremento de regulaciones significativas en la doble inoculación respecto a la simple, fue muy superior cuando la comparación se hizo frente a la inoculación simple con *M. artiellia* [un total de 47 regulaciones

entre ambas líneas, 43 de ellas positivas; (Fig. 2.21)] que cuando se hizo frente a *Foc-5*] un total de 19 regulaciones entre ambas líneas, 16 de ellas positivas; (Fig. 2.21)], lo que indicaría una superior respuesta, en términos de expresión cuantitativa de proteínas, de ambas líneas al hongo que al nematodo.

A

Línea CA336.14.3.0						
SSP	F vs C	Ma vs C	F + Ma vs C	Ma vs F	F + Ma vs F	F + Ma vs Ma
605/602 ^a						
606/603 ^a						
1204						
1401/1402 ^a						
1801						
2301						
3101						
3104						
3105/3202 ^a						
3401						
3407						
4103/4201 ^a						
4204						
4306						
4504						
5202/5206 ^a						
5402/5402 ^a						
5601						
6002						
6003						
6502						
7101/7201 ^a						
7103						
7105/8201 ^a						
7106/7203 ^a						
7206						
7504						
7602/7602 ^a						
7603						
7704/8706 ^a						
7803						
8103/8102 ^a						
8105/8206 ^a						
8403						
8505						
8601						
9304						
9801/8806 ^a						

	Mayor expresión en el primer tratamiento respecto al segundo
	Menor expresión en el primer tratamiento respecto al segundo
	Variación no significativa entre ambos tratamientos

Figura 2.21. (VER PAGINA SIGUIENTE)

B

Línea ICC 14216 K						
	F vs C	Ma vs C	F + Ma vs C	Ma vs F	F + Ma vs F	F + Ma vs Ma
601	Green	Grey	Grey	Red	Grey	Green
602 ^b	Green	Grey	Green	Red	Grey	Green
603 ^b	Green	Grey	Green	Red	Grey	Green
1304	Grey	Red	Grey	Red	Grey	Green
1402 ^b	Grey	Green	Green	Green	Green	Grey
2501	Grey	Grey	Grey	Red	Grey	Green
3202 ^b	Grey	Green	Green	Grey	Green	Green
3603	Grey	Red	Grey	Red	Grey	Green
4201 ^b	Grey	Green	Green	Red	Green	Green
5206 ^b	Green	Green	Green	Grey	Grey	Green
5402 ^b	Grey	Red	Grey	Red	Red	Green
5905	Grey	Grey	Green	Grey	Green	Green
6607	Green	Grey	Green	Red	Grey	Green
7201 ^b	Grey	Green	Green	Grey	Grey	Green
7203 ^b	Green	Green	Green	Grey	Green	Green
7602 ^b	Grey	Red	Grey	Red	Grey	Green
8102 ^b	Grey	Green	Green	Grey	Green	Green
8201 ^b	Green	Grey	Green	Red	Grey	Green
8206 ^b	Green	Grey	Green	Red	Grey	Green
8401	Grey	Grey	Grey	Green	Green	Grey
8701	Green	Grey	Green	Red	Grey	Green
8805	Grey	Grey	Grey	Red	Grey	Green
8806 ^b	Green	Grey	Green	Grey	Grey	Green

Green	Mayor expresión en el primer tratamiento respecto al segundo
Red	Menor expresión en el primer tratamiento respecto al segundo
Grey	Variación no significativa entre ambos tratamientos

Figura 2.21.- Patrones de regulación de proteínas en las líneas CA336.14.3.0 (A) e ICC14216K (B), basados en las comparaciones dos a dos de sus valores de expresión. En las primeras tres columnas se compara el control con los otros tratamientos, mientras que en las restantes se comparan entre sí los distintos tratamientos. A, "CA336.14.3.0"; B, "ICC14216K". Abreviaturas: C = Control; F = *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5; Ma = *M. artiellia*; F + Ma = ambos patógenos. ^a: manchas electroforéticas comunes a ambas líneas, en primer término se indica el número de identificación en gel en la línea CA336.14.3.0 y en el siguiente en ICC14216K; ^b: manchas electroforéticas comunes a ambas líneas, indicando la numeración en ICC14216K. 3 manchas electroforéticas de las 41 estudiadas en 'CA336.14.3.0' no mostraron variaciones significativas, mientras que 'ICC14216K' sólo una mancha electroforética de las 24 estudiadas no mostró variaciones significativas.

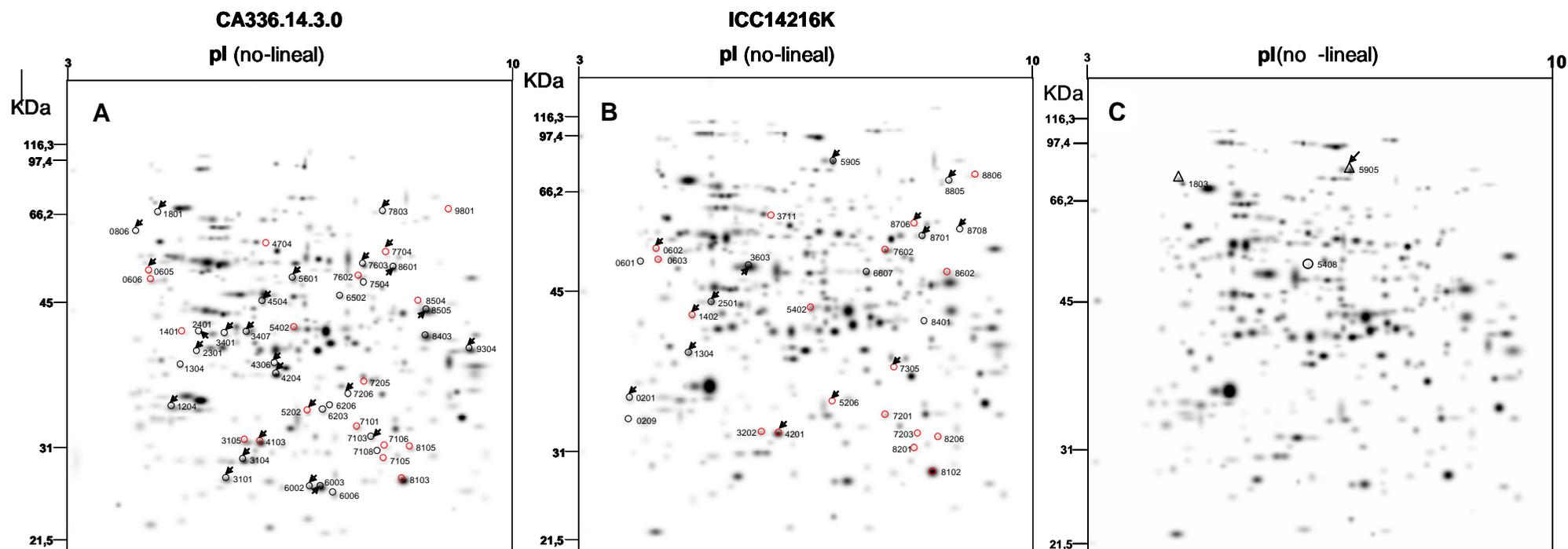


Figura 2.22.- Geles virtuales maestros mostrando las posiciones de las manchas electroforéticas diferenciales significativas estadísticamente entre plantas inoculadas y sin inocular de las líneas CA336.14.3.0 (A) e ICC14216K (B) y entre plantas sin inocular de ambas líneas (C). Se han considerado las proteínas diferenciales significativas entre las comparaciones dos a dos de los tratamientos (Apartado 2.4.4.3) y las que presentaban algún comportamiento cualitativo. Las manchas electroforéticas señaladas con círculos rojos representan proteínas comunes modificadas en ambas líneas y las flechas indican la identificación correcta. Se cargaron 100 µg de proteína en cada gel y la tinción se realizó con Sypro Ruby (Bio-Rad). Los marcadores de peso molecular están situados en la izquierda, expresados en KDa, y el punto isoeléctrico en la parte superior del gel.

2.4.4.4.- Identificación de proteínas.

TABLA 2.7.- Manchas electroforéticas con diferencias cuantitativas entre tratamientos en la línea CA336.14.3.0 a los 35-40 DAI.

SSP	Proteína	Especie	MASCOT ^b	Masa Molecular (observada/teórica)	Punto Isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Intensidad	
							Tratamiento ^d	(ppm) ^e
Estrés y respuesta defensiva ^a								
SSP605/602 ^c	Probable proteína R en cítricos Pt3 (Fragmento).- (Q8H203)	<i>Citrus grandis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	70(8)	52,8/20,26	5,5/7,85	48	Control	1.243±268,2
							<i>Foc-5</i>	3.077,2±663
							<i>Ma</i>	1.306,4±460,2
							<i>Foc-5 + Ma</i>	3.606,6±1.655,8
SSP4103/4201 ^c	Ascorbato peroxidasa (Fragmento).- (Q9SXT2)	<i>Cicer arietinum</i>	90(3)	32,3/19,25	6,8/4,6	33	Control	8.653,6±1.376,1
							<i>Foc-5</i>	10.481,2±1934
							<i>Ma</i>	17.370,6±13.202,4
							<i>Foc-5 + Ma</i>	36.466,0±13.368,1
SSP4504	Peroxidasa (EC1.11.1.7) pxdC (precursor).- (T09665)	<i>Medicago sativa</i>	101(4)	47,0/38,75	6,8/5,76	10	Control	1.412,5±200,1
							<i>Foc-5</i>	2.104±815
							<i>Ma</i>	7.699,9±5.873,2
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.953,3±1.062,6
SSP5202/5206 ^c	Quitinasa clase I (precursor).- (EC 3.2.1.14).- (Q9ZP10)	<i>Cicer arietinum</i>	86(11)	35,1/36,48	7,1/7,37	44	Control	1.201±324
							<i>Foc-5</i>	2.340,6±1.065,6
							<i>Ma</i>	526,7±147,2
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.843,2±963,7
SSP8601	Catalasa (EC 1.11.1.6).- (T12300)	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	196(15)	55,4/57,19	8,0/6,62	37	Control	1.636±666,1
							<i>Foc-5</i>	2.235,6±487,9
							<i>Ma</i>	777,5±359,7
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.488,3±290,1
SSP9304	Proteína R del tipo NBS-LRR (protein-like).- (Q9LJ10)	<i>Oryza sativa</i>	84(18)	41,3/115,19	9,3/8,74	17	Control	4.369,2±2.307,1
							<i>Foc-5</i>	7.535,7±1.855,4
							<i>Ma</i>	5.693,6±1.650,8
							<i>Foc-5 + Ma</i>	16.546,6±1.757,5
Transducción de señales ^a								
SSP1204	Polipéptido intrínseco de la membrana plasmática.- (Q9SMK5)	<i>Cicer arietinum</i>	199(18)	34,9/23,33	5,7/4,95	77	Control	4.921,5±2.019,9
							<i>Foc-5</i>	3.877,2±786,8
							<i>Ma</i>	2.295,2±875,5
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.635,7±728,8

SSP	Proteína	Especie	MASCOT ^b	Masa Molecular (observada/teórica)	Punto Isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Intensidad	
							Tratamiento ^d	(ppm) ^e
SP2301	Anexina (fragmento).- (T09552)	<i>Medicago sativa</i>	69(9)	40,4/34,93	6,0/5,41	24	Control	868,7±403,9
							<i>Foc-5</i>	252,8±40,4
							<i>Ma</i>	1.122,1±178,3
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.946,5±705,4
Transporte de electrones ^a								
SSP1801	Citocromo P450 (protein-like) (Fragmento).- (Q68112)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	72 (10)	68,3/33,70	5,6/6,25	26	Control	735,9±269,6
							<i>Foc-5</i>	1.386±123,7
							<i>Ma</i>	169,9±93,8
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.367,5±508,2
SSP6002	Probable quinona óxido-reductasa (EC 1.6.5.5).- (Q8L5Q7)	<i>Cicer arietinum</i>	78(9)	26,9/21,71	7,1/6,51	47	Control	3.568,9±1.097,9
							<i>Foc-5</i>	6.009,5±1.176
							<i>Ma</i>	3.696±833,6
							<i>Foc-5 + Ma</i>	6.698,4±1.805,1
SSP6003	Probable quinona óxido-reductasa (EC 1.6.5.5).- (Q8L5Q7)	<i>Cicer arietinum</i>	167(12)	26,9/21,71	7,2/6,51	64	Control	7.883,5±1.254,5
							<i>Foc-5</i>	10.472,2±1.574,9
							<i>Ma</i>	5.182,2±1.109,5
							<i>Foc-5 + Ma</i>	9.037,5±1.732,5
Metabolismo ^a								
SSP3104	Triosafosfato isomerasa.- (Q38IW8)	<i>Glycine max</i>	151(9)	30,7/27,42	6,6/5,87	24	Control	5.215,4±431,8
							<i>Foc-5</i>	9.995,0±3.350,3
							<i>Ma</i>	3.766,2±854,8
							<i>Foc-5 + Ma</i>	9.865,2±2.260,2
SSP3401	Glutamato-amonio ligasa (EC 6.3.1.2) alfa. citosólica.- (P07694)	<i>Pisum sativum</i>	148(9)	42,6/39,43	6,3/6,13	22	Control	2.365,0±1.403,5
							<i>Foc-5</i>	3.093,2±794,6
							<i>Ma</i>	1.347,9±377,5
							<i>Foc-5 + Ma</i>	6.241,2±1.830,0
SSP5601	Fosfogluconato deshidrogenasa (descarboxilante) (EC 1.1.1.44).- (O22111)	<i>Glycine max</i>	236(15)	52,0/56,85	6,9/5,55	28	Control	3.841,1±249,4
							<i>Foc-5</i>	3.389±624,1
							<i>Ma</i>	1.466,6±398,3
							<i>Foc-5 + Ma</i>	3.561,1±2080
SSP7603	Glicina hidroximetiltransferasa (EC 2.1.2.1).- (O23254)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	193(13)	55,1/52,14	7,5/6,8	22	Control	3.391,2±724,2
							<i>Foc-5</i>	3.320,7±658,2
							<i>Ma</i>	7.168,5±2.286,8
							<i>Foc-5 + Ma</i>	9.286,5±2.907,6

SSP	Proteína	Especie	MASCOT ^b	Masa Molecular (observada/teórica)	Punto Isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Intensidad	
							Tratamiento ^d	(ppm) ^e
Metabolismo secundario^a								
SSP3101	Chalcona isomerasa (Fragmento).- (Q9SXS9)	<i>Cicer arietinum</i>	127(11)	27,5/15,47	6,3/5,45	24	Control	4.822±1.570,2
							<i>Foc-5</i>	6.185,9±555,8
							<i>Ma</i>	2.088,4±351,8
							<i>Foc-5 + Ma</i>	4.217,3±2.615,8
SSP4204	Óxido-reductasa tipo isoflavona reductasa NAD(P)H-dependiente - (Q9SDZ7)	<i>Medicago sativa</i>	152(4)	38,4/33,95	6,9/6,46	11	Control	6.628,7±307,4
							<i>Foc-5</i>	3.701,5±284,3
							<i>Ma</i>	7.788,4±300,7
							<i>Foc-5 + Ma</i>	4.914,2±1.149,9
SSP4306	2'-hidroxiisoflavona reductasa (EC 1.3.1.45).- (S17830)	<i>Cicer arietinum</i>	152(15)	39,4/35,56	6,8/5,94	40	Control	2.929,2±470,6
							<i>Foc-5</i>	1.877,3±417,7
							<i>Ma</i>	2.877,3±479,7
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.596±703,7
Transporte^a								
SSP3407	Miosina de cadena pesada ("Myosin heavy chain-like").- (Q9FJ35)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	82(19)	42,8/150,04	6,6/4,86	16	Control	2.967,9±798,0
							<i>Foc-5</i>	6.340,8±289,8
							<i>Ma</i>	1.196,4±779,0
							<i>Foc-5 + Ma</i>	4.955,5±1.464,4
SSP8505	Miosina de cadena pesada ("Myosin heavy chain-like").- (Q9FJ36)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	77(13)	46,6/63,04	8,4/7,56	27	Control	12.258,6±1.992,6
							<i>Foc-5</i>	9.470,4±946,1
							<i>Ma</i>	14.088,8±3.033,9
							<i>Foc-5 + Ma</i>	7.671,6±1.970,9
Síntesis y degradación de proteínas^a								
SSP7103	Ab025000 NID.- (Q9SXU1)	<i>Cicer arietinum</i>	283(19)	32,9/27,19	7,6/6,86	67	Control	1.542,7±176,7
							<i>Foc-5</i>	2.988,1±283,4
							<i>Ma</i>	1.447,4±552,5
							<i>Foc-5 + Ma</i>	4.095,9±509
Unión a nucleótidos^a								
SSP7704/8706 ^c	Proteína hipotética At2g35310.- (Q8H0U7)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	76(13)	33,3/59,2	9,83/8,42	31	Control	742,6±137,7
							<i>Foc-5</i>	1.343,6±458,4
							<i>Ma</i>	1.807,1±266,7
							<i>Foc-5 + Ma</i>	3.163,9±1.010,7
SSP7803	Probable gag-pol poliproteína(Q5NRP7)	<i>Solanum demissum</i>	71(22)	71,7/18,74	7,8/8,65	12	Control	846,3±127
							<i>Foc-5</i>	1.111,2±123
							<i>Ma</i>	689,9±104,2
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.478,1±595,1

SSP	Proteína	Especie	MASCOT ^b	Masa Molecular (observada/teórica)	Punto Isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Intensidad	
							Tratamiento ^d	(ppm) ^e
SSP8403	Proteína At2g33435.- (Q3EBP3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	89(18)	43,0/112,27	8,4/9,04	17	Control	7.960,4±944,1
							<i>Foc-5</i>	7.512,7±1.182
							<i>Ma</i>	12.384,4±2597,7
							<i>Foc-5 + Ma</i>	4.104,4±2652,1
Desconocida ^a							Control	519,4±287,8
SSP7206	GblAAC32909.1.- (Q9LVA9)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	68(11)	36,4/48,40	7,4/9,17	19	<i>Foc-5</i>	728±134,5
							<i>Ma</i>	692,3±456,8
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.133,7±895,7
							No identificadas	
SSP606/603 ^c	No identificada			50,8	5,5		<i>Foc-5</i>	4.542,2±1039
							<i>Ma</i>	631,9±227,3
							<i>Foc-5 + Ma</i>	3.417,7±1159,8
							No identificadas	
SSP1401/1402 ^c	No identificada			42,4	5,8		<i>Foc-5</i>	744,6±401
							<i>Ma</i>	4.709,8±1.333,7
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.953,8±1.427,9
							No identificadas	
SSP3105/3202 ^c	No identificada			32,4	6,6		<i>Foc-5</i>	4.403,9±470,7
							<i>Ma</i>	13.662,9±1.384,9
							<i>Foc-5 + Ma</i>	17.900,3±5.012,8
							No identificadas	
SSP5402/5402 ^c	No identificada			43,2	7,0		<i>Foc-5</i>	3.160,6±850,5
							<i>Ma</i>	1.227,8±473,4
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.779,3±267,3
							No identificadas	
SSP6502	No identificada			48,7	7,3		<i>Foc-5</i>	2.999,7±269,2
							<i>Ma</i>	1.912,1±937,1
							<i>Foc-5 + Ma</i>	4.347,1±1.352,7
							No identificadas	
SSP7101/7201 ^c	No identificada			33,7	7,5		<i>Foc-5</i>	3.936±734,4
							<i>Ma</i>	1.388,5±460,9
							<i>Foc-5 + Ma</i>	4.465,5±210,4
							No identificadas	
SSP7105/8201 ^c	No identificada			31,2	7,9		<i>Foc-5</i>	2.343,7±527,8
							<i>Ma</i>	759,4±317,5
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.611,7±639,2
							No identificadas	

SSP	Proteína	Especie	MASCOT ^b	Masa Molecular (observada/teórica)	Punto Isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Intensidad	
							Tratamiento ^d	(ppm) ^e
SSP7106/7203 ^c	No identificada			32,3	7,9		Control	739,1±268,8
							<i>Foc-5</i>	1.667,1±166,2
							<i>Ma</i>	752,8±220,5
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.946,3±467,1
SSP7504	No identificada			50,8	7,5		Control	356,7±92,7
							<i>Foc-5</i>	658±83,1
							<i>Ma</i>	801,4±69,9
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.674,7±569,4
SSP7602/7602 ^c	No identificada			52,5	7,5		Control	1.854,5±879,5
							<i>Foc-5</i>	1.780,7±61,7
							<i>Ma</i>	612,9±368,6
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.637,4±1.022,8
SSP8103/8102 ^c	No identificada			28,1	8,1		Control	8.067,3±2.806,8
							<i>Foc-5</i>	5.147,6±745
							<i>Ma</i>	10.082,9±1.271,4
							<i>Foc-5 + Ma</i>	15.529,8±4.124,7
SSP8105/8206 ^c	No identificada			32,1	8,2		Control	1.101,4±577,6
							<i>Foc-5</i>	3.697,8±178
							<i>Ma</i>	802,4±169,8
							<i>Foc-5 + Ma</i>	4.027,2±720,9
SSP9801/8806 ^c	No identificada			73,6	8,9		Control	404,7±312,4
							<i>Foc-5</i>	1.203,7±769,7
							<i>Ma</i>	1.878,9±177,6
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.933,5±1.191,8

^a Las proteínas han sido clasificadas según las funciones asignadas en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL así como en la literatura científica. Algunas proteínas pueden poseer múltiples funciones, seleccionándose la más importante para clasificar las proteínas en categorías.

^b "Mascot score" y, entre paréntesis, los péptidos coincidentes en la identificación.

^c Manchas electroforéticas afectadas por los tratamientos en ambas líneas. Se relacionan en la figura 2.22 (geles).

^d Control = plantas no-infectadas en ambas líneas.

^e ppm = partes por millón de proteína en cada tratamiento. Los valores representados son la media ± desviación estándar.

TABLA 2.8.- Manchas electroforéticas con diferencias cuantitativas entre tratamientos en la línea ICC14216K a los 35-40 DAI.

SSP	Proteína	Especie	MASCOT ^b	Masa Molecular (observada/teórica)	Punto Isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Intensidad	
							Tratamiento ^d	(ppm) ^e
Estrés y respuesta defensiva ^a								
SSP602 ^c	Probable proteína R en cítricos Pt3 (Fragmento).- (Q8H203)	<i>Citrus grandis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i>	70(8)	52,8/20,26	5,5/7,85	48	Control	1.280,5±621,9
							<i>Foc-5</i>	4.771,9±1.228,7
							<i>Ma</i>	2.334,8±766,9
							<i>Foc-5 + Ma</i>	5.292,4±54,9
SSP4201 ^c	Ascorbato peroxidasa (Fragmento).- (Q9SXT2)	<i>Cicer arietinum</i>	90(3)	32,3/19,25	6,8/4,6	33	Control	9.354,0±2.729,5
							<i>Foc-5</i>	12.557,4±1.319,2
							<i>Ma</i>	6.750,5±4.916,0
							<i>Foc-5 + Ma</i>	46.692,9±16.294,1
SSP5206 ^c	Quitinasa clase I (precursor).- (EC 3.2.1.14).- (Q9ZP10)	<i>Cicer arietinum</i>	101(4)	35,1/36,48	7,1/7,37	44	Control	214,9±93,2
							<i>Foc-5</i>	989,4±531,7
							<i>Ma</i>	1.005,5±502,5
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.112,6±1.189,2
Transporte de electrones ^a								
SSP2501	Probable proteína disulfuro-isomerasa (EC 5.3.4.1) precursor (similaridad).- (P38661)	<i>Medicago sativa</i>	134(16)	43,9/40,81	6,02/5,44	43	Control	3.321,4±336,4
							<i>Foc-5</i>	5.101,9±363,2
							<i>Ma</i>	2.448,6±350,3
							<i>Foc-5 + Ma</i>	5.780,8±462,6
SSP8701	NADH2 deshidrogenasa (ubiquinona) (EC 1.6.5.3) flavoproteína 1 precursor.- (S52261)	<i>Solanum tuberosum</i>	151(19)	55,4/54,33	7,97/8,45	27	Control	896,2±48,9
							<i>Foc-5</i>	3.244,0±504,0
							<i>Ma</i>	1.213,1±166,4
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.520,0±1166,3
Metabolismo ^a								
SSP3603	S-adenosilmetionina sintetasa.- (Q76KV5)	<i>Pisum sativum</i>	239(6)	49,4/37,39	6,47/6,27	18	Control	11.236,1±2.958,8
							<i>Foc-5</i>	14.554,6±1.495,7
							<i>Ma</i>	3.349,8±862,7
							<i>Foc-5 + Ma</i>	10.632±1.950,1
SSP5905	Metionina sintasa.- (Q71EW8)	<i>Glycine max</i>	90(12)	81,7/84,40	7,11/5,93	19	Control	2.902,2±152,4
							<i>Foc-5</i>	4.038,6±330,0
							<i>Ma</i>	2.994,4±1.905,0
							<i>Foc-5 + Ma</i>	11.335,3±1.140,1
Unión a nucleótidos ^a								
SSP1304	Probable proteína de cohesión de cromátidas hermanas ("Putative sister-chromatide cohesion protein").- (Q8LFH0)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	96(19)	39/126,87	5,82/5,24	19	Control	2.948,5±530,8
							<i>Foc-5</i>	3.808,8±893,2
							<i>Ma</i>	1.083,4±86,9
							<i>Foc-5 + Ma</i>	3.049,8±417,3

SSP	Proteína	Especie	MASCOT ^b	Masa Molecular (observada/teórica)	Punto Isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Intensidad	
							Tratamiento ^d	(ppm) ^e
SSP8805	Proteína hipotética F15H21.20.- (B96667)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	80(10)	71,1/55,63	8,38/6,56	19	Control	923,2±289,8
							<i>Foc-5</i>	2.682,6±864,1
							<i>Ma</i>	722,9±209,0
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.977,0±1.048,0
No identificadas								
SSP601	No identificada			50,3	5,05		Control	572,2±126,5
							<i>Foc-5</i>	1.387,4±339,3
							<i>Ma</i>	523,8±161,9
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.120,9±639,5
SSP603 ^c	No identificada			50,8	5,5		Control	1.609,0±622,7
							<i>Foc-5</i>	8.912,3±2.500,2
							<i>Ma</i>	1.040,8±403,1
							<i>Foc-5 + Ma</i>	4.837±1.203,3
SSP1402 ^c	No identificada			42,4	5,8		Control	1.375,1±125,2
							<i>Foc-5</i>	1.737,1±674,0
							<i>Ma</i>	4.658,8±1.565,1
							<i>Foc-5 + Ma</i>	5.905,8±1.889,3
SSP3202 ^c	No identificada			32,4	6,61		Control	3.057,9±1.044,6
							<i>Foc-5</i>	5.583,3±493,0
							<i>Ma</i>	8.116,8±4.187,6
							<i>Foc-5 + Ma</i>	26.720,1±10.677,6
SSP5402 ^c	No identificada			43,2	7,0		Control	4.204,0±1.768,8
							<i>Foc-5</i>	5.641,0±1.566,8
							<i>Ma</i>	1.385,7±624,2
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.543,9±530,4
SSP6607	No identificada			48,7	7,3		Control	1.971,4±622,4
							<i>Foc-5</i>	4.542,7±1.084,9
							<i>Ma</i>	1.861,6±518,7
							<i>Foc-5 + Ma</i>	5.326,1±2.013,0
SSP7201 ^c	No identificada			33,7	7,5		Control	1.399,8±233,0
							<i>Foc-5</i>	3.803,3±125,8
							<i>Ma</i>	2.110,4±546,1
							<i>Foc-5 + Ma</i>	4.698,8±2.220,2
SSP7203 ^c	No identificada			32,3	7,9		Control	345,3±128,3
							<i>Foc-5</i>	1.681,6±570,4
							<i>Ma</i>	1.017,7±204,2
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.917,0±1.681,0

SSP	Proteína	Especie	MASCOT ^b	Masa Molecular (observada/teórica)	Punto Isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Intensidad	
							Tratamiento ^d	(ppm) ^e
SSP7602 ^c	No identificada			52,5	7,5		Control	2.454,4±124,7
							<i>Foc-5</i>	2.559,8±723,1
							<i>Ma</i>	429,6±207,6
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.223,2±986,1
SSP8102 ^c	No identificada			28,1	8,1		Control	8.257,2±1.730,3
							<i>Foc-5</i>	13.151,5±3.452,4
							<i>Ma</i>	12.880,2±1.290,9
							<i>Foc-5 + Ma</i>	33.767,5±15.815,5
SSP8201 ^c	No identificada			31,2	7,9		Control	940,8±154,4
							<i>Foc-5</i>	3.375,2±1.436,9
							<i>Ma</i>	1.140,9±298,2
							<i>Foc-5 + Ma</i>	3.158,2±1.396,8
SSP8206 ^c	No identificada			32,1	8,2		Control	1.165,2±349,9
							<i>Foc-5</i>	3.652,4±1.000,5
							<i>Ma</i>	1.451,8±250,3
							<i>Foc-5 + Ma</i>	4.556,5±2.862,8
SSP8401	No identificada			41,8	7,99		Control	351,6±12,7
							<i>Foc-5</i>	323,0±50,9
							<i>Ma</i>	835,6±332,3
							<i>Foc-5 + Ma</i>	978,0±498,4
SSP8806 ^c	No identificada			73,6	8,9		Control	815,3±227,8
							<i>Foc-5</i>	2.367,4±1.132,5
							<i>Ma</i>	1.788,8±485,3
							<i>Foc-5 + Ma</i>	6.233,7±3.769,5

^a Las proteínas han sido clasificadas según las funciones asignadas en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL así como en la literatura científica. Algunas proteínas pueden poseer múltiples funciones, seleccionándose la más importante para clasificar las proteínas en categorías.

^b "*Mascot score*" y, entre paréntesis, los péptidos coincidentes en la identificación.

^c Manchas electroforéticas afectadas por los tratamientos en ambas líneas. Se relacionan en la figura 2.22 (geles).

^d Control = plantas no-infectadas en ambas líneas.

^e ppm = partes por millón de proteína en cada tratamiento. Los valores representados son la media ± desviación estándar.

TABLA 2.9.- Manchas electroforéticas con diferencias cualitativas entre tratamientos en la línea CA336.14.3.0 a los 35-40 DAI.

SSP	Proteína	Especie	MASCOT ^b	Masa Molecular (observada/teórica)	Punto Isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Intensidad		
							Tratamientos ^c	(ppm) ^d	
Metabolismo ^a							Control	930,5±194,5	c
SSP2401	Glutamina sintetasa.- (O04998)	<i>Medicago trunculata</i>	78(6)	42,7/39,33	6,0/5,51	15	<i>Foc-5</i>	-	-
							<i>Ma</i>	1.617±252	b
							<i>Foc-5 + Ma</i>	3.385,5±89,3	a
Unión a nucleótidos ^a							Control	-	-
SSP7205/7305 ^e	Probable retrotransposón, subclaseTy3-gypsy.-(Q53MU3)	<i>Oryza sativa</i>	87(21)	37,7/158,11	7,53/8,96	12	<i>Foc-5</i>	-	-
							<i>Ma</i>	764±320,5	a
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.015,9±955	a
No identificadas ^a							Control	510±47,3	b
SSP806	No identificada			62,1	5,1		<i>Foc-5</i>	1.153±109,8	a
							<i>Ma</i>	-	-
							<i>Foc-5 + Ma</i>	685,6±340,7	ab
							Control	-	-
SSP1304	No identificada			39,6	5,7		<i>Foc-5</i>	-	-
							<i>Ma</i>	-	-
							<i>Foc-5 + Ma</i>	968,8±146,3	a
							Control	-	-
SSP4704/3711 ^e	No identificada			60,1	6,7		<i>Foc-5</i>	-	-
							<i>Ma</i>	2.411,9±646,2	a
							<i>Foc-5 + Ma</i>	3.922,8±1.233	a
							Control	1.485,6±688,1	a
SSP6006	No identificada			26,0	7,3		<i>Foc-5</i>	2.223,7±523,8	a
							<i>Ma</i>	-	-
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.434,5±299,3	a
							Control	400,1±138	b
SSP6203	No identificada			35,1	7,2		<i>Foc-5</i>	1.449,3±224,5	a
							<i>Ma</i>	-	-
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.318,9±299,6	a
							Control	400,1±138	b
SSP6206	No identificada			36,2	7,3		<i>Foc-5</i>	1.449,3±224,5	a
							<i>Ma</i>	-	-
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.318,9±299,6	a
							Control	400,1±138	b

Análisis proteómico de las interacciones de *M. artiellia* y *Foc-5* con garbanzo

SSP7108	No identificada	31,6	7,8	Control	-	-
				<i>Foc-5</i>	-	-
				<i>Ma</i>	-	-
				<i>Foc-5 + Ma</i>	1.257±150,5	a
SSP8504/8602 ^e	No identificada	48,4	8,89	Control	1.214,4±227,2	b
				<i>Foc-5</i>	-	-
				<i>Ma</i>	6.092,8±763,7	a
				<i>Foc-5 + Ma</i>	1.558,2±323,4	b

^a Las proteínas han sido clasificadas según las funciones asignadas en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL así como en la literatura científica. Algunas proteínas pueden poseer múltiples funciones, seleccionándose la más importante para clasificar las proteínas en categorías.

^b "Mascol score" y, entre paréntesis, los péptidos coincidentes en la identificación.

^c Control = plantas no-infectadas en ambas líneas.

^d ppm = partes por millón de proteína en cada tratamiento. Las medias seguidas por letras muestran su posible separación entre tratamientos mediante el test LSD. Los datos fueron transformados mediante $\log(X)$ para su análisis, las medias \pm desviación estándar sin transformar son representadas en esta tabla.

^e Manchas electroforéticas afectadas por los tratamientos en ambas líneas. En primer término se indica el número de identificación en gel en la línea CA336.14.30 y en el siguiente en ICC14216K Se relacionan en la figura 2.22 (geles).

TABLA 2.10.- Manchas electroforéticas con diferencias cualitativas entre tratamientos en la línea ICC14216K a los 35-40 DAI.

SSP	Proteína	Especie	MASCOT ^b	Masa Molecular (observada/teórica)	Punto Isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Intensidad		
							Tratamientos ^c	(ppm) ^d	
Síntesis y degradación de proteínas ^a									
SSP8708	Probable glicoproteína extracelular dérmica (Fragmento).- (Q9FSZ9)	<i>Cicer arietinum</i>	94(12)	57,3/40,44	8,62/7,96	31	Control	-	-
							<i>Foc-5</i>	-	-
							<i>Ma</i>	1.152,3±201,9	a
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.860,2±822,8	a
Unión a nucleótidos ^a									
SSP201	Probable proteína de unión a DNA RAV1 (importada) (Q9C688)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	72(10)	35/40,57	4,66/6,77	26	Control	2.495,0±1.153,6	a
							<i>Foc-5</i>	7.540,6±3.364,8	a
							<i>Ma</i>	-	-
							<i>Foc-5 + Ma</i>	-	-
SSP7305 ^e	Probable retrotransposón, subclaseTy3-gypsy.- (Q53MU3)	<i>Oryza sativa</i>	87(21)	37,7/158,11	7,53/8,96	12	Control	-	-
							<i>Foc-5</i>	-	-
							<i>Ma</i>	1.008,8±315,5	a
							<i>Foc-5 + Ma</i>	2.472,6±1.375,9	a
SSP8706 ^e	Proteína hipotética At2g35310 (Q8H0U7)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	76(13)	33,3/59,2	9,83/8,42	31	Control	-	-
							<i>Foc-5</i>	-	-
							<i>Ma</i>	2.533,7±421,3	a
							<i>Foc-5 + Ma</i>	4.316,2±1.871,0	a
No identificadas ^a									
SSP209	No identificada			33,3	4,57		Control	1.175,3±1.150,8	a
							<i>Foc-5</i>	3.876,8±2.040,6	a
							<i>Ma</i>	-	-
							<i>Foc-5 + Ma</i>	-	-
SSP3711 ^e	No identificada			60,1	6,7		Control	-	-
							<i>Foc-5</i>	-	-
							<i>Ma</i>	1.811,1±1.420,4	a
							<i>Foc-5 + Ma</i>	1.264,9±230,4	a
SSP8602 ^e	No identificada			48,4	8,89		Control	1.523,6±792,8	b
							<i>Foc-5</i>	-	-
							<i>Ma</i>	5.019,3±1.872,2	a
							<i>Foc-5 + Ma</i>	973,6±341,1	b

^a Las proteínas han sido clasificadas según las funciones asignadas en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL así como en la literatura científica. Algunas proteínas pueden poseer múltiples funciones, seleccionándose la más importante para clasificar las proteínas en categorías.

^b "Mascot score" y, entre paréntesis, los péptidos coincidentes en la identificación.

^c Control = plantas no-infectadas en ambas líneas.

^d ppm = partes por millón de proteína en cada tratamiento. Las medias seguidas por letras muestran su posible separación entre tratamientos mediante el test LSD. Los datos fueron transformados mediante $\log(X)$ para su análisis, las medias \pm desviación estándar sin transformar son representadas en esta tabla.

^a Manchas electroforéticas afectadas por los tratamientos en ambas líneas. Se relacionan en la figura 2.22 (geles).

TABLA 2.11.- Manchas electroforéticas con diferencias constitutivas entre las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K a los 35-40 DAI.

Nº	Proteína	Especie	MASCOT ^b	Masa Molecular (observada/teórica)	Punto Isoeléctrico (observado/teórico)	Secuencia de cobertura (porcentaje)	Intensidad		
							Tratamientos ^c	(ppm) ^d	
Metabolismo^a									
SSP5905	Metionina sintasa.- (Q71EW8)	<i>Glycine max</i>	90(12)	81,7/84,40	7,11/5,93	19	CA336.14.3.0	1,099.5±954.5	b
							ICC14216K	2,901.8±410.4	a
No identificadas^a									
SSP1202	No identificada	-	-	82.64	5,43	-	CA336.14.3.0	902,9±70,1	b
							ICC14216K	1282,8±97,6	a
SSP4502	No identificada	-	-	52,33	6,82	-	CA336.14.3.0	- ^a	-
							ICC14216K	809,6±303,8	-

^a Las proteínas han sido clasificadas según las funciones asignadas en las bases de datos Swiss-Prot y TrEMBL así como en la literatura científica. Algunas proteínas pueden poseer múltiples funciones, seleccionándose la más importante para clasificar las proteínas en categorías.

^b *Mascot score*^a y, entre paréntesis, los péptidos coincidentes en la identificación.

^c Control = plantas no-infectadas en ambas líneas.

^d ppm = partes por millón de proteína en cada tratamiento. Las medias seguidas por letras muestran su posible separación entre tratamientos mediante el test LSD. Los datos fueron transformados mediante $\log(X)$ para su análisis, las medias \pm desviación estándar sin transformar son representadas en esta tabla.

La identificación de proteínas mediante el uso de espectrometría de masas con MALDI-TOF/TOF no fue muy exitosa en comparación con el experimento en fases tempranas de la interacción (4-8 DAI). La menor cantidad de proteína aplicada a los geles, con la consiguiente pérdida de resolución y disminución de las coincidencias entre espectros para la identificación, puede considerarse como una posible causa de este hecho. Además, el garbanzo es una especie no secuenciada y con un número escaso de secuencias depositadas en las bases de datos, lo que en cualquier circunstancia supone una dificultad añadida.

En la línea CA336.14.3.0, de las 38 proteínas que mostraron variaciones cuantitativas significativas en las comparaciones dos a dos (Fig. 2.21A), solo se identificaron 25 (incluyendo la identificación de SSP7206 con una proteína de función desconocida; Tabla 2.7), mientras que de las 10 que presentaron variaciones de tipo cualitativo (presencia/ausencia), solo se pudieron identificar dos (Tabla 2.9). En la línea ICC14216K, de las 23 manchas electroforéticas que presentaron alguna diferencia cuantitativa significativa en las comparaciones dos a dos (Fig. 2.21B) solo se pudieron identificar 9 (Tabla 2.8), mientras que de las 7 que presentaron alguna regulación de tipo cualitativo, se pudieron identificar 4 (Tabla 2.10). Considerando las proteínas que resultaron afectadas en ambas líneas, de las 15 que presentaron diferencias cuantitativas, solo se identificaron tres (Tablas 2.7-2.8), y de las 3 que se modificaron de forma cualitativa en algún tratamiento, solo se identificó una de ellas (Tablas 2.9-2.10). La codificación de las manchas electroforéticas comunes en ambas líneas es la correspondiente a la línea CA336.14.3.0; entre éstas, la mancha electroforética SSP7704 tuvo un comportamiento singular al resultar regulada cuantitativamente en dicha línea, donde su contenido se incrementó, respecto al control, en las plantas inoculadas con el nematodo, tanto individual como conjuntamente con *Foc-5* (Fig. 2.21A), mientras que en 'ICC14216K' dicha mancha electroforética (cuyo código en esta línea es SS8706) resultó regulada cualitativamente, puesto que solo se detectó, en contenidos similares, en las plantas inoculadas, individual o conjuntamente, con el nematodo (Tabla 2.10). Por este motivo SSP7704, aunque se mantuvo en la Tabla 2.7 dentro de las manchas electroforéticas afectadas en ambas líneas, no se incluye en la Tabla 2.8 sino en la 2.10.

Las manchas electroforéticas identificadas han permitido agrupar las proteínas modificadas cuantitativamente por sus categorías funcionales (Figs. 2.23 y 2.24), observándose que, en ninguna de las líneas, hay asociación de tales categorías funcionales con las correlaciones de los componentes principales. Sin embargo, al analizar las comparaciones dos a dos, se observa en proporción, un mayor número de proteínas relacionadas con el estrés y la respuesta defensiva en ambas líneas (Fig. 2.24). En este caso, las categorías funcionales se

distribuyen de la siguiente manera en 'CA336.14.3.0' (Fig. 2.24): estrés y respuesta defensiva (15,8 %), metabolismo (10,5 %), transporte de electrones (7,9 %), unión a nucleótidos (7,9 %), transducción de señales (5,3 %), transporte (5,3 %), síntesis y degradación de proteínas (2,6 %), desconocida (2,6 %) y no identificadas (34,2 %); mientras que en 'ICC14216K' la distribución es (Fig. 2.24): estrés y respuesta defensiva (13,1 %), metabolismo (8,7 %), unión a nucleótidos (8,7 %), transporte de electrones (8,7 %) y no identificadas (60,87 %). Se observa un mayor número de funciones alteradas en 'CA336.14.3.0', aunque esto podría deberse al superior número de identificaciones producido en esta línea respecto a la 'ICC14216K'. En ambos genotipos, la función principal modificada fue la de estrés y respuesta a patógenos, seguida por metabolismo.

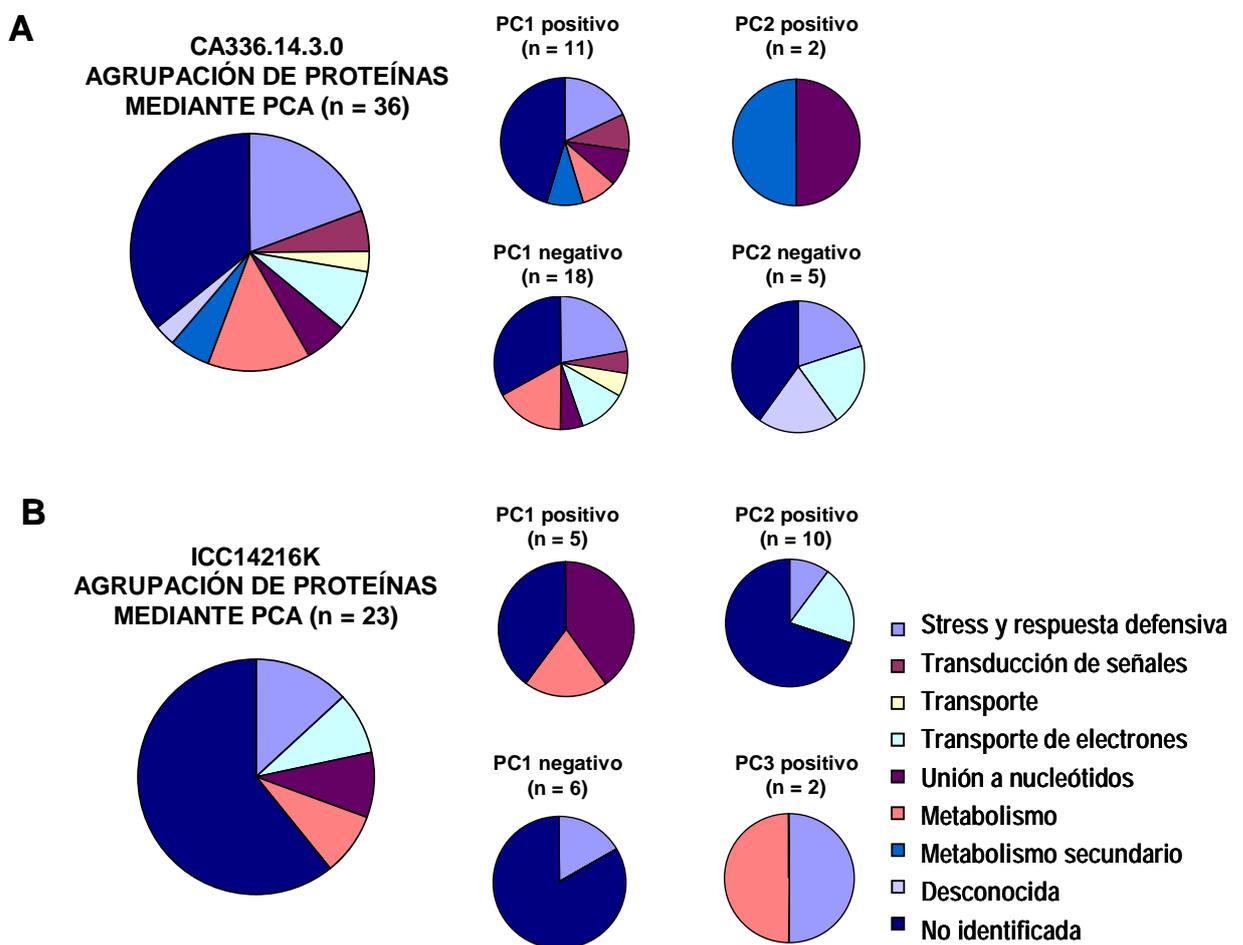


Figura 2.23.- Asociación de categorías funcionales con las agrupaciones de expresión en los componentes principales en las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K.

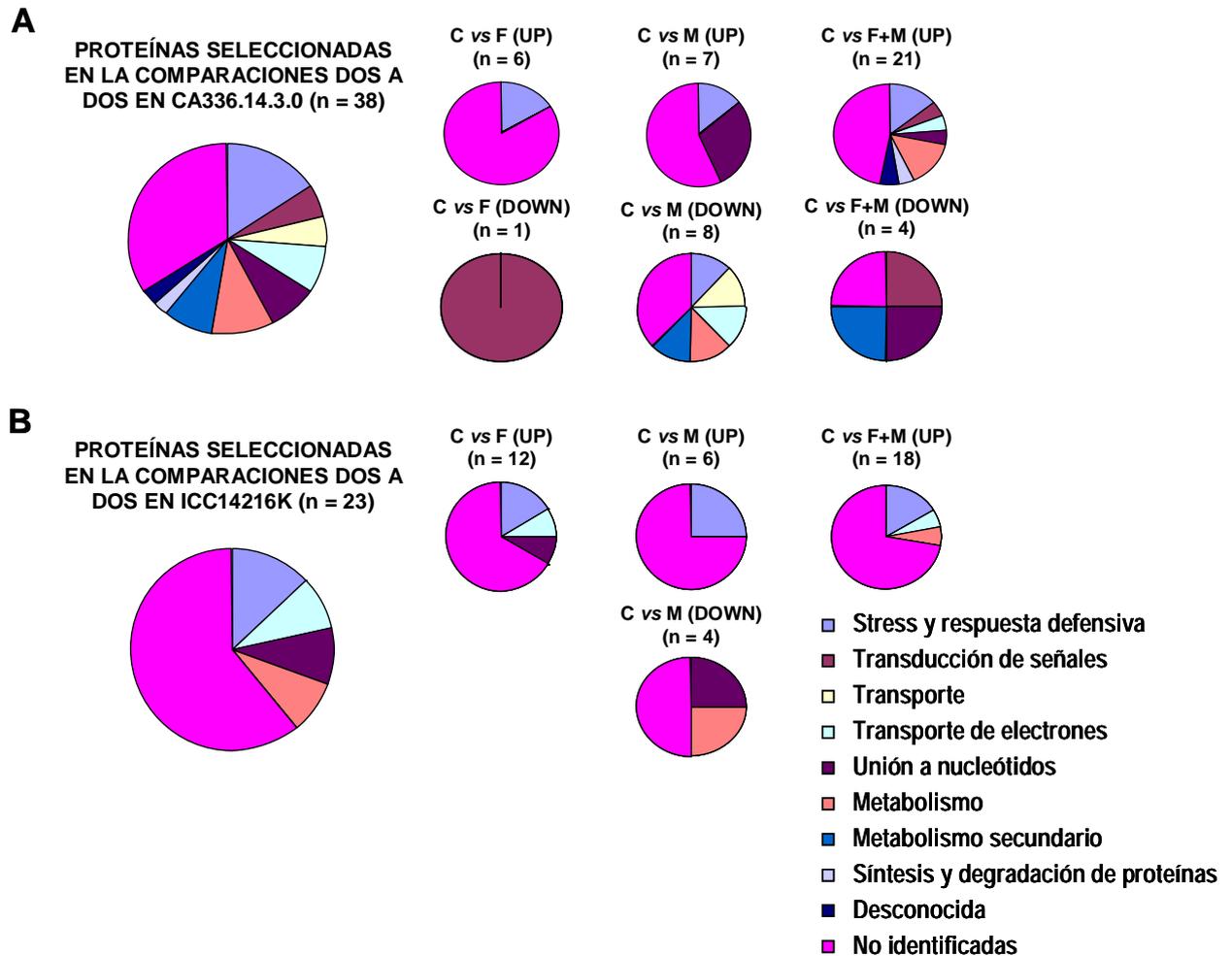


Figura 2.24.- Asociación de categorías funcionales con las agrupaciones de expresión en las comparaciones dos a dos en las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K.

Las manchas electroforéticas que se vieron modificadas en ambas líneas, no siempre lo hicieron en la misma dirección. Así, de las 15 manchas electroforéticas que presentaron un comportamiento cuantitativo, solo 5 (SSP606, SSP3105, SSP7105, SSP7602, SSP8105) respondieron de forma bastante similar a las diferentes inoculaciones en 'CA336.14.3.0' e 'ICC14216K', mientras que el resto de manchas electroforéticas presentaron alguna respuesta diferencial entre líneas (Fig. 2.22). Entre las tres proteínas de este grupo que fueron identificadas, la quitinasa clase I (SSP5202/5206) presentó un comportamiento diferencial entre líneas al incrementarse significativamente en las plantas inoculadas con *Foc-5*, *M. artiellia* y ambos patógenos conjuntamente, pero sólo en ICC14216K, mientras que las otras dos (SSP605/602 y SSP4103/4201) se modificaron de forma similar en ambas líneas. La SSP605/602, análoga a una proteína R de cítricos, aumentó su expresión en las plantas inoculadas con *Foc-5* y ambos patógenos conjuntamente, y la SSP4103/4201, identificada como

ascorbato peroxidasa, experimentó un fuerte incremento en las plantas inoculadas con ambos patógenos simultáneamente (Fig. 2.22).

Las tres manchas electroforéticas que se modificaron cualitativamente en ambas líneas, sí presentaron en todos los casos un comportamiento similar (Tablas 2.9 y 2.10), siendo dos de ellas (SSP4704/3711 y SSP7205/7305) sólo detectadas en las plantas inoculadas con *M. artiellia* ó la combinación de ambos patógenos, mientras que la tercera (SSP8504/8602), que se indujo en la inoculación simple con el nematodo y no varió, respecto al control, en la inoculación doble, desapareció en las plantas inoculadas de forma individual con *Foc-5*. De estas tres manchas electroforéticas, solo ha sido posible identificar SSP7205/7305 como un probable retrotransposón de la subclase “Ty3-gypsy”.

De las manchas electroforéticas que sólo experimentaron modificaciones en una de las líneas, 24 y 7 resultaron reguladas de forma cuantitativa o cualitativa, respectivamente, en CA336.14.3.0, mientras que 9 y 4 lo fueron, respectivamente, en ICC14216K. De las regulaciones en CA336.14.3.0, 22 cuantitativas y una cualitativa pudieron ser identificadas; a su vez, 6 cuantitativas y 3 cualitativas lo fueron en ICC14216K.

La única identificación de regulación cualitativa en ‘CA336.14.3.0’ lo fue con una enzima del metabolismo general, glutamina sintetasa de *Medicago truncatula* (SSP2401), que, respecto al control, incrementó su contenido en respuesta al nematodo, tanto en la inoculación individual como en la doble, pero no pudo detectarse en las plantas inoculadas sólo con *Foc-5* (Tabla 2.9). A su vez, las identificaciones de proteínas reguladas cuantitativamente sólo en ‘CA336.14.3.0’ incluyeron las que seguidamente se relacionan dentro de las siguientes funciones (Tabla 2.7):

- a) Estrés y respuesta defensiva, con 3 integrantes, identificados, respectivamente, con una peroxidasa de *Medicago sativa* (SSP4504), que se indujo, respecto al control, en la inoculación simple con *M. artiellia* (Fig. 2.21A); con una catalasa de *Mesembryanthemum crystallinum* L. (SSP8601), que resultó reprimida en la anterior interacción (Fig. 2.21A); y con una proteína R de tipo NBS-LRR de arroz (SSP9304), que se indujo en la inoculación conjunta con ambos patógenos (Fig. 2.21A).
- b) Transducción de señales, con 2 integrantes, identificados, respectivamente, con un polipéptido intrínseco de membrana plasmática de garbanzo (SSP1204), que se reprimió, respecto al control, en las plantas sometidas a la doble inoculación (Fig. 2.21A); y con una anexina de *M. sativa* (SSP2301), que, respecto al control, resultó reprimido en respuesta a la inoculación individual con *Foc-5* y se indujo en la doble inoculación (Fig. 2.21A).

- c) Transporte de electrones, con 3 integrantes, de los cuales uno se identificó con una proteína tipo citocromo P450 de *Arabidopsis thaliana* (SSP1801), que se reprimió en la inoculación individual con *M. artiellia*, y los dos restantes, que se identificaron con una misma quinona óxidorreductasa de garbanzo (SSP602 y SSP603), el primero de los cuales se indujo, respecto al control, en las plantas sometidas a la doble inoculación y lo hicieron ambos en las plantas inoculadas con ambos patógenos, respecto a las solo inoculadas con el nematodo (Fig. 2.21A).
- d) Metabolismo, con 4 integrantes, tres de los cuales, identificados, respectivamente, con una triosafosfato isomerasa de *Glycine max* (SSP3104), una glutamina sintetasa de *Pisum sativum* (SSP3401) y una glicina hidroximetiltransferasa de *A. thaliana* (SSP7603), se indujeron, respecto al control, tras la doble inoculación, mientras que el restante, identificado con una fosfogluconato deshidrogenasa de *G. max* (SSP5601), se reprimió, respecto al control, tras la inoculación simple con el nematodo.
- e) Metabolismo secundario, con 3 integrantes, todos ellos identificados con enzimas de la ruta flavonoide/isoflavonoide, en concreto chalcona isomerasa (CHI) y 2'-hidroxiisoflavona reductasa (2'HR) de garbanzo (respectivamente, SSP3101 y SSP4306) e isoflavona reductasa (IFR) de *M. sativa* (SSP4204), y de los que los dos primeros se reprimieron, respecto al control, tras la inoculación simple con el nematodo o la doble con ambos patógenos, respectivamente, mientras que el tercero solo mostró un cambio cuantitativo significativo (incremento) al compararse el efecto de la inoculación con el nematodo respecto a la inoculación con el hongo (Fig. 2.21A).
- f) Miscelánea de funciones, incluyendo: f.1) dos formas de una proteína motora, identificadas con sendas cadenas pesadas de miosina de *A. thaliana* (SP3407 y SP8505), de las que la primera resultó reprimida, respecto al control, tras la inoculación simple con *M. artiellia*, y la segunda mostró, como único cambio significativo, un descenso del contenido al comparar la doble inoculación respecto a la inoculación simple con el nematodo; f.2) una proteína con posible función proteolítica, identificada con un componente (α_7) del núcleo 20S del proteasoma 26S de garbanzo (SPP7103), que se indujo, respecto al control, en las plantas sometidas a la doble inoculación; f.3) tres proteínas con posible función enlazante de nucleótidos e identificadas, respectivamente, con una proteína hipotética de *A. thaliana* dotada de un dominio B3 exclusivo de factores de transcripción de plantas superiores (SSP7704), que resultó inducida, respecto al control, en las plantas inoculadas con el nematodo, tanto individual como conjuntamente con *Foc-5*; con una probable poliproteína gag-pol

de *Solanum demissum* funcionalmente relacionada con la replicación de retrotransposones (SSP7803), que resultó inducida, respecto al control, en las plantas inoculadas individualmente con el nematodo; y con una proteína de *A. thaliana* de función no definida (SSP8403), que resultó reprimida, respecto al control, en las plantas sometidas a la doble inoculación; y f.4) una proteína identificada con una de función desconocida de *A. thaliana* (SSP7206), que resultó inducida, respecto al control, en las plantas sometidas a la doble inoculación (Fig. 2.21A).

Por lo que respecta a 'ICC14216K', las identificaciones correspondientes a regulaciones específicas de tipo cuantitativo incluyeron las siguientes funciones (Tabla 2.8):

- a) Transporte de electrones, con 2 integrantes, uno (SSP2501), identificado con una probable disulfuro-isomerasa de *M. sativa*, que mostró, como único cambio significativo, un incremento de contenido al comparar, frente a la inoculación simple con el nematodo, tanto la inoculación simple con *Foc-5* como la doble con ambos patógenos; y el otro (SSP8701), identificado con una NADH deshidrogenasa (ubiquinona) de *Solanum tuberosum*, que resultó inducido, respecto al control, en las plantas sometidas a la inoculación simple con *Foc-5* y a la doble inoculación (Fig. 2.21B).
- b) Metabolismo, con 2 integrantes relacionados con la ruta de trans-metilación, uno (SSP3603), identificado con una S-adenosilmetionina sintetasa de *P. sativum*, que resultó reprimido, respecto al control, en las plantas inoculadas sólo con el nematodo; y el otro (SSP5905), identificado con una metionina sintasa de *G. max*, que resultó inducido, respecto al control, en las plantas sometidas a la doble inoculación (Fig. 2.21B).
- c) Unión a nucleótidos, con 2 integrantes, uno (SSP1304), identificado con una probable proteína de cohesión de cromátidas hermanas de *A. thaliana*, que resultó reprimido, respecto al control, en las plantas inoculadas sólo con el nematodo; y el otro (SSP8805), identificado con una proteína hipotética de *A. thaliana* con posible función como factor de transcripción de la familia bZIP, que resultó inducido, respecto al control, en las plantas sometidas a la inoculación simple con *Foc-5* (Fig. 2.21B).

A su vez, las regulaciones de tipo cualitativo producidas sólo en 'ICC14216K' por efecto de los distintos tratamientos incluyeron identificaciones encuadradas funcionalmente en los siguientes dos grupos (Tabla 2.10):

- a) Síntesis y degradación de proteínas, con un único integrante (SSP8708), identificado con una posible glicoproteína extracelular dérmica de garbanzo con actividad inferida

de aspártico-proteasa, que sólo se detectó en plantas inoculadas con el nematodo, bien de forma individual o conjuntamente con *Foc-5* (Tabla 2.10).

- b) Unión a nucleótidos, con dos integrantes, uno (SSP201), identificado con un factor de transcripción de respuesta a etileno de tipo RAV1 de *A. thaliana*, que, no afectándose significativamente por la inoculación con *Foc-5*, pareció reprimirse completamente en plantas inoculadas con el nematodo, bien de forma individual o conjuntamente con *Foc-5* (Tabla 2.10); mientras que el otro (SSP8706), que sólo se detectó en plantas inoculadas, bien individual o conjuntamente con *Foc-5*, con el nematodo (Tabla 2.10), resultó similar a la mancha SSP7704, regulada de forma cuantitativa en 'CA336.14.3.0', siendo por tanto identificado con un posible factor de transcripción con dominio B3 de *A. thaliana*.

Finalmente, de las tres únicas diferencias, dos cuantitativas y una cualitativa, obtenidas en la comparación de los controles de ambas líneas, sólo pudo identificarse una (SSP5905), la cual estuvo representada en 'ICC14216K' en una cuantía casi tres veces superior que en 'CA336.14.3.0' (Tabla 10). Esta proteína, identificada con una metionina sintasa de *G. max*, fue una de las regulaciones cuantitativas específicas de la línea ICC14216K (Tabla 2.8, Fig. 2.22B).

2.4.5.- RESPUESTA EN EL FLUIDO APOPLÁSTICO

2.4.5.1.- Respuesta a los 14 y 18 DAI

El proteoma estudiado consiste en las proteínas secretadas al apoplasto por las células así como aquéllas, débilmente ancladas a la pared celular, que resultan extraídas mediante el tampón descrito en materiales y métodos (apartado 2.2.6.1). La concentración se realizó mediante diálisis de la muestra y posterior liofilización. En experimentos preliminares la liofilización, sin usar una etapa previa de eliminación de sales, produjo una elevada precipitación de éstas al resuspender la muestra.

El análisis del fluido apoplástico mediante SDS-PAGE a los 14 DAI (tiempo de desarrollo de los primeros síntomas de FVG en la línea susceptible JG62) no reveló variaciones en el patrón de proteínas, entre las plantas inoculadas con *Foc-5* y sus respectivos controles, en las líneas resistentes CA336.14.3.0 e ICC14216K, mientras que sí se observó una banda de peso molecular de 25 KDa en la línea susceptible JG62 (Fig. 2.25). Esta misma banda, también observada de forma muy tenue en las líneas resistentes, no resultó modificada en éstas por la

interacción con el patógeno. Tal como se indica en la Tabla 2.12, dicha banda fue identificada con una endo-quitinasa ácida cuya expresión se induce en garbanzo tras inoculación con *A. rabiei* (Vogelsang y Barz, 1993).

La respuesta a los 18 DAI (tiempo para desarrollo completo de los síntomas de FVG en la línea susceptible JG62) fue diferente entre las tres líneas estudiadas. Así, mientras que en 'CA336.14.3.0' no se observó ninguna respuesta a la infección con *Foc-5*, ésta produjo en 'ICC14216K' el aumento de intensidad de una banda (banda 5 en Fig. 2.26B), y en 'JG62' el de una banda de similar movilidad a la anterior más otras dos (indicadas, respectivamente, como bandas 2-4 en la Fig. 2.26A). De las anteriores, las proteínas 2 y 3 se han identificado con sendas endo-glucanasas de garbanzo, las cuales son proteínas de respuesta a patógenos, según la información proporcionada por las bases de datos, y la proteína 4 fue identificada con la misma quitinasa ácida de garbanzo (banda 1) cuya expresión experimentó variación en JG62 a 14DAI (Tabla 2.12).

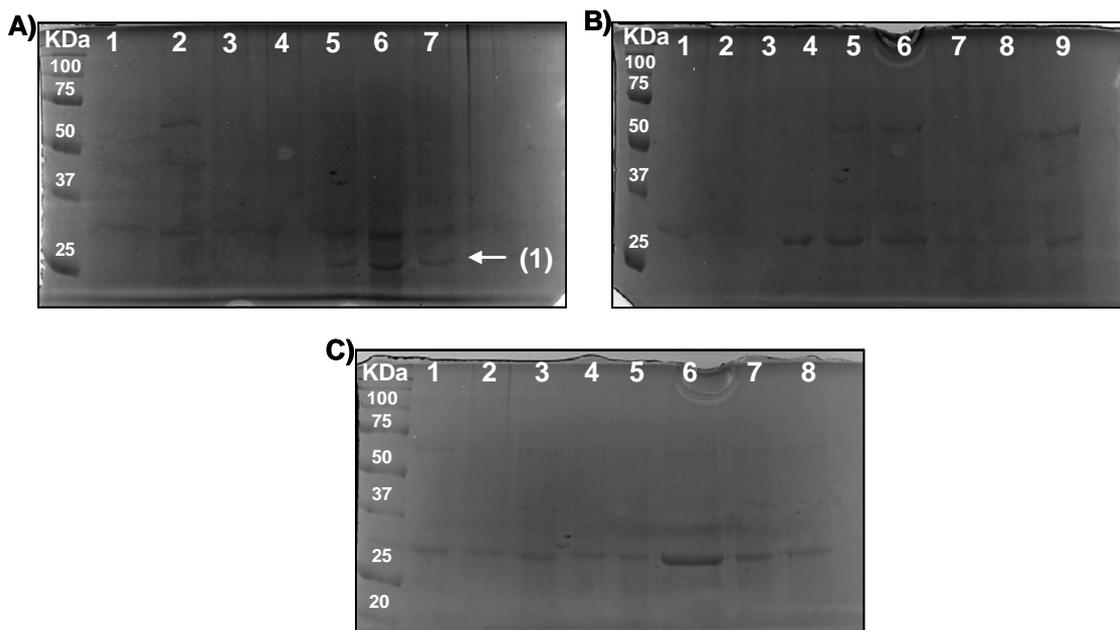


Figura 2.25.- Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas del fluido apoplástico de plantas de garbanzo, líneas JG62 (A), CA336.14.3.0 (B) e ICC14216K (C), inoculadas con la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, a los 14 DAI. Carriles 1-4, plantas control; y 5-7, plantas inoculadas con *Foc-5*. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular. En todos los casos se cargó la misma cantidad de proteína (15 µg) y se tiñó con Coomassie G-250.

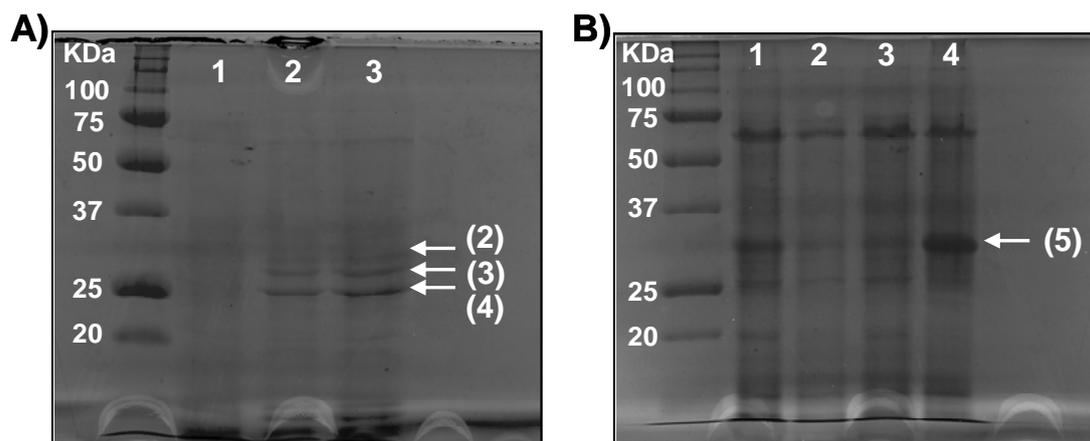


Figura 2.26.- Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas del fluido apoplástico de plantas de garbanzo, líneas JG62 (A), CA336.14.3.0 e ICC14216K (B), inoculadas con la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, a los 18 DAI. A) 'JG62', 1, plantas control y 2-3 plantas inoculadas con *Foc-5*. B) 'CA336.14.3.0' e 'ICC14216K', 1-2, plantas control e inoculadas, respectivamente, de 'CA336.14.3.0' y 3-4, plantas control e inoculadas, respectivamente, de 'ICC14216K'. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular. En todos los casos se cargó la misma cantidad de proteína (15 µg) y se tiñó con Coomassie G-250.

TABLA 2.12.-Proteínas del fluido extracelular de la raíz de garbanzo ('JG62', 'CA336.14.3.0' e 'ICC14216K') afectadas por la inoculación con *Foc-5* (30.000 clamidosporas / g suelo) a los 14 y 18 DAI. Los números de las proteínas corresponden a los indicados en las Figs. 2.25 y 2.26.

Nº	Proteína	Especie	MASCOT ^a	Masa molecular (observada/teórica) KDa	Secuencia de cobertura (porcentaje)
1	Endo-quitinasa ácida (Clase III) (precursor) (P36908)	<i>Cicer arietinum</i>	278 (8)	25,0/31,61	43
2	Glucan-endo-1,3-beta-glucosidasa (Precursor) (Q9XFW9)	<i>Cicer arietinum</i>	93 (5)	28,5/41,37	15
3	Glucan-endo-1,3-beta-glucosidasa (Precursor) (Q9ZP12)	<i>Cicer arietinum</i>	148 (8)	27,0/35,63	41
4	Endo-quitinasa ácida (Clase III) (precursor) (P36908)	<i>Cicer arietinum</i>	278 (8)	25,0/31,61	43
5	No identificada	-	-	30,0	-

^a "Mascot score" y, entre paréntesis, los péptidos coincidentes en la identificación.

2.4.5.2.- Respuesta a los 40 DAI mediante "split-root"

En este experimento no se observó ningún efecto de la división de raíces en las plantas que no fueron inoculadas, con lo que se puede concluir que las diferencias en peso y respuesta proteómica, son debidas al efecto localizado o sistémico de los patógenos. A la finalización del experimento, no se observó ninguna respuesta de pérdida de resistencia a los 40 DAI en las líneas estudiadas, al inocular los patógenos conjuntamente en la misma planta. En ambas líneas (CA336.14.3.0 e ICC14216K), en la doble inoculación, la parte radical inoculada con *Foc-5* presentó síntomas de necrosis y menor crecimiento, mientras que en la parte inoculada con *M.*

artiellia los cambios fueron menores (Fig. 2.27). Las plantas inoculadas sólo en una parte radical con *Foc-5* ó con *M. artiellia*, manteniéndose la otra parte sin inocular, no mostraron ningún síntoma en las raíces (datos no mostrados).

En este experimento, aunque las respuestas se estudiaron a 40 DAI, la edad real de las plantas fue superior a este periodo de tiempo, ya que al mismo debe añadirse el tiempo necesario para la separación de las raíces en las plantas que se van a inocular y el periodo apropiado para poder observar algún síntoma en el desarrollo de la enfermedad. Esto puede determinar un proteoma diferente al de los periodos más iniciales (14-18 DAI).

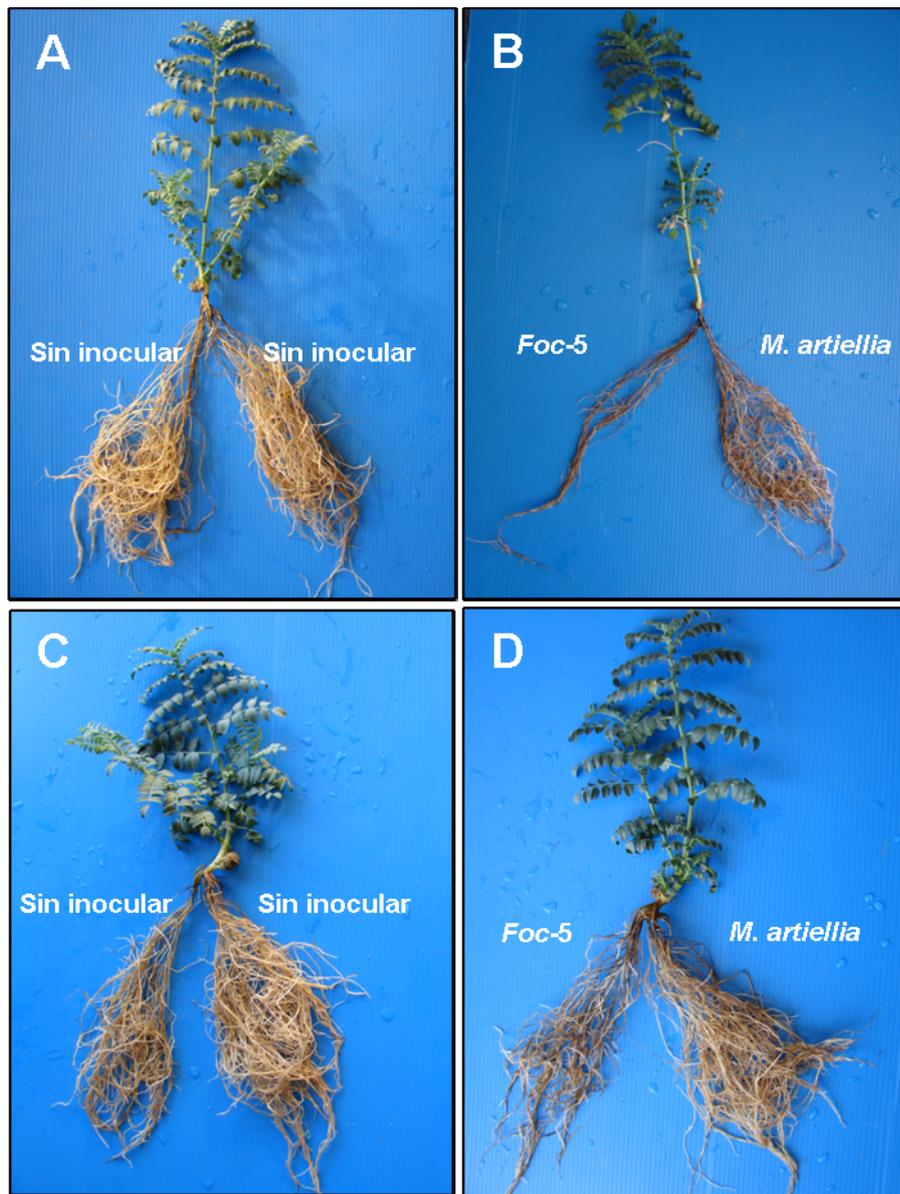


Figura 2.27.- Síntomas de necrosis y menor crecimiento en la parte de las raíces inoculadas con *Foc-5* en plantas de garbanzo línea CA336.14.3.0 (A-B) y línea ICC14216K (C-D).

Para determinar si había algún efecto en el metabolismo de la planta por causa de las inoculaciones en alguna de las partes radicales, se midieron los pesos de las mitades de las raíces de cada uno de los tratamientos. El estudio estadístico mediante el test T pareado se realizó comparando las mitades de cada grupo de plantas (datos pareados) que había recibido el mismo tratamiento (p. ej. la mitad inoculada con *Foc-5* vs la otra mitad sin inocular). Sólo resultó significativo el conjunto de plantas de garbanzo de la línea ICC14216K que había recibido la doble inoculación, siendo mayor el peso en la parte inoculada con *M. artiellia* que el de la inoculada con *Foc-5*. A resaltar que esta misma combinación de tratamientos no resultó significativa en 'CA336.14.3.0', a pesar de las diferencias aparentes que se observan en la Fig. 2.28. El resto de grupos de plantas no presentó ninguna diferencia significativa, aunque sí se puede observar en los datos obtenidos que la línea ICC14216K presenta una mayor tasa de crecimiento que la línea CA336.14.3.0 (Fig. 2.28).

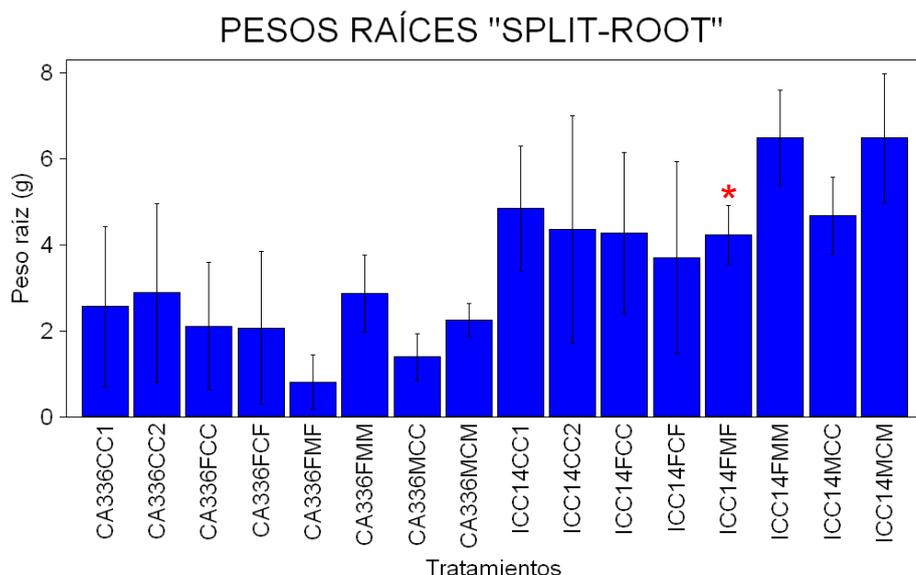


Figura 2.28.- Pesos de las mitades radicales sometidas a los diferentes tratamientos en el experimento de "split-root". Etiquetas: CA336: CA336.14.3.0, ICC14: ICC14216K; CC1 y CC2: parte radical control de plantas no-inoculadas; FCC: parte radical control de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*; FCF: parte radical inoculada con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*; FMM: parte radical inoculada con *M. artiellia* de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y *M. artiellia*; FMF: parte radical inoculada con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y *M. artiellia*; MCC: parte radical control de plantas inoculadas con *M. artiellia*; MCM: parte radical inoculada con *M. artiellia* de plantas inoculadas con *M. artiellia*. Los valores representados son la media \pm DE de cuatro plantas por tratamiento. * Tratamientos significativos al comparar las diferentes partes radicales de la misma planta.

El sub-proteoma de fluido apoplástico correspondiente a este experimento presentó un mayor número de proteínas que el de plantas de 14 y 18 DAI, revelándose unas 9 proteínas mayoritarias al utilizarse Coomassie Brilliant Blue G250 como agente de tinción. Cada repetición consistió en una planta individual, con lo cual se pudo eliminar el efecto de la variabilidad

biológica entre individuos al compararse la mitad de su raíz inoculada con *Foc-5* ó *M. artiellia* y la otra mitad sin inocular como control, así como para determinar si había alguna respuesta sistémica en periodos más dilatados de tiempo entre ambas partes de la planta en las líneas resistentes CA336.14.3.0 e ICC 14216K.

No se observó ninguna diferencia ni entre plantas inoculadas ni entre controles (plantas sin inocular en ambas partes de la raíz) con este tipo de fraccionamiento del proteoma. La técnica de “*split-root*” no produjo tampoco ningún efecto sobre este sub-proteoma, al no observarse ninguna diferencia entre las dos partes radicales en las plantas control y compararse éstas posteriormente con las plantas inoculadas.

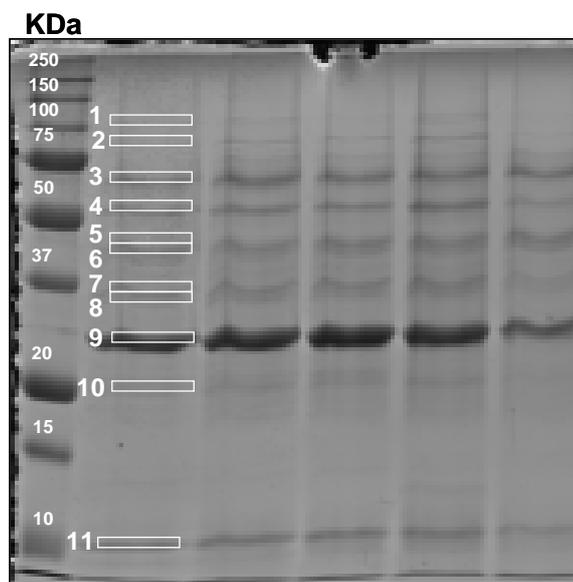


Figura 2.29.- Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas del fluido apoplástico de raíces intactas de la línea CA336.14.3.0 a los 40 DAI en el control. Se cargaron 15 µg de proteína en cada carril. Las proteínas dentro de los cuatros blancos han sido identificadas mediante MALDI-TOF/TOF.

TABLA 2.13.- Proteínas mayoritarias en el fluido extracelular en garbanzo a los 35-40 DAI (Fig. 2.29).

Nº	Proteína	Especie	MASCOT ^a	Masa molecular (observada/teórica) KDa	Secuencia de cobertura (porcentaje)
1	Aconitato hidratasa (Q9SIB9)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	127 (17)	105,7/98,72	13
2	Metionina sintasa (Q71EW8)	<i>Glycine max</i>	139 (13)	85,0/84,40	25
3	Beta-glucosidasa (Q9FSY8)	<i>Cicer arietinum</i>	145 (10)	68,0/50,78	23
4	No identificada			52,2	
5	No identificada			45,0	
6	No identificada			43,5	
7	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (P25861)	<i>Antirrhinum majus</i>	138 (11)	36,0/36,78	45
8	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (P34922)	<i>Pisum sativum</i>	150 (7)	35,0/36,76	36
9	No identificada			28,0	
10	Triosafosfato isomerasa (Q38IW8)	<i>Glycine max</i>	174 (7)	20,7/27,42	36
11	Proteína hipotética (Q9LEN3)	<i>Cicer arietinum</i>	186 (4)	10,3/10,39	58

^a "Mascot score" y entre paréntesis, los péptidos coincidentes en la identificación.

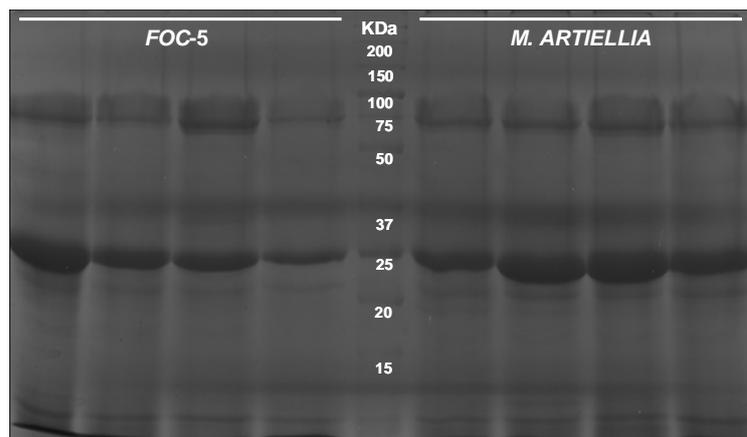


Figura 2.30.- Análisis mediante SDS-PAGE de las proteínas del fluido apoplástico en la línea ICC14216K a los 40 DAI en el experimento de "split-root". Cada carril corresponde a una parte de la planta, las plantas se ordenan correlativamente en ambos casos. Se cargaron 15 µg de proteína en cada carril.

2.5.-DISCUSIÓN

2.5.1.- DETERMINACIÓN DE LAS FASES PARASÍTICAS DE *M. ARTIELLIA* Y TEST DE

PENETRACIÓN

2.5.1.1.- Ciclo parasítico de *M. artiellia* en garbanzo

El ciclo parasítico de *M. artiellia* en garbanzo sigue las fases descritas para otros nematodos del género *Meloidogyne* en otras plantas huésped (Vovlas *et al.*, 2005). La determinación del periodo temporal de las fases de la interacción con garbanzo nos ha permitido elegir los tiempos de muestreo en coincidencia con *Foc-5*. Así, los experimentos preliminares de proteómica fueron realizados a 2, 4, 8 y 18 DAI, coincidiendo con las fases de penetración de juveniles en la raíz (2 DAI), fijación de los nematodos al sitio de alimentación (4 DAI), fase avanzada de la alimentación (8 DAI) y producción de cambios morfológicos en la hembra (en los experimentos preliminares) (18 DAI).

Como evidencia de la similitud de nuestros resultados con los de otros nematodos del género *Meloidogyne*, con *M. incognita* en tomate a 29 °C, el paso del cuarto estadio a adulto se produjo en 13-15 días posteriores a la penetración de la raíz, observándose la primera deposición de huevos tras 19-21 días después de la penetración (Triantaphyllou y Hirschmann, 1960).

2.5.1.2.- Penetración de J2s de *M. artiellia* en 'CA336.14.3.0' e 'ICC14216K' en periodos iniciales de la interacción

Aunque en estudios anteriores no se observó ninguna diferencia en la tasa de reproducción entre estas líneas al final de los experimentos, ni tampoco en las plantas coinfectadas por ambos patógenos (Castillo *et al.*, 2003; Navas *et al.*, 2008), en este trabajo se determinó si la pérdida de resistencia se relacionaba con alguna diferencia de penetración en los periodos iniciales, esto es, con una preferencia ó mayor atracción de los juveniles de *M. artiellia* por alguna de las líneas en estudio.

Los resultados obtenidos confirmaron que no existe preferencia en la penetración inicial (2 DAI) de J2s de *M. artiellia* por ninguna de las dos líneas estudiadas. Además, estos resultados nos permitieron determinar el número aproximado de penetraciones de nematodos en la raíz, para calcular las necesidades de inóculo en posteriores experimentos, y si el número de nematodos penetrado en la raíz era adecuado.

2.5.2. FASES INICIALES DE LA INTERACCIÓN (4-8 DAI)

El estudio proteómico en las fases iniciales de la interacción se realizó para determinar qué proteínas podrían estar involucradas en la respuesta defensiva temprana a *Foc-5*. Las diferencias anatómicas entre las raíces de 4 y 8 DAI se centran en que a 4 DAI, la raíz primaria ha sido perforada por la proliferación de raíces secundarias, mientras que a 8 DAI estas raíces secundarias se han desarrollado en longitud explorando nuevas zonas de suelo.

La respuesta proteómica a la infección de las líneas resistentes CA336.14.3.0 e ICC14216K a los 4 y 8 DAI resultó escasa, probablemente debido a varias causas: i) posible dilución de la respuesta, al ser la raíz un órgano cilíndrico, en el que la relación volumen/unidad de superficie de interacción es más elevado que en las hojas; ii) su carácter localizado a las partes del cilindro vascular (Wiermann, 1981, López-Meyer y Paiva, 2002); iii) su producción en otro periodo temporal al estudiado; iv) que la respuesta, en estas fases más tempranas, esté condicionada por moléculas no proteicas, ó por proteínas que se encuentren a un nivel difícil de detectar por la tecnología utilizada. Tal como se evidencia en los datos de las Tablas 2.2 y 2.4, del número de proteínas que modificaron sus niveles (13), las 8 que fueron identificadas no arrojan mucha luz sobre posibles mecanismos relevantes en relación con la resistencia a la FVG y esto debido a: i) la falta de continuidad temporal de las respuestas, ya que ninguna de las

modificaciones a 4DAI pudieron detectarse a 8DAI; ii) la falta de concordancia en las respuestas de las líneas, pese a ser ambas igualmente resistentes a *Foc-5* (si bien con diferente fondo genético); iii) la dominancia de las respuestas de represión frente a las de inducción (7 frente a 1); y iv) la ausencia de proteínas de defensa entre las que resultaron sensibles a los tratamientos. Siete de las 8 proteínas reguladas identificadas fueron de función conocida, correspondiendo ésta con el metabolismo (4), la síntesis y degradación de proteínas (2) y a la modificación de la pared celular (1). Aunque fuera de la clasificación funcional de 'estrés y respuesta defensiva', algunas de las anteriores proteínas sí pudieran desarrollar cometidos de este tipo. Tal es el caso de las posibles chalcona isomerasa (clasificación funcional: metabolismo secundario) y subunidad beta 3 del proteasoma (clasificación funcional: síntesis y degradación de proteínas); la primera, dada su posición inicial en la extensión a flavonoides/isoflavonoides de la ruta fenilpropanoide (Barz y Mackenbrock, 1994) y por haberse podido correlacionar su expresión, junto con la de chalcona sintasa, con la resistencia a hongos (Fofana *et al.*, 2002); y la segunda, debido a que el proteasoma resulta inducido en respuesta a determinados elicitores como criptogeina (Dahan *et al.*, 2001), además de haberse evidenciado el posible requerimiento del mismo para la inducción de la respuesta defensiva en pepino (Becker *et al.*, 2000). Sin embargo, ambas proteínas resultaron en nuestro caso reprimidas constituyendo una respuesta restringida sólo a 'CA336.14.3.0' y a 8 DAI. También la S-adenosilmetionina sintasa (clasificación funcional: metabolismo), con la que se identificaron dos de las proteínas reguladas, podría tener un papel relevante en la defensa dada la importancia clave de este enzima en el metabolismo monocarbonado y la relevancia que tienen las reacciones de metilación en la síntesis de flavonoides/isoflavonoides y otros metabolitos secundarios defensivos. No obstante, de nuevo la regulación de estas proteínas fue negativa y restringida sólo a 'CA336.14.3.0' y, en este caso, a 4DAI.

Las mayores diferencias encontradas a los 4 y 8 DAI fueron entre proteínas constitutivas de ambas líneas (Tablas 2.3 y 2.5). A los 4 DAI, cuatro de las siete proteínas diferenciales están funcionalmente asociadas con la defensa, presentando tres de ellas contenidos superiores en 'ICC14216K' que en 'CA336.14.3.0'. Esta mayoritaria representación de proteínas defensivas podría justificarse en base a que el proteoma de raíz parece ser especialmente abundante en este tipo de proteínas, en relación a otros tejidos de las plantas (Watson *et al.*, 2003). Por otra parte, la prevalencia de dichas proteínas en 'ICC14216K' respecto a 'CA336.14.3.0' podría indicar un mayor potencial defensivo en la primera línea, aunque no se conoce una relación específica estrecha de tales proteínas con la respuesta defensiva constitutiva a la FVG. Entre las

proteínas de defensa se podrían destacar las dos identificadas con proteínas previamente descritas en garbanzo, en concreto una proteína PR y una probable proteína inducible por ABA de garbanzo. El ABA está implicada en la respuesta defensiva contra patógenos, además de participar en la respuesta a diferentes estreses abióticos (Davies y Jones, 1991). También se puede destacar una aparente proteína R de la familia TIR-NBS-LRR, a tenor con su identificación con proteína RPS4 de *A. thaliana*, la cual confiere resistencia a bacterias patógenas que secretan el factor de avirulencia avrRps4 (Gassmann *et al.*, 1999). Esta proteína también ha sido identificada en estudios del proteoma extracelular de garbanzo, donde se detectó exclusivamente a las 192 horas de deshidratación (Bhushan *et al.*, 2007), mientras que nuestros resultados indican que se presenta constitutivamente en ambas líneas a los 4 y 8 DAI, aunque solo muestra diferencias entre líneas a los 4 DAI.

Al igual que a los 4 DAI, a 8 DAI el mayor número de diferencias se observaron entre proteínas constitutivas comunes en ambas líneas; sin embargo, en este caso, fue 'CA336.14.3.0' la que mostró contenidos superiores de una mayoría de las proteínas diferenciales (7 de las 10; Tabla 2.5). En este caso, al igual que en 4 DAI, a una mayoría de las proteínas identificadas se le pueden asignar funciones de defensa, aunque formalmente se encuadren en grupos distintos del de proteínas de stress y respuestas defensivas. Entre estas se pueden destacar por su posible implicación en mecanismos de resistencia a patógenos a tres de ellas: SSP0307, SSP3404 y SSP0012 (Tabla 2.5). SSP0307 se identificó con TGB12K, una proteína de *M. trunctatula* cuyo papel está relacionado con factores que controlan el límite del tamaño de exclusión de los plasmodesmos mediante la degradación de callosa y que, en este sentido, puede influir en el movimiento de partículas virales (Fridborg *et al.*, 2003). En nuestro patosistema, este mecanismo es de dudosa traslación ya que patógenos vasculares como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* o *Foc-5* avanzan hacia el córtex intercelularmente (Agrios, 2005; Basallote-Ureba, 1987). SSP3404 fue identificada con un dominio de tioredoxina 2 de *Medicago trunctatula*. Las tioredoxinas actúan como antioxidantes que facilitan la reducción de otras proteínas mediante reacciones de intercambio tiol-disulfuro (Ritz y Beckwith, 2001), siendo regeneradas a sus formas reducidas por la tioredoxina reductasa mediante NADPH (Li *et al.*, 2003). En algunos casos, la actividad tioredoxina también se ha relacionado con la regulación de la resistencia a enfermedades en plantas (Rivas *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2007). Por último, SSP0012, identificada con una proteína tipo citocromo P450 de *A. thaliana*, podría participar en procesos de hidroxilación conducentes a la formación de metabolitos secundarios de naturaleza defensiva.

Desde el punto de vista de las proteínas constitutivas expresadas diferencialmente en ambas líneas, es difícil cualquier intento de relacionarlas con la respuesta a patógenos en esas líneas, debiéndose tener presente que ambas líneas son resistentes a *Foc-5*. También los momentos muestreados, 4 DAI con el inicio de la salida al exterior de las raíces secundarias y 8 DAI con el crecimiento de éstas, pueden haber influenciado una mayor actividad y variabilidad biológica.

En cualquier caso, el estudio solo se refiere a una parte del proteoma de la raíz de garbanzo, la que incluye a las proteínas solubles que se encuentran a mayores concentraciones (las visibles después de la tinción de los geles con Coomassie) y están dentro del rango de pI 4-7 y 8-116 KDa de peso molecular; proteínas con otras características, que pudieran tener una mayor implicación en la respuesta defensiva, han quedado fuera del análisis.

2.5.3.- FASES MÁS AVANZADAS DE LA INTERACCIÓN (35-40 DAI)

El mayor número de manchas electroforéticas afectadas por las inoculaciones se produjo en la línea que pierde la resistencia a *Foc-5* tras la coinfección con *M. artiellia* ('CA336.14.3.0') y, precisamente, en la interacción doble con ambos patógenos, lo cual podría indicar una mayor sensibilidad para esta línea y tratamiento. La tendencia en ambas líneas fue a una mayor similitud de la respuesta a la doble inoculación con la respuesta al hongo que con la respuesta al nematodo, estando dominadas las dos primeras por regulaciones positivas de las proteínas diferenciales, mientras que en la inoculación con el nematodo, las regulaciones se distribuyeron de forma más equilibrada entre ambos signos. Esta prevalencia, en la doble inoculación, de la respuesta a *Foc-5* sobre la de *M. artiellia* podría ser debida a que la acción del nematodo, a pesar de causar posibles efectos fisiológicos sistémicos, es siempre más localizada, en torno al sitio de alimentación, que la del hongo, que además de aplicarse en cantidades altas de inóculo (30.000 clamidosporas / g de suelo) coloniza superficialmente toda la raíz y puede penetrar a través del córtex. La máxima colonización de la raíz por *Foc-5* debe producirse en la doble inoculación de la línea 'CA336.14.3.0', que muestra resistencia inestable, siendo precisamente ésta la interacción que afectó a un máximo número de proteínas (Fig. 2.21). Al haberse utilizado dos tipos de muestras bien diferenciados (muestras de raíces secundarias, en el control y la inoculación con *Foc-5*, y de nódulos, en la inoculación con *M. artiellia* y en la doble inoculación). Resulta digno de mención que la mayor similitud entre las respuestas al hongo y a la doble inoculación no puede achacarse a un sesgo introducido por la similitud de la muestras.

La agrupación jerárquica de tratamientos (Fig. 2.13) corroboró las tendencias anteriormente indicadas. Así, en el caso de las proteínas afectadas de forma común en ambas líneas (Fig. 2.13A), la agrupación observada nos indica que el componente tratamiento es más importante que el componente línea. Las diferentes inoculaciones se encuentran bien diferenciadas entre sí, sólo separándose las dos líneas dentro de cada tratamiento. A su vez, los tratamientos *Foc-5* y *Foc-5+M. artiellia* resultan agrupados entre sí, al igual que los tratamientos control y *M. artiellia*. Estas proteínas comunes podrían representar, en la mayoría de los casos, respuestas generales de las plantas a la inoculación con patógenos. Sin embargo, a nivel individual estas proteínas comunes no respondieron siempre igual a los tratamientos en ambas líneas (p. ej., la quitinasa clase I no se modificó significativamente en 'CA336.14.3.0' y se indujo, respecto al control, en todas las inoculaciones en 'ICC14216K'). Considerando separadamente el conjunto de proteínas reguladas en las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K, las agrupaciones de las distintas inoculaciones fueron en ambos casos diferentes (Fig. 2.13B-C). Así, en 'CA336.14.3.0' la respuesta a *M. artiellia* (mucho más amplia que en 'ICC14216K', al comprender un total de 15, frente a sólo 8, modificaciones) se diferenció de los restantes tratamientos y entre éstos, la inoculación con *Foc-5* (cuya respuesta en esta línea fue relativamente corta, con sólo 7 modificaciones frente a las 12 de 'ICC14216K') se diferenció más de la doble inoculación que del control (Fig. 2.13B). Por el contrario, y de forma similar a lo obtenido con las proteínas comunes de ambas líneas, 'ICC14216K' mostró un claro patrón de asociación, por un lado, de las dos inoculaciones con *Foc-5*, la individual y la conjunta con *M. artiellia*, y por otro del control y de la inoculación con *M. artiellia*. Las anteriores diferencias de agrupación de los tratamientos apuntarían a que mientras la línea CA336.14.3.0 presenta una respuesta intensa a *M. artiellia* que se diferencia del resto de las inoculaciones, en la línea ICC14216K es la respuesta a *Foc-5* la predominante, siendo menos contundente la asociada con *M. artiellia*.

La agrupación funcional de las proteínas que resultaron modificadas en su expresión de forma significativa, de acuerdo con los umbrales establecidos en el análisis de componentes principales (Fig. 2.23) o en el de comparación dos a dos (Fig. 2.24), indicó un predominio de las no identificadas, que fue especialmente acusado en el caso de 'ICC14216K'. Esta baja tasa de identificación puede deberse a la poca cantidad de proteína aplicada para la realización de los geles, lo que, a su vez, vino determinado por la dificultad de la toma de muestras. Por lo que respecta a las proteínas identificadas, en ambos genotipos la función principal modificada fue la de estrés y respuesta a patógenos, aunque otras funciones celulares resultaron también afectadas, sobre todo en el caso de 'CA336.14.3.0'.

Desde el punto de vista de la respuesta defensiva común en ambas líneas se pueden destacar las siguientes proteínas:

a) Proteína tipo R: la identificación de una posible proteína R de tipo NBS-LRR cuya función, tal como se ha descrito con cierto detenimiento en el capítulo de Introducción, podría asociarse al reconocimiento de patógenos específicos, en este caso al de *Foc-5* (la proteína resultó sobre-expresada, respecto al control, en la inoculación simple con el hongo en ambas líneas y, en 'CA336.14.3.0', también en la inoculación simultánea con ambos patógenos).

b) Ascorbato peroxidasa: este típico enzima antioxidante constituye, en plantas, el principal mecanismo de destoxificación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Nuestros resultados indican un mismo incremento de los niveles de APX (SSP4103 y SSP4201) en las plantas de las dos líneas inoculadas con ambos patógenos. Puesto que APX es un enzima degradativo de H_2O_2 , pero que, por eso mismo, también puede resultar activado en condiciones de fuerte estrés oxidativo, el incremento de su actividad en una situación dada se puede interpretar como indicadora tanto de una concentración baja como alta de H_2O_2 . En el primer caso el incremento de actividad podría relacionarse con una reacción de susceptibilidad (la acumulación de H_2O_2 , o estallido oxidativo, es una típica respuesta defensiva de las plantas), mientras que en el segundo podría serlo con una reacción de resistencia. En ciertos sistemas, una regulación negativa de la APX se ha asociado con la expresión de resistencia (El-Zahaby *et al.*, 1995; Vanacker *et al.*, 1998), interpretándose que la misma indicaba altos niveles de protección propiciada por una mayor persistencia (o acumulación) de H_2O_2 . En esta línea, estudios previos de nuestro grupo de investigación, realizados con las líneas de garbanzo JG62 y WR315, respectivamente susceptible y resistente a *Foc-5*, revelaron un incremento de APX por efecto de la inoculación, pero sólo en la reacción susceptible (JG62) (García-Limones *et al.*, 2002). Sin embargo, al estudiarse de forma específica la actividad APX apoplástica, el resultado obtenido fue el opuesto, esto es, la actividad sólo resultó incrementada en la reacción incompatible (WR315) (García-Limones *et al.*, 2009). La inducción de ascorbato peroxidasa ha sido también observada como una reacción a nematodos, como es el caso de la producida en nódulos de raíces de tomate infectadas con *M. hapla* (Moliniari y Miacola, 1997).

La respuesta defensiva diferencial entre las líneas de estudio se puede centrar, con la reserva impuesta por el elevado número no identificaciones, en los siguientes tipos de proteínas:

a) Quitinasa clase I: Este enzima está localizado en la vacuola, aunque en algún caso se ha situado también en el citoplasma (Beintema, 2007). Entre las diferentes clases de quitinasas, se ha observado que, en tabaco o garbanzo, las ácidas (clases II ó III) muestran una menor

actividad antifúngica in vitro que las básicas (clase I) (Melchers *et al.*, 1993; Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Vogelsang y Barz, 1993a). La acumulación de la actividad quitinasa en las fases iniciales de la interacción *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*-garbanzo ha sido constatada en diversos estudios (Cachinero *et al.*, 2002; Saikia *et al.*, 2005), con máximos a tiempos tempranos (2 y 3 DAI). Sin embargo, por lo que a la relación planta-nematodo se refiere, se han evidenciado repuestas bastante contradictorias dependiendo de la especie vegetal y el nematodo nodulador (Qiu *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1992). Así, se ha demostrado que la inoculación de soja con *M. incognita* provoca un aumento lento de la actividad quitinasa, alcanzando su máximo a los 34 DAI, el cual se correlacionó con el incremento de algunas isoformas ácidas (Qiu *et al.*, 1997). Sin embargo, en otros casos, como plantas de *Festuca arundinacea* Schreb. infectadas con *Meloidogyne marylandi* Jepson & Golden, 1987, la actividad quitinasa no se vió afectada en las raíces aunque sí se apreció un incremento sistémico de la misma en otras partes de la planta (Roberts *et al.*, 1992). Además, las quitinasas han mostrado un efecto nematocida in vitro, provocando la mortalidad de huevos y una eclosión prematura de los mismos in vitro (Mercer *et al.*, 1992). Sin embargo, por su localización vacuolar, se cree que las quitinasas de clase I actúan tras su vertido a la matriz extracelular (Mauch y Staehelin, 1989), aunque también se ha observado su presencia en el aparato de Golgi (Mauch y Staehelin, 1989). En el caso de la interacción *F. oxysporum* f. sp. *licopersici* y tomate, se observó que las quitinasas se distribuían asociadas a las hifas en las áreas de la pared celular vegetal donde aquéllas tenían contacto con ésta, pero no observándose incrementos de actividad del enzima en la vacuola ó el espacio intercelular, siendo más rápida esta respuesta en la línea resistente (Benhamou *et al.*, 1989).

b) **Proteínas del metabolismo secundario:** aunque en este caso circunscritas sólo a la línea CA336.14.3.0, varias identificaciones están relacionadas con la ruta isoflavonoide: chalcona isomerasa (CHI), isoflavona reductasa (IFR) y 2'-hidroxiflavona reductasa (2'HFR). Mientras que CHI es el enzima que junto con la chalcona sintasa ocupa el punto de desviación de la ruta flavonoide/isoflavonoide desde el metabolismo general fenilpropanoide, IFR y 2'HFR son isoflavonas reductasas de función similar (pudieran incluso ser isoformas de una misma actividad), consistente en la reducción de 2'-hidroxiflavonas en las respectivas flavanonas, etapa clave en la formación de las fitoalexinas pterocarpánicas de garbanzo (medicarpina y maackiaina) (Schlieper *et al.*, 1990; Barz y Mackenbrock, 1994). Estas fitoalexinas son producidas en la interacción entre garbanzo-*Foc*, en cuantía que a veces se ha correlacionado con la resistencia (Stevenson *et al.*, 1995; Cachinero *et al.*, 2002), siendo ésta una de las respuestas defensivas más típicas de la planta a patógenos en general, como se ha estudiado con especial detalle en el caso de *Ascochyta rabiei* (Weigand *et al.*, 1986), y también al

tratamiento (de cultivos celulares) con diversos elicitores (Otte *et al.*, 2001). No obstante, el posible papel defensivo que las anteriores proteínas pudieran desarrollar en nuestro caso de estudio, resulta poco claro ya que, por un lado, las regulaciones observadas fueron negativas y, por otro, se produjeron en distintas situaciones de inoculación (CHI y 2'HFR resultaron reprimidas, respecto al control, sólo en la respuesta a, respectivamente, *M. artiellia* y la doble inoculación; mientras que IFR sólo se indujo en la inoculación con *M. artiellia* respecto a la inoculación con *Foc-5*). Por ello, cabría más bien plantear la posible relación de las respuestas anteriores con la reacción de susceptibilidad al nematodo. Los nematodos noduladores secretan corismato mutasa, un enzima que, al entrar en competencia con la forma endógena de la planta, puede alterar las rutas biosintéticas de ésta, incluyendo la síntesis de compuestos defensivos (Lambert *et al.*, 1999). Corismato es un metabolito de la ruta del shikimato y, por tanto, precursor de los tres aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), por lo que la alteración de sus niveles de utilización puede modificar la relación de estos tres aminoácidos y, por ende, influir en la disponibilidad de precursores para la biosíntesis de polímeros fenólicos de la pared celular, de hormonas vegetales y de compuestos defensivos, así como de nutrientes esenciales para el nematodo (Lambert *et al.*, 1999). A pesar de esta posible disminución de los niveles de fitoalexinas localmente en las células gigantes, también se ha constatado una disminución sistémica de fitoalexinas específicas tras la inoculación de las plantas con nematodos, asociándose esta disminución a la pérdida de resistencia de las plantas a otros patógenos de suelo (Bell, 1969; Khan y Minton, 1979; Marley y Hillocks, 1994). Sin embargo, se ha sugerido que la inducción transcripcional de una IFR constituye una respuesta temprana de alfalfa a *Meloydogyne incognita*, aunque la misma se dio de forma bastante similar en un cultivar susceptible y en otro resistente al nematodo (Potenza *et al.*, 2001).

c) Otros enzimas del metabolismo de las EROs: La hipótesis (basada en la regulación antes comentada de la APX) de que cambios en el metabolismo oxidativo, o más concretamente en la acumulación de EROs, están implicados en las respuestas de garbanzo a los patógenos aquí estudiados, se ve reforzada por el hecho de que, entre las proteínas modificadas específicamente en 'CA336.14.3.0', las dos restantes del grupo funcional "estrés y respuesta defensiva" fueron una peroxidasa de clase III y una catalasa, y dos del grupo de "transporte de electrones" se identificaron como variantes de una misma quinona óxido-reductasa, enzimas todas ellas que se pueden catalogar como defensas antioxidantes. Así mismo, una funcionalidad similar podría asignarse a las dos proteínas del grupo de "transporte de electrones" modificadas específicamente en 'ICC14216K', identificadas como una proteína disulfuro-isomerasa y una NADH deshidrogenasa. De las anteriores, y refiriéndonos a las que podrían actuar más

directamente en el control del status redox intracelular, las peroxidasas de clase III de plantas son enzimas de secreción que pueden desempeñar múltiples funciones en el apoplasto relacionadas con la defensa, tales como el reforzamiento de la pared celular y lignificación, la síntesis de fitoalexinas y la producción de especies reactivas tanto de oxígeno (EROs) como de nitrógeno (Passardi *et al.*, 2005; Almagro *et al.*, 2008). Sin embargo, las catalasas son enzimas de localización típicamente peroxisomal cuya función específica es la destrucción del H₂O₂ y las quinonas óxido reductasas son enzimas que, al reducir quinonas bielectrónicamente, sin pasar por la forma radicalica de semiquinona, pueden prevenir la formación de EROs que se producen en la oxidación química de semiquinonas (Requejo y Tena, 2005). Los nematodos noduladores pueden incrementar transitoriamente la producción de EROs en tejidos de plantas (Melillo *et al.*, 2006), habiéndose constatado que inducen algunos enzimas antioxidantes como ocurre con la actividad peroxidasa (Mohamed y Abd-Elgawad, 2003). En el caso de peroxidasas, la modificación de su actividad podría tener otras consecuencias además de la modificación del estado redox, entre las que incluso podría considerarse, en base a la participación en el catabolismo de las auxinas, el control de la nodulación, como se ha comprobado en el caso de algunas interacciones de rizobios con leguminosas (Savitsky *et al.*, 1999; Mathesius, 2001b). En relación con la fusariosis vascular de garbanzo, se ha podido comprobar la inducción de la actividad catalasa, pero no así la de peroxidasa, en raíces de plantas resistentes ('WR315') y susceptibles ('JG62') al patógeno (*Foc-5*), si bien la respuesta ocurrió de forma más temprana en el primer caso (García-Limones *et al.*, 2002).

d) **Proteínas de "unión a nucleótidos"**: en este grupo se incluyen varias proteínas reguladas en ambas líneas tanto de forma cuantitativa como cualitativa, algunas de las cuales podrían relacionarse con la defensa ante microorganismos. Este podría ser el caso de las dos proteínas de este grupo que resultaron reguladas cuantitativamente en la línea ICC14216K, e identificadas como una posible proteína de cohesión de cromátidas hermanas y un posible factor de transcripción bZIP. La primera de ellas, que resultó reprimida en las plantas inoculadas con *M. artiellia*, podría relacionarse bien con una mayor activación de la expresión de genes (Dorsett *et al.*, 2005) ó bien con la conformación del genoma en las células gigantes inducidas por el nematodo. A su vez, el factor de transcripción bZIP, cuya expresión aumentó en la inoculación con *Foc-5*, podría asociarse, como se ha hecho con factores de transcripción de esta familia, con la regulación, entre otros procesos, de la defensa frente a patógenos (Jakoby *et al.*, 2002). Se ha constatado la función de factores de transcripción bZIP en la respuesta SAR (Jalali *et al.*, 2006), observándose también que algunos de ellos disminuyen la expresión de determinados genes defensivos (Pontier *et al.*, 2001). Respecto a las tres proteínas de este grupo reguladas

cuantitativamente en 'CA336.14.3.0', aunque tienen identificaciones funcionalmente menos definidas, dos de ellas aún podrían ser involucradas en respuestas de defensa; es el caso de las relacionadas con una proteína no caracterizada de *Arabidopsis* que contiene un dominio B3 enlazante de ADN y con una poliproteína gal-pol de *Solanum demissum* Lindl., respectivamente. El dominio B3 es compartido por varios factores de transcripción específicos de plantas, incluyendo los implicados en la transcripción regulada por fitohormonas como auxinas, ácido abscísico y etileno (Yamasaki *et al.*, 2004). De hecho, una de las proteínas reguladas cualitativamente en 'ICC14216K' fue identificada como un posible factor de transcripción B3 de respuesta a etileno (Tabla 2.10; SSP201). No obstante, mientras esta proteína resultó reprimida de forma completa en las inoculaciones con el nematodo (tanto la individual como la conjunta con el hongo), la otra posible proteína B3 se indujo, respecto al control, en dichas inoculaciones (Fig. 2.21A; SSP7704). Por lo que respecta a la posible poliproteína gag-pol, se ha asignado a ésta alguna relación con el ensamblaje y movimiento de partículas virales de doble cadena (Ribas y Wickner, 1998).

e) Proteína R de tipo NBS-LRR, la cual estuvo comprendida entre las proteínas de defensa modificadas de forma específica en 'CA336.14.3.0', donde resultó sobre-expresada, respecto al control, en las plantas sometidas a la doble inoculación (Fig. 2.21A; SSP9304). Aunque su papel en la respuesta defensiva es difícil de explicar en relación a nuestros datos.

Otro grupo de cierta entidad de proteínas modificadas es el de las relacionadas con el metabolismo. Resulta llamativo el hecho de que casi la mitad del total de regulaciones clasificadas dentro de este grupo funcional estén relacionadas con el metabolismo monocarbonado. Entre ellas, en la línea ICC14216K, se observa la modificación de sendas proteínas relacionadas con la reacción de transmetilación. Nos referimos, en concreto a la disminución respecto al control de una S-adenosilmetionina sintasa, en respuesta a *M. artiellia*, y al aumento de una metionina sintasa, en respuesta a la inoculación conjunta con ambos patógenos (Fig. 2.21B; SSP3603 y SSP5905, respectivamente). Las reacciones de transferencia de metilo, en las cuales la S-adenosilmetionina (SAM) participa como donador de metilo (grupo metilo activo), poseen gran importancia en la defensa en plantas, al ser etapas esenciales en la formación de precursores de la lignina y en la síntesis de metabolitos secundarios antibióticos (fitoalexinas); además, SAM actúa como un precursor biosintético de poliaminas y etileno. Por lo anterior, una disminución de la SAM sintasa, respuesta ya encontrada tras la inoculación con *Foc-5* a los 4 DAI en la línea CA336.14.3.0 (Tabla 2.2; SP5402 y SP5406), podría considerarse como un factor de susceptibilidad (y por tanto con poca implicación en la reacción de resistencia

que se desarrolla en la interacción de 'CA336.14.3.0' y *Foc-5*). Por el contrario, la disminución de este enzima en las plantas de 'ICC14216K' inoculadas con *M. artiellia* sí sería una respuesta congruente con el carácter compatible de esta interacción, donde podría asociarse con una reducción de la lignificación (Bhushan *et al.*, 2007), dada la sensibilidad de los nematodos a la lignificación de tejidos, principalmente relacionado con el transporte de nutrientes a las células gigantes (Wuyts *et al.*, 2006). La metionina sintasa, origina metionina que, además de participar en la síntesis proteica, es el precursor de la SAM, razón por la que a dicho enzima se le puede asignar un papel similarmente relevante al de la SAM sintasa en los procesos de defensa (Giovannelli *et al.*, 1985; Ravanel *et al.*, 1998). Ambas enzimas, la metionina sintasa y SAM sintasa, resultaron modificados en su expresión por situaciones de estrés hídrico en garbanzo, generalmente con una disminución de sus niveles (Bhushan *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha observado que existe una estrecha relación entre la defensa de las plantas frente a patógenos fúngicos y un incremento en la disponibilidad de grupos metilo activos, detectándose la inducción de los genes S-adenosilmetionina sintasa y S-adenosil-L-homocisteina hidrolasa por elicitores fúngicos en cultivos celulares y hojas de perejil (Kawalleck *et al.*, 1992).

La tercera proteína relacionada con el metabolismo monocarbonado, que resultó regulada en nuestro estudio, fue identificada con una glicina hidroximetiltransferasa y experimentó un incremento de concentración en 'CA336.14.3.0' en respuesta a la doble inoculación (Fig. 2.22A; SSP7603). Este enzima cataliza la conversión de serina en glicina con formación de grupos metileno activos, proceso de interés en el metabolismo de aminoácidos y biosíntesis de purinas y pirimidinas además de, en un plano defensivo, en el control de la actividad fotorrespiratoria y, por ende, en la protección del posible daño oxidativo causado por EROs generados en cloroplastos y peroxisomas (Moreno *et al.*, 2005), papel este último que pudiera ser de importancia en tejidos foliares más que en raíces.

Otro aspecto interesante del estudio, son las proteínas que presentan algún comportamiento cualitativo en alguno de los tratamientos estudiados. En este caso, como en las regulaciones cuantitativas, el número de proteínas modificadas resultó ser superior en 'CA336.14.3.0' que en 'ICC14216K'. Entre las proteínas identificadas, hay que destacar un posible retrotransposón de la subclase Ty3-gypsy el cual se expresó en ambas líneas (SSP7205 y SSP7305) al inocularse las plantas con *M. artiellia*, tanto individual como conjuntamente con el hongo. El papel de este tipo de retrotransposón, como se ha mencionado anteriormente, puede estar relacionado con situaciones de estrés para crear variabilidad genética (Capy *et al.*, 2000). Sin embargo, como pasa con muchos retrotransposones, la función de esta subclase no está

descifrada completamente, aunque en algunos de ellos se ha propuesto cierto papel, por su localización en el genoma, con la evolución de los cariotipos y la función del centrómero (Presting *et al.*, 1998). Así también, en la región pol de la proteína codificada se encuentran motivos de proteasa, transcriptasa reversa H e integrasa, estando esta estructura también en retrovirus (Chavanne *et al.*, 1998). Otra proteína interesante, desde el punto de vista de la respuesta defensiva, es la probable glicoproteína dérmica extracelular (SSP8708), la cual, en la línea ICC14216K, sólo se detectó tras la inoculación, bien en solitario o conjuntamente, con *M. artiellia*, aunque dicha proteína sí pudo apreciarse en todos los tratamientos en 'CA336.14.3.0'. La expresión de este tipo de proteína se ha descrito como una respuesta a estreses bióticos ó abióticos (Sato *et al.*, 1992; Ditt *et al.*, 2001), habiéndose evidenciado una posible actuación como inhibidor de la actividad β -1,4-endoglucanasa del hongo *Aspergillus aculeatus* Lizuka (Qin *et al.*, 2003), con aparente regulación por modificaciones postraduccionales (Shang *et al.*, 2004). Hay que resaltar, en el grupo de manchas electroforéticas con comportamiento cualitativo, la baja tasa de identificaciones, probablemente debido a la baja intensidad obtenida en los geles.

En resumen, los resultados de este apartado muestran cómo dos líneas de garbanzo expresan proteínas diferenciales en respuesta a la inoculación individual ó conjunta con *Foc-5* y *M. artiellia*. La línea CA336.14.3.0 desarrolla una mayor respuesta a nivel proteómico que la línea ICC14216K. Algunas de estas proteínas han sido modificadas en ambas líneas, indicando que la técnica es robusta de cara a estudios de interacciones planta-patógeno, aunque la respuesta en estas proteínas no se produjo siempre en el mismo sentido en ambas líneas. El mayor número de proteínas alteradas se encuentra en la inoculación con ambos patógenos, pudiendo deberse a un efecto sinérgico de la actuación de ambos patógenos en la planta, dándose el mayor número de proteínas modificadas en la interacción compatible con el hongo al estar co-infectada la planta con *M. artiellia* en la línea CA336.14.3.0. Las proteínas identificadas con mayor fiabilidad, son las identificadas en garbanzo, ó en especies de leguminosas afines. Así también la comparación diferencial de las líneas no mostró muchas diferencias significativas entre las líneas, estando relacionada con el metabolismo la única proteína diferencial identificada.

2.5.4.- FLUIDO APOPLÁSTICO

El apoplasto de las plantas, que incluye la matriz de la pared celular, es un compartimento dinámico, involucrado en una variedad de funciones durante el desarrollo normal de éstas y bajo

condiciones de estrés. Su papel principal es en la nutrición celular, ya que las células importan metabolitos del apoplasto, y en el desarrollo, mediante la determinación de la capacidad de elongación de la pared celular. También posee un papel importante en la respuesta defensiva de la planta frente a estreses de origen biótico ó abiótico como la respuesta frente a patógenos, contaminantes del aire, toxicidad por metales pesados, sequía, salinidad y temperaturas extremas (Fecht-Christoffers *et al.*, 2003; Dietz *et al.*, 1997; Covarrubias *et al.*, 1995; Brune *et al.* 1994, Schaudner *et al.*, 1992; Griffith *et al.*, 1992). El estudio del fluido xilemático en tomate ha dado muy buenos resultados en la interacción de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Rep *et al.*, 2002; 2003 y 2004). Sin embargo, la extracción de este fluido en garbanzo no fue posible, por lo que se optó por el estudio del fluido apoplástico, en el cual se encuentra parte de este fluido y el fluido intercelular.

Con anterioridad, este fluido fue estudiado, en referencia específica a la presencia de enzimas antioxidantes, en interacciones compatible (línea JG62) e incompatible (WR-315) de garbanzo con *Foc-5* a diversos periodos temporales: i) cuando las plantas no presentaban síntomas; ii) cuando aparecieron los primeros síntomas en la línea susceptible; iii) cuando todas las plantas susceptibles habían desarrollado síntomas de marchitez vascular (García-Limones, 2003; Gracia-Limones *et al.*, 2009). En nuestro caso, elegimos los tiempos de muestreo ii y iii, incluyendo la línea JG-62 para determinar estos periodos temporales y observar la respuesta en la interacción compatible.

En el citado trabajo de García-Limones no se observó contaminación citoplasmática apreciable mediante la detección de la actividad del enzima G6PDH en los extractos apoplásticos de las plantas inoculadas de ambos genotipos (JG-62 y WR-315), en relación con las plantas control, con lo que se comprobó que no se producía ruptura celular por efecto de la inoculación. En nuestro caso los niveles de contaminación citoplasmática determinados de forma similar fueron así mismo muy bajos. Sin embargo, la necesidad de concentrar los extractos apoplásticos, dado su bajo contenido de proteína, para el análisis electroforético, puede haber enriquecido la fracción de proteínas contaminantes citosólicas, principalmente en las plantas de "split-root", lo que justificaría que la mayoría de las identificaciones efectuadas se refieran a típicas proteínas citoplasmáticas, sin señal de secreción conocida, como aconitato hidratasa, metionina sintasa, dos isoformas de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y triosafosfato isomerasa. No obstante, la presencia de proteínas conocidas como intracelulares, carentes de péptido señal de secreción, en fluidos apoplásticos o extractos de preparados de pared celular suele ser habitual y abundante (pueden llegar a constituir un 50% del total de proteínas identificadas), por lo que no debe descartarse la posibilidad de que, más que contaminantes, se

trate de verdaderas proteínas extracelulares que son exportadas por un mecanismo desconocido (Jamet *et al.*, 2006). Recientemente, dos artículos han estudiado el proteoma de la matriz extracelular (paredes celulares) de hojas de garbanzo (Bhushan *et al.*, 2006) y este mismo subproteoma en condiciones de sequía, incluyendo este último a la línea JG62 (Bhushan *et al.*, 2007). Entre las identificaciones realizadas se encuentran, junto a ejemplos de proteínas típicamente extracelulares (caso de varias proteínas ricas en glicina o diversos enzimas modificadores de la pared celular) otras que, aunque no descritas como tales, pudieran desempeñar un papel a nivel de la pared celular (caso de metionina sintasa y otros enzimas relacionados con reacciones de trans-metilación que son importantes en la síntesis de precursores de ligninas; Bhushan *et al.*, 2007), y por último otras que ni se conoce que sean secretadas a la pared ni que puedan desempeñar en ella función alguna (caso de enzimas glicolíticos y de enzimas cloroplásticos o mitocondriales). Sin embargo, ambos estudios, no consideran las proteínas que puedan estar en el fluido intercelular (proteínas sin asociar ó sólo débilmente unidas a la pared celular), las cuales generalmente suelen ser más escasas y difíciles de muestrear por posibles contaminaciones intracelulares (Chivasa *et al.*, 2005). Estas últimas, pueden ser más interesantes desde el punto de vista defensivo, por la posibilidad de ser expresadas en la defensa del cilindro vascular a la penetración de hongos vasculares o posibles proteínas secretadas por éstos en las fases de colonización de la raíz.

La escasa respuesta observada en las líneas resistentes contrasta con la más amplia desplegada por el cultivar susceptible JG62, que incluye a típicas proteínas PR como quitinasas (evidenciadas tanto a 14 como a 18 DAI) y glucanasas (evidenciadas sólo a 18DAI) (Tabla 2.12).

Las quitinasas forman una familia heterogénea de proteínas, localizadas en la vacuola y en el apoplasto (Collinge *et al.*, 1993). La quitinasa identificada en este estudio es ácida de la clase III y localizada extracelularmente (Vogelsang y Barz, 1993b; Mackenbrock *et al.*, 1992). La principal función de este tipo de enzimas está relacionada con los mecanismos defensivos de las plantas a organismos que posean quitina en su pared celular, principalmente hongos (Boller, 1987; Bütcher *et al.*, 1997). Sin embargo, también se ha constatado la inducción de la expresión de genes de quitinasas durante estreses abióticos, como en el apoplasto de *Vigna unguiculata* bajo el efecto de metales pesados (Fecht-Christoffers *et al.*, 2003), por salinidad y sequía en pimiento (Hong y Hwang, 2002), y por estrés osmótico en judía (Tateishi *et al.*, 2001). En garbanzo, se han observado aumentos de esta proteína en las paredes celulares de plantas sometidas a estrés hídrico (Bhushan *et al.*, 2007) y principalmente en respuesta a estreses bióticos (Cachinero *et al.*, 2002; Saikia *et al.*, 2005), y la inducción específica de este mismo

enzima (quitinasa clase III) ha sido constatada como una respuesta de resistencia temprana (máxima expresión a 2 DAI, con caída acusada a los 8 DAI) mediante estudios de cDNA-AFLP (Nimbalkar *et al.*, 2006). En nuestro caso, la respuesta de la quitinasa, al sólo producirse en la línea susceptible, no en las resistentes, pudiera asociarse bien con el estrés hídrico de la planta producido por la enfermedad ó bien con la inducción tardía de mecanismos de defensa una vez el hongo ha penetrado en el haz vascular, ya que las quitinasas pueden también ser inducidas por heridas, etileno, auxinas y citoquininas (Graham y Sticklen, 1994).

La respuesta evidenciada a los 18 DAI en la línea JG62, de inducción de una quitinasa y dos glucan-endo-1,3-beta-glucosidasa (β -1,3-glucanasa), es concordante con los resultados de Saikia *et al.* (2005) con plantas de esta misma línea inoculadas con *Foc* raza 1, si bien los tiempos de inducción de isoformas afectadas en este estudio fueron algo diferentes. Además, nuestros resultados (de 14 y 18 DAI) son bastante coincidentes con los obtenidos en la interacción de plantas susceptibles y resistentes de tomate con *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, donde las inoculaciones aumentaron varias veces las actividades de estos enzimas, aunque siempre de forma superior en los cultivares susceptibles que en los resistentes (Ferraris *et al.*, 1987).

En resumen, la diferencia de respuesta entre líneas resistentes y susceptibles puede ser producida por la expansión en éstas de los síntomas a toda la raíz, incluyendo desde síntomas generales de sequía, que afectan a toda la planta y están motivados por la obturación de los vasos xilemáticos, como también a síntomas asociados a las células radicales, mientras que la respuesta en las líneas resistentes puede estar más localizada a los puntos de penetración del cilindro vascular por las hifas ó incluir una respuesta más temprana que no hemos conseguido observar. Además, el proteoma estudiado es sólo una parte de las posibles proteínas asociadas a la pared, de acuerdo con el tampón de extracción empleado, su composición y fuerza iónica. En nuestro caso, el tampón de extracción utilizado contiene CaCl_2 (el mismo utilizado en el estudio de García-Limones, 2003), introducido con el ánimo de extraer más eficientemente proteínas iónicamente unidas a la pared celular. No obstante, tampones con otros tipos de componentes, como NaCl , LiCl , CDTA ó manitol pueden resultar más selectivos en la extracción de ciertas clases de proteínas apoplásticas (Boudart *et al.*, 2005).

En los experimentos de "split-root", la falta de respuesta proteica puede ser debida a varios efectos: i) a la elevada edad de las raíces; ii) a que las moléculas implicadas en el efecto de la pérdida de resistencia sean de naturaleza no-proteica; y/o iii) a que los mecanismos de sistemia que puede provocar el nematodo en la raíz sean de naturaleza no-proteica y solo se transmitan en la misma raíz, y no en toda la planta. Respecto a este último punto, se puede destacar que el

hongo no penetra las células gigantes para alcanzar el cilindro vascular, como parece deducirse del resultado de estudios histopatológicos con cultivares de tomate, susceptible y resistente a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, inoculados con *M. javanica* (Fattah y Webster, 1983).

La edad del huésped también puede influenciar los síntomas de la enfermedad, así la tasa de progreso de la enfermedad en la FVG es inversamente proporcional a la edad de la planta en el momento de la infección (Chauhan, 1962). En plantas más adultas, el peso fresco aumenta y también la capacidad absoluta de síntesis, estos factores pueden ser importantes para superar los efectos nocivos y toxinas que puede provocar *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Gaumann, 1951).

El efecto de sumidero provocado por el nematodo podría afectar a la respuesta de la planta a *Foc-5*. Es importante destacar la mayor capacidad de crecimiento de la línea ICC14216K que la de la línea CA336.14.3.0, con una mayor adaptación a los efectos de *M. artiellia* o a ambos patógenos, así como un menor efecto de envejecimiento en las raíces. Hay evidencias de que la expresión constitutiva de la resistencia conduce a una disminución del crecimiento y desarrollo como consecuencia de la “competencia metabólica” dirigida hacia la síntesis de los elementos defensivos (Heil y Baldwin, 2002). Así, se observa un mayor contenido y/o actividad de enzimas en el metabolismo de carbohidratos-energético en los genotipos resistentes que en los susceptibles (Rossignol *et al.*, 2006).

2.6.- CONCLUSIONES

El estudio de la interacción garbanzo-*M. artiellia*-*Foc-5* mediante técnicas proteómicas ha proporcionado un abanico de hipótesis sobre los posibles mecanismos de pérdida/mantenimiento de la resistencia a la Fusariosis Vascular por la coinfección con *M. artiellia* en las líneas resistentes estudiadas que se pueden concretar en las siguientes conclusiones:

1. No se observa ninguna respuesta proteica en las plantas inoculadas con *M. artiellia* en los periodos iniciales de la interacción. A los 4 y 8 DAI en ambas líneas inoculadas con *Foc-5* se observa poca respuesta proteica, y las principales diferencias encontradas son constitutivas al comparar las plantas de ambas líneas de garbanzo sin inocular.

2. En fases más avanzadas de la interacción (35-40 DAI) la respuesta proteica es superior en la línea CA336.14.3.0 que en la ICC14216K. Además, en esta fase, las plantas inoculadas

con *Foc-5* y con ambos patógenos simultáneamente tienen una respuesta proteica superior a las plantas inoculadas solo con *M. artiellia* en la línea CA336.14.3.0.

3. La pérdida/mantenimiento de la resistencia en las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K por la coinfección simultánea con ambos patógenos puede estar asociada a los cambios diferenciales de la expresión de algunas proteínas relacionadas directamente con la respuesta defensiva de plantas como son: quitinasa clase I, 2'-hidroxiisoflavona reductasa, chalcona isomerasa, y catalasa. Además, las modificaciones parecen involucrar principalmente a proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR), la producción de fitoalexinas y la producción/detoxificación de EROs.

4. La expresión de la ascorbato peroxidasa está asociada a la interacción de ambos patógenos en ambas líneas.

5. Los estudios de "*split-root*" muestran que el factor producido por el nematodo que provoca la pérdida de resistencia a la FVG no tiene carácter sistémico en la planta.

CAPITULO III: ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA EN INTERACCIONES DE *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP. *CICERIS* RAZA 5 Y *MELOIDOGYNE ARTIELLIA* CON GARBANZO

3.1.- INTRODUCCIÓN

3.1.1.- ANTECEDENTES Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

En investigaciones recientes en nuestro laboratorio sobre la interacción entre *M. artiellia* y la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* utilizando cultivares con resistencia completa a la Fusariosis Vascular, los resultados indicaron que la influencia del nematodo varió según el genotipo vegetal y la densidad de inóculo del hongo. Así, la infección simultánea con los dos patógenos anuló la resistencia completa de 'CA336.14.3.0' al hongo, independientemente de la densidad de inóculo de éste y de la población del nematodo utilizado (Castillo *et al.*, 2003). Sin embargo, en 'ICC14216K' la resistencia completa se mantuvo estable independientemente de las densidades de inóculo y la población del nematodo estudiada. En consecuencia, estos datos confirman la complejidad de las interacciones entre nematodos fitoparásitos y hongos fitopatógenos, citada anteriormente en la introducción general de esta Tesis Doctoral. Los mecanismos que pueden estar implicados en las interacciones referidas, aunque todavía poco conocidos, parecen ser más de naturaleza biológica y/o bioquímica que mecánica. A pesar de que el escenario de la interacción entre los dos patógenos puede comenzar en la rizosfera, donde los exudados radicales de las plantas pueden verse alterados por la infección del nematodo, la fase más importante de esta interacción se produce tras la penetración de ambos patógenos en la planta huésped (Khan, 1993). En algunas interacciones entre nematodos y hongos fitopatógenos se ha demostrado que el parasitismo por el nematodo reduce o bloquea la síntesis de compuestos defensivos de la planta frente a la infección por el hongo; p.ej., la infección de tomate con *M. incognita* bloquea la síntesis de risitina en raíces, compuesto antifúngico presente en plantas sanas (Noguera, 1982), y la infección de pigeonpea con *M. incognita* y *M. javanica* reduce la síntesis de cajanol, fitoalexina implicada en la respuesta resistente de la planta a *Fusarium udum* (Marley y Hillocks, 1993).

Como se ha indicado en la introducción general, la expresión de genes relacionados con la patogénesis en la Fusariosis Vascular de Garbanzo ha sido estudiada recientemente mediante

“PCR semicuantitativa” (Cho y Muehlbauer, 2004) y mediante cDNA-AFLP (Nimbalkar *et al.*, 2006). En esta Tesis Doctoral se ha utilizado la técnica de “PCR a tiempo-real”, que es más sensible que la RT-PCR semi-cuantitativa, seleccionándose como objeto de estudio la ruta fenilpropanoide y extensiones implicadas en la producción de fitoalexinas y otros compuestos defensivos, así como algunos genes codificantes de proteínas cuya expresión se vió modificada en el estudio proteómico (Capítulo II). En este Capítulo se abordará el estudio de expresión génica de estos genes en diversos periodos temporales y frente a ambos patógenos (nematodo y hongo), actuando individual ó conjuntamente, con la pretensión de generar hipótesis respecto a posibles mecanismos moleculares responsables de las respuestas de pérdida/mantenimiento de resistencia en el patosistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* / *Cicer arietinum* / *Meloidogyne artiellia*.

En definitiva, el objetivo de los estudios descritos en este Capítulo III ha sido determinar los patrones de expresión de algunos genes defensivos de la planta (codificantes de enzimas involucrados en la ruta fenilpropanoide y rutas anejas, así como de proteínas que muestran expresión diferencial), en dos líneas de garbanzo ('CA336.14.3.0' y 'ICC14216K') con diferente respuesta de pérdida/ mantenimiento de la resistencia a la Fusariosis Vascular, tras la coinfección con *M. artiellia* y la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y en diferentes periodos de tiempo: fases iniciales de la interacción (2-4 DAI), y fases avanzadas (35-40 DAI), en este último caso en muestras de nódulos-raíces y en muestras microseccionadas de células gigantes y del córtex.

3.1.2.- LA PCR A TIEMPO REAL

La técnica de “PCR cuantitativa a tiempo real” (QRT-PCR) es un poderoso avance dentro de la metodología básica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”). Como su nombre indica, esta técnica permite el seguimiento de la amplificación en tiempo real conforme se produce ésta y durante la fase exponencial de la reacción, antes de que los reactivos sean limitantes. En esta fase exponencial, la cinética de reacción sigue la ecuación: $X_n = X_0 (1+E)^{n-1}$, siendo X_n la cantidad de ADN en el ciclo de amplificación n , X_0 la cantidad inicial de ADN, y E la eficiencia de la reacción (1 cuando la eficiencia es 100%). La monitorización de la reacción de PCR se consigue mediante la detección de fluorescencia, haciendo posible la cuantificación de la cantidad inicial de ácidos nucleicos de una muestra. Esta cuantificación se consigue a partir del valor del incremento de fluorescencia durante la fase exponencial de la PCR, obtenido de medidas realizadas en cada ciclo de amplificación. La fluorescencia se obtiene utilizando colorantes no específicos que se unen al ADN de doble cadena (p. ej. Sybr Green) ó pruebas fluorescentes que son específicas del ADN diana (Wittwer *et al.*, 1997).

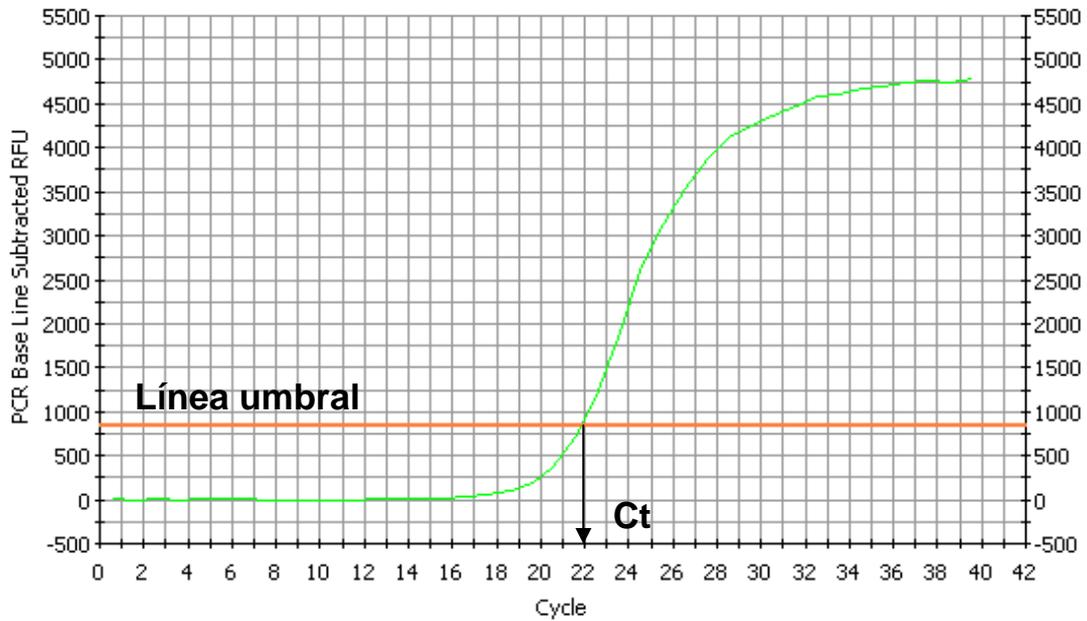


Figura 3.1.- Ejemplo de curva de PCR obtenida en ICycler (BioRad), en la cual se observa la línea umbral, línea sobre la fluorescencia inespecífica de fondo en la reacción. El contacto entre esta línea y la curva determina el Ct (threshold cycle ó ciclo umbral), el número de ciclo al cual la fluorescencia se incrementa de forma estadísticamente significativa sobre el ruido de fondo, valor que es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias iniciales.

Las cuantificaciones basadas en medidas a tiempo final son inexactas debido a que los valores pueden verse influenciados por la limitación de los reactivos, pequeñas diferencias en los componentes de la reacción o por las condiciones de los ciclos. En la PCR a tiempo real, el número de copias iniciales de ácidos nucleicos puede ser cuantificado durante la PCR, basándose en el ciclo umbral (threshold cycle, C_t), que se define como el número de ciclos al cual la fluorescencia se incrementa de forma estadísticamente significativa sobre el ruido de fondo (Fig. 3.1). Este valor de C_t es inversamente proporcional al logaritmo del número de copias iniciales. Las medidas de fluorescencia se realizan a lo largo de la fase exponencial de la amplificación, cuando la eficiencia de la PCR no se ha visto afectada por la limitación de reactivos.

La fluorescencia se puede determinar mediante diversos tipos de técnicas (Fig. 3.2):

- a) Fluoróforos intercalativos en la doble cadena de ADN (p. ej. SYBR Green).
- b) Sondas, de las que pueden haber varios tipos:
 - Basadas en la actividad exonucleasa de la *Taq*. sondas cortas ó *TaqMan*TM.
 - Sondas desplazables: *Molecular Beacons* y Sonda dual FRET.
 - Incorporadas directamente en los primers: *Amplifluor* y *Scorpions*.

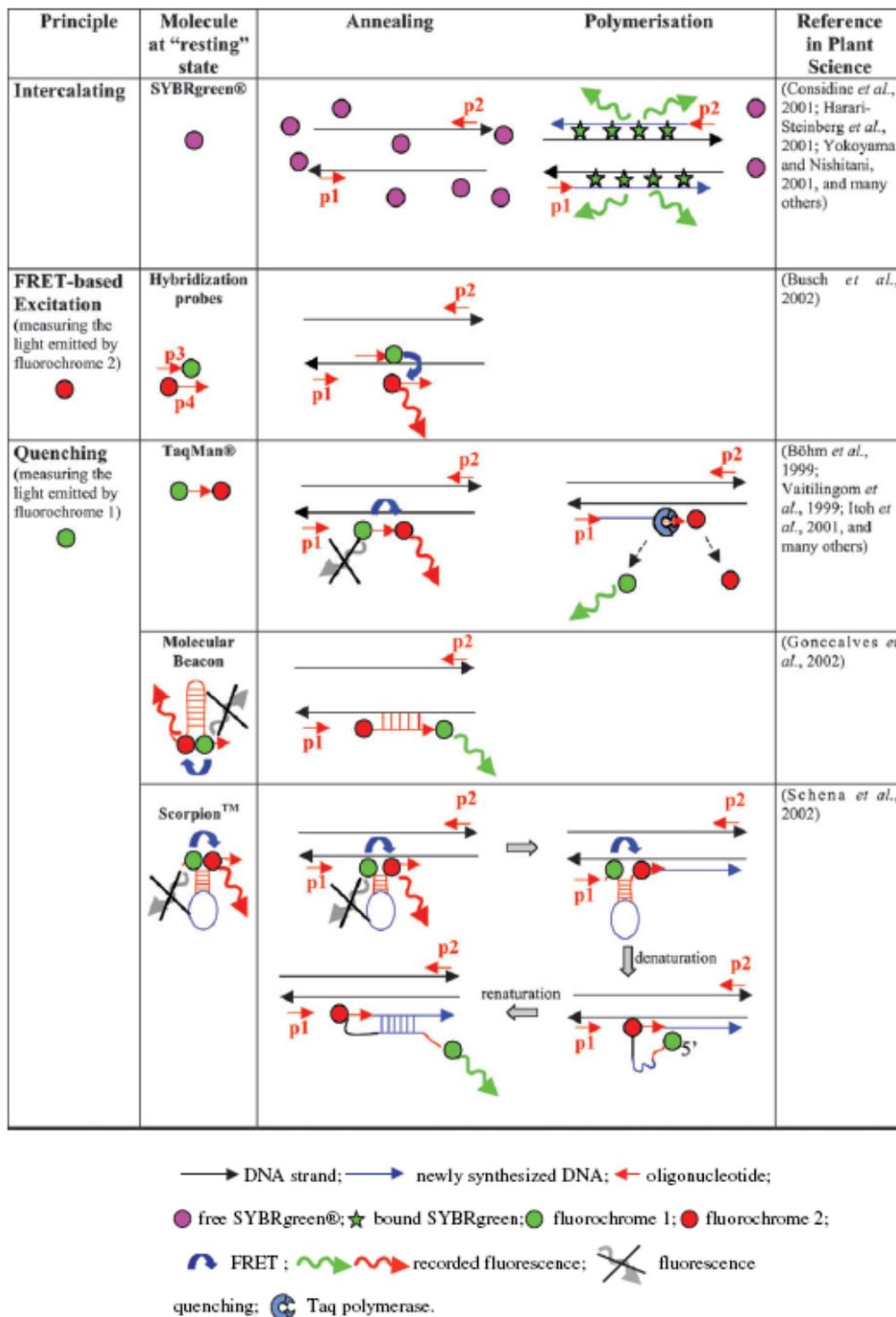


Figura 3.2.-Estrategias para la detección específica de amplicones en PCR a tiempo real. (Gachon *et al.*, 2004).

La cuantificación de ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN, puede tener utilidad desde diversos puntos de vista, como el diagnóstico rápido y fiable de agentes fitopatógenos, expresión génica, estudio de la genética de transgenes, cuantificación de transcritos específicos, etc. En todos los aspectos referidos, la tecnología de la PCR se ha utilizado con diversos tipos de aproximaciones (McCartney *et al.*, 2004): i) PCR convencional; ii) PCR anidada ("nested PCR"), con

la que se incrementa la sensibilidad y/o especificidad; iii) Inmuncaptura-PCR (IC-PCR), que aumenta la sensibilidad y especificidad y reduce el efecto de posibles inhibidores en la muestra; iv) multiplex PCR, que permite la detección de varios amplicones simultáneamente; y v) PCR competitiva (“*competitive PCR*”), en la cual, un amplicón competidor interno a la reacción es co-amplicado con el ADN objetivo. Con la aparición de la PCR a tiempo real ha aumentado la sensibilidad en la detección de patógenos, la especificidad con el uso de diversos tipos de sondas (*TaqMan*[™], *Scorpion*, etc.), ó la detección de varios patógenos simultáneamente usando diversas sondas con diferentes fluoróforos “*reporter dyes*” (Weller *et al.*, 2000). La PCR a tiempo real también puede usarse en estudios de diversidad poblacional de patógenos mediante el estudio de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) entre diferentes muestras/procedencias de patógenos (McCartney *et al.*, 2004). En algunos casos, como el de las contaminaciones de alimentos por micotoxinas, la presencia del patógeno no permite determinar la concentración de micotoxinas. En este caso se han optimizado las reacciones de PCR a tiempo real para detectar los genes involucrados en la producción de micotoxinas, principalmente en las especies de los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* (Mayer *et al.*, 2003; Schnerr *et al.*, 2001). La detección de ADN foráneo es importante desde el punto de vista de contaminaciones con trazas de otros productos en el proceso de fabricación, adulteraciones y la contaminación de ADN transgénico en diversos cultivos (Gachon *et al.*, 2004).

Otra aplicación de la PCR a tiempo real es en el estudio de la genética de los transgenes, tanto para determinar el número de copias del transgén que están insertas en el genoma (Ingham *et al.*, 2001), como para discriminar entre líneas que contienen una sola inserción (German *et al.*, 2003).

La PCR a tiempo real tiene una gran importancia en la cuantificación de transcritos específicos debido a su sensibilidad y especificidad, principalmente en plantas, donde la mayoría de los genes se encuentran en familias, permitiendo diferenciar entre genes muy parecidos en los que el análisis mediante técnicas como *northern blot* darían problemas de diferenciación (Gachon *et al.*, 2004). Otro aspecto importante de la PCR a tiempo real es la confirmación de los datos de “*microarrays*”, en los que puede haber cierta cantidad de hibridación cruzada entre cADNs representativos de miembros de las familias génicas, y dar falsas interpretaciones (Gachon *et al.*, 2004); en ciertos casos se observan medidas inferiores en las cuantificaciones con PCR a tiempo real (hasta diez veces menos) (Schenk *et al.*, 2003). Además, la sensibilidad de la técnica permite la cuantificación del silenciamiento génico (Huang *et al.*, 2006) y determinar la frecuencia de “*splicing*” alternativo (Haltermann *et al.*, 2003).

3.1.3.- LA MICRODISECCIÓN POR LÁSER

La microdissección por láser (*laser capture microdissection* o LCM) o microdissección asistida por láser (*laser assisted microdissection* o LAM), es una técnica novedosa que utiliza un rayo láser para aislar células de tejidos o partes microscópicas de éstos que sean objeto de interés con múltiples fines. Para ello, el microscopio debe incorporar un láser microscópico que proporcione una aproximación extremadamente precisa para llevar a cabo investigaciones a nivel celular y subcelular. En algunos microscopios láser, la separación de las células o tejidos diana de las células o tejidos que los rodean se lleva a cabo mediante un láser ultravioleta. A bajos aumentos el rayo láser corta selectivamente alrededor de las células de interés, dejando intacto el tejido circundante (Fig. 3.3A). Posteriormente, el sistema utiliza un único pulso láser para catapultar la muestra seleccionada desde el tejido hasta un tapón de tubo de microcentrífuga, en el que se ha dispuesto algún volumen de tampón ó agua para permitir la recolección de los tejidos fragmentados (Fig. 3.3B). En otros sistemas, los tejidos seccionados se depositan directamente en un tubo por gravedad o el tapón de tubo de centrífuga es recubierto con un film termoplástico de EVA (ethyl-vinyl-acetate). Este film se se pone en contacto con la sección y en este momento la aplicación del láser derrite parcialmente el plástico sobre la célula de interés, para obtener la sección se separa el brazo extensible del porta-objetos, que al separarse de la sección lleva consigo la región celular de interés (Nelson *et al.*, 2006). En cualquier caso, la microdissección por láser mantiene intacta la integridad del material seccionado y capturado, y proporciona un método rápido, preciso y versátil para separar grupos de células, células individuales e incluso orgánulos celulares (Ramsay *et al.*, 2006). Además, los tejidos microdisseccionados preservan su morfología y la localización *in vivo* de las macromoléculas en las células en el momento del muestreo. Estudios recientes han mostrado que el ADN, ARN y las proteínas obtenidas mediante microdissección pueden usarse para estudios de expresión génica, expresión proteínica y análisis genómico mutacional (Meyers *et al.*, 2004; Ramsay *et al.*, 2006; Klink *et al.*, 2007).

En plantas, la microdissección por láser está siendo principalmente utilizada en estudios de fisiología vegetal (Ivashikina *et al.*, 2003; Nazakono *et al.*, 2003; Kerk *et al.*, 2003; Thiel *et al.*, 2008, etc.), siendo bastante menor la utilización hecha de la técnica en trabajos sobre interacciones planta-patógeno. No obstante, la microdissección por láser se ha podido aplicar en la selección de las células de raíces de tomate con extensiones arbusculares del hongo *Glomus mosseae* (T. H. Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe para posteriores estudios de expresión génica (Balestrini *et al.*, 2007) ó en la selección de células de maíz invadidas por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils para estudios de expresión génica mediante microarrays (Tang *et al.*, 2006). En el campo de la

fitonematología se ha aplicado en diversos trabajos de aislamiento de células gigantes en plantas de tomate inducidas por *M. javanica* y el posterior estudio de expresión génica de diversos genes, en los que se demostró la capacidad de la técnica en el estudio de las interacciones planta-nematodo (Ramsay *et al.*, 2004). Posteriormente, dos artículos sobre la interacción *Heterodera glycines*-soja han usado la microdissección por láser. En el primero de ellos, se estudió la expresión génica mediante microarrays en diversos periodos temporales (Ithal *et al.*, 2007), mientras que el segundo comparó con la misma metodología la respuesta en interacción compatible e incompatible de este patosistema (Klink *et al.*, 2007).

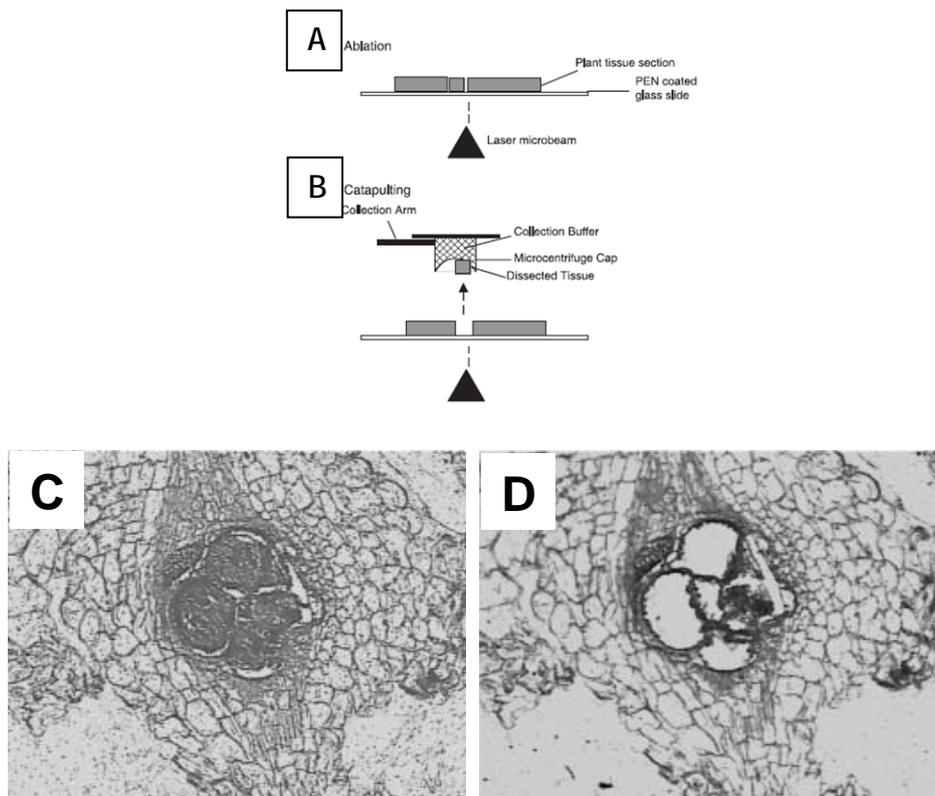


Figura 3.3.- Microdissección por láser. A, el láser microscópico corta alrededor del área seleccionada; B la potencia del láser es incrementada y enfocada dentro del tejido seleccionado, catapultándolo al tapón del tubo de microcentrifuga (Ramsay *et al.*, 2006); C, sitio de alimentación de *M. artiellia*; D, células gigantes cortadas del mismo sitio de alimentación.

3.1.4.- GENES ESTUDIADOS: RUTA FENILPROPANOIDE Y OTRAS POSIBLES DEFENSAS

El metabolismo fenilpropanoide transforma la L-fenilalanina en ácidos cinámicos y éstos en una gran diversidad de metabolitos secundarios, incluyendo ligninas, ésteres sinápicos, estilbenos y flavonoides, entre otros. Se cree que puedan existir entre 50.000 y 100.000 compuestos del

metabolismo secundario en plantas (Metcalf, 1987), y se estima que aproximadamente el 20 % del carbono fijado por la fotosíntesis pasa a la ruta fenilpropanoide (Ralston *et al.*, 2005).

Los compuestos derivados de la ruta fenilpropanoide y sus extensiones pueden tener diversas funciones en la planta como, entre otras, las de actuar de moléculas señalizadoras (ácido salicílico), como sustancias defensivas frente a patógenos (caso de las fitoalexinas isoflavonoides) o la radiación UV, como reguladores del crecimiento, o como sillares de polímeros estructurales (casos de lignina y suberina) (Dixon *et al.*, 2002). Dentro de los derivados de la ruta fenilpropanoide general, los flavonoides ocupan una posición preeminente desde muchos puntos de vista, entre los que, por ejemplo, podríamos citar la enorme diversidad estructural y funcional y su amplia distribución en el reino vegetal. Funcionalmente, los flavonoides regulan el transporte de auxinas (Jacobs y Rubery, 1988; Mathesius *et al.*, 1998) y actúan como fotorreceptores, atrayentes visuales (pigmentos florales), agentes protectores frente a la radiación UV y estimuladores de la germinación del polen (Harborne y Williams, 2000; Williams *et al.*, 2004). Los flavonoides, al igual que otros derivados fenólicos (caso de estilbenos), poseen un fuerte poder antioxidante y ejercen cierta protección contra el daño causado por los radicales libres (Biondi *et al.*, 2003, Yu *et al.*, 2005). También, en común con otros compuestos fenólicos, suelen acumularse en formas conjugadas, en este caso concreto como glicósidos. Los glicósidos flavonoides son más solubles en agua y menos reactivos que los respectivos aglicones, constituyendo así formas idóneas de transporte por la planta y de almacenamiento en las vacuolas (Ververidis *et al.*, 2007). Actualmente se ha observado el transporte de flavonoides a largas distancias en *Arabidopsis thaliana* (Buer *et al.*, 2007). Asimismo, también se ha mostrado que ciertas células de tejidos vegetales presentan una mayor acumulación de compuestos fenólicos en sus vacuolas, desde donde pueden ser liberados en determinadas condiciones medioambientales, tras sufrir heridas ó infección por patógenos (Beckman y Halmos, 1962; Beckman, 2000). La liberación, desde formas conjugadas almacenadas en vacuolas, de aglicones fenólicos antimicrobianos constituye un mecanismo de respuesta temprana a patógenos que, posteriormente, suele implementarse con la síntesis *de novo* de estos aglicones tras inducción, mediada por regulación transcripcional de enzimas clave, de toda la ruta biosintética que los produce (papel doble, como fitoanticipinas y fitoalexinas). También, aparentemente, la acumulación de derivados fenólicos (como por ejemplo de fitoalexinas isoflavonoides) por hidrólisis de formas conjugadas o por inducción de sus rutas de biosíntesis constituyen mecanismos de respuesta diferencial frente a distintos estímulos, como por ejemplo la producción de heridas o el ataque de patógenos (Naoumkina *et al.*, 2007; Farag *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista de la defensa de las plantas, son un subgrupo de flavonoides, los isoflavonoides, los que ocupan una posición más relevante, al englobar a una de las más

importantes clases de fitoalexinas (las fitoalexinas isoflavonoides pterocarpánicas). A esta clase pertenecen medicarpina y maackiaina, las dos principales fitoalexinas de garbanzo (Kessmann y Barz, 1987). A diferencia de los flavonoides, la distribución de isoflavonoides es bastante restringida, quedando en su mayor parte limitada a la subfamilia *Papilioninae* dentro de la familia *Leguminosae*. Al igual que ocurre con los flavonoides, la variación estructural de los isoflavonoides es elevada, viniendo determinada por el número y complejidad de los sustituyentes de la estructura 3-fenilcromano, los diferentes grados de oxidación del heterociclo de pirano, y la formación de anillos heterocíclicos adicionales (Dixon *et al.*, 2002). Se ha demostrado que las papilionáceas acumulan isoflavonoides, principalmente pterocarpanos e isoflavonas, en los tejidos inoculados con hongos u otros microorganismos (Ingham, 1982, Dewick, 1994).

Las fitoalexinas se definen como compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que son sintetizados y acumulados después de la exposición de la planta a microorganismos (Paxton, 1981) o condiciones relacionadas (como, por ejemplo, el tratamiento con sustancias llamadas elicitores; Ebel, 1986) y cuya producción depende del tipo de agente inductor y del órgano de la planta (Grisebach y Ebel, 1978). Su forma de actuación es mediante la disrupción de membranas (Smith, 1982), aunque también se han sugerido mecanismos de acción específicos (Boydston *et al.*, 1983; Kaplan *et al.*, 1980), y su actividad antifúngica está muy relacionada con la estructura molecular (Ververidis *et al.*, 2007). Como se ha indicado, una de las clases de fitoalexinas más estudiadas ha sido las de estructura pterocarpánica que son producidas por papilionáceas. Dentro de diversas especies de leguminosas de esta familia, se ha evidenciado que la ruta fenilpropanoide tiene un papel crucial en la respuesta defensiva a diversos patógenos, como bacterias (Zabala *et al.*, 2006), hongos (Saunders y O'Neill, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004), nematodos (Baldrige *et al.*, 1998; Soriano *et al.*, 2004; Kathiresan y Mehta, 2005) y virus (Bellés *et al.*, 2008).

La ruta fenilpropanoide está organizada integrando algunas de sus reacciones en "canales metabólicos", que permiten la transferencia directa de metabolitos intermediarios entre enzimas de acción consecutiva, mejorando la eficiencia de las reacciones que catalizan (Dixon *et al.*, 1986; Dixon *et al.*, 2002). La canalización de metabolitos parece producirse, por ejemplo, entre los enzimas fenilalanina amoniaco liasa (PAL) y ácido cinámico 4-hidroxilasa (C4H), al inicio de la ruta fenilpropanoide (Czichi y Kindl, 1975; Hrazdina y Jensen, 1992; Hrazdina y Wagner, 1985; Rasmussen y Dixon, 1999), y entre isoflavona sintasa (IFS) e isoflavona O-metiltransferasa (IOMT), al inicio de la ruta de las fitoalexinas isoflavonoides (Liu y Dixon, 2001). Los enzimas de tipo citocromo P450 asociados a membrana (C4H e IFS) actúan como anclaje de todo el complejo enzimático al retículo endoplasmático (Dixon *et al.*, 2002). Una gran parte de los enzimas implicados en la ruta isoflavonoide se encuentran en el citoplasma, pero tres enzimas, las ya mencionadas C4H

e IFS más la isoflavona 2'-hidroxilasa (I2'H), son proteínas P450 que han sido asociadas a membranas del retículo endoplasmático (López-Meyer y Paiva, 2002). Una organización similar, con enzimas anclados a membrana y enzimas solubles asociados a los anteriores, se ha propuesto también para las distintas rutas de biosíntesis o extensiones dentro del metabolismo fenilpropanoide general.

La ruta fenilpropanoide puede verse activada en respuesta a estreses bióticos ó abióticos. Los azúcares solubles estimulan el metabolismo fenilpropanoide y contribuyen a un aumento en la concentración de isoflavonoides como respuesta defensiva a *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *lupini* W.C. Snyder & H.N. Hansen (Morkunas *et al.*, 2005), aunque la activación de la ruta puede actuar como un fuerte sumidero de azúcares (Aksamit-Stachurska *et al.*, 2008). Ciertos compuestos intermediarios de la ruta como el ácido cinámico pueden actuar sobre la actividad de otros enzimas de la ruta.

La expresión génica está controlada por factores de transcripción del tipo Myb y Myc (Ververidis *et al.*, 2007b), aunque también se ha observado la asociación de la proteína KAP-2 a la secuencia conservada H-Box en el promotor del gen chalcona sintasa (CHS) (Lindsay *et al.*, 2002). Las modificaciones post-traduccionales pueden ser muy importantes en la actividad de los enzimas, como la fosforilación por una quinasa específica dependiente de calcio de la proteína PAL (Cheng *et al.*, 2001).

En garbanzo, la infección por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* provoca un mayor incremento del contenido de las fitoalexinas medicarpina y maackiaina en los exudados de los genotipos resistentes en comparación con los susceptibles, pudiendo contribuir esta característica parcialmente a la resistencia (Stevenson, 1995, Armero *et al.*, 2001). Se han observado concentraciones significativamente más elevadas de estas fitoalexinas de tipo isoflavonoide tanto en plantas resistentes pre- ó post- inoculadas (Stevenson, 1997). La producción y excreción de estas fitoalexinas por garbanzo en respuesta a aislados de *F. oxysporum* no-patogénicos y razas incompatibles de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, puede ser uno de los mecanismos por los que estos microorganismos actúan como inductores de resistencia frente a la FVG (Cachinero *et al.*, 2002). La expresión de diversos genes de la ruta fenilpropanoide ha sido estudiada en la interacción con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de garbanzo pre-inoculado con aislados de *Rhizobium*, concluyéndose una activación de la expresión génica de PAL, CHS e IFR que se correlacionaba positivamente con el grado de tolerancia a la FVG de la línea de garbanzo y con el pre-tratamiento con *Rhizobium* (Arfaoui *et al.*, 2007). En otro estudio, mediante RT-PCR semi-cuantitativa, de la interacción de garbanzo con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (raza 1), se observó una sobre-expresión génica de PAL, junto con la de otros genes relacionados con la defensa como ascorbato peroxidasa y glutatión

reductasa, si bien se produjo en igual cuantía independientemente del carácter susceptible (JG62) ó resistente (WR-315) de la línea ensayada de garbanzo (Cho y Muehlbauer, 2004). En un estudio sobre transcriptos génicos diferencialmente expresados en raíces, tras la infección con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (raza 1) de líneas resistentes y susceptibles a la FVG, Nimbalkar *et al.* (2006) pudieron identificar, mediante aproximaciones de cDNA-RAPD y cDNA-AFLP, un total de, respectivamente, uno y 16 genes sobre-expresados (bien cualitativa ó cuantitativamente) en la interacción resistente respecto a la susceptible, si bien ninguno de ellos correspondió a enzimas de la ruta fenilpropanoide. Finalmente, Cho *et al.* (2005), en un estudio en el que pudo relacionarse la expresión constitutiva del gen de la Flavanona 3-hidroxilasa (*F3H*) (un enzima no de la ruta isoflavonoide, sino de la flavonoide) con la resistencia de garbanzo a la rabia causada por los patotipos I y II de *Aschochyta rabiei*, aportaron alguna evidencia de que, a diferencia del comportamiento anterior, en la respuesta de resistencia de garbanzo a *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (raza 1) sí podría estar implicada la inducción de *F3H*. En conjunto, con los datos anteriores la conclusión podría ser que se necesita mayor información de la actualmente disponible para poder establecer el papel que en la resistencia a la FVG desempeña la acumulación de fitoalexinas, y si ésta se produce bien por movilización desde formas conjugadas o por activación de su ruta biosintética, como resultado de una mayor expresión de genes de la ruta fenilpropanoide (como *PAL*, *IFR* o *F3H*). Frente a la escasez de resultados referidos a la FVG, estudios realizados principalmente durante la década de 1990 por el grupo de Barz demostraron claramente el carácter inducible de actividades enzimáticas clave de la ruta isoflavonoide de biosíntesis de fitoalexinas en garbanzo, en situaciones relacionables con la defensa a patógenos en general y, particularmente, a *A. rabiei* (tratamiento de suspensiones celulares de garbanzo con elicitores procedentes de levadura y de *A. rabiei*), y que dicha inducción iba emparejada con una mayor expresión génica y un incremento de la síntesis de proteínas, respuestas todas ellas que se inducían más potentemente en una línea de garbanzo resistente a la rabia que en una línea susceptible (Daniel *et al.*, 1990; Daniel y Barz, 1990).

Los fenólicos constitutivos e inducibles presentes en plantas y suspensiones celulares de garbanzo son mayoritariamente isoflavonoides pertenecientes a las siguientes clases: a) 5-hidroxiisoflavonas (p. ej. genisteina y biocanina A); b) 5-desoxiisoflavonas (como daidzeina y formononetina); c) 2'-metoxi-5-hidroxiisoflavonas (como homoferreirina y cicerina); y d) pterocarpanos (como medicarpina y maackiaina). De los anteriores compuestos (Fig. 3.4), los predominantes son las isoflavonas biocanina A y formononetina entre los constitutivos y los pterocarpanos medicarpina y maackiaina entre los inducibles (Keßman y Barz, 1987; Weidemann *et al.*, 1991; Barz y Welle, 1992). Todos estos compuestos suelen presentarse mayoritariamente como

O-guclósido-6'-O-malonato conjugados (Mackenbrock *et al.*, 1992), que se piensa constituyen las formas en que son almacenados en vacuolas (Mackenbrock *et al.*, 1992, López-Meyer y Paiva, 2002). En la Fig. 3.5 se representan las posibles rutas de formación de los anteriores derivados tal como fueron propuestas para garbanzo (Barz y Welle, 1992); algunas de las etapas pueden ser más complejas de lo representado, a la vista de los conocimientos sobre la ruta isoflavonoide obtenidos más recientemente con otras especies vegetales.

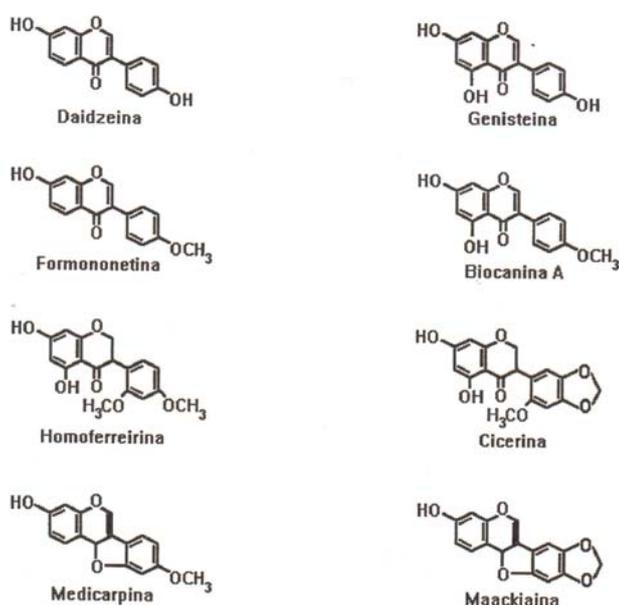


Figura 3.4. Diferentes clases de isoflavonoides aislados de cultivos celulares y plantas de garbanzo. Isoflavonas: Daidzeina, Genisteina, Fomononetina y Biocanina A; Isoflavanonas: Homoferreirina y Cicerina; Pterocarpanos: Medicarpina y Maackiaina.

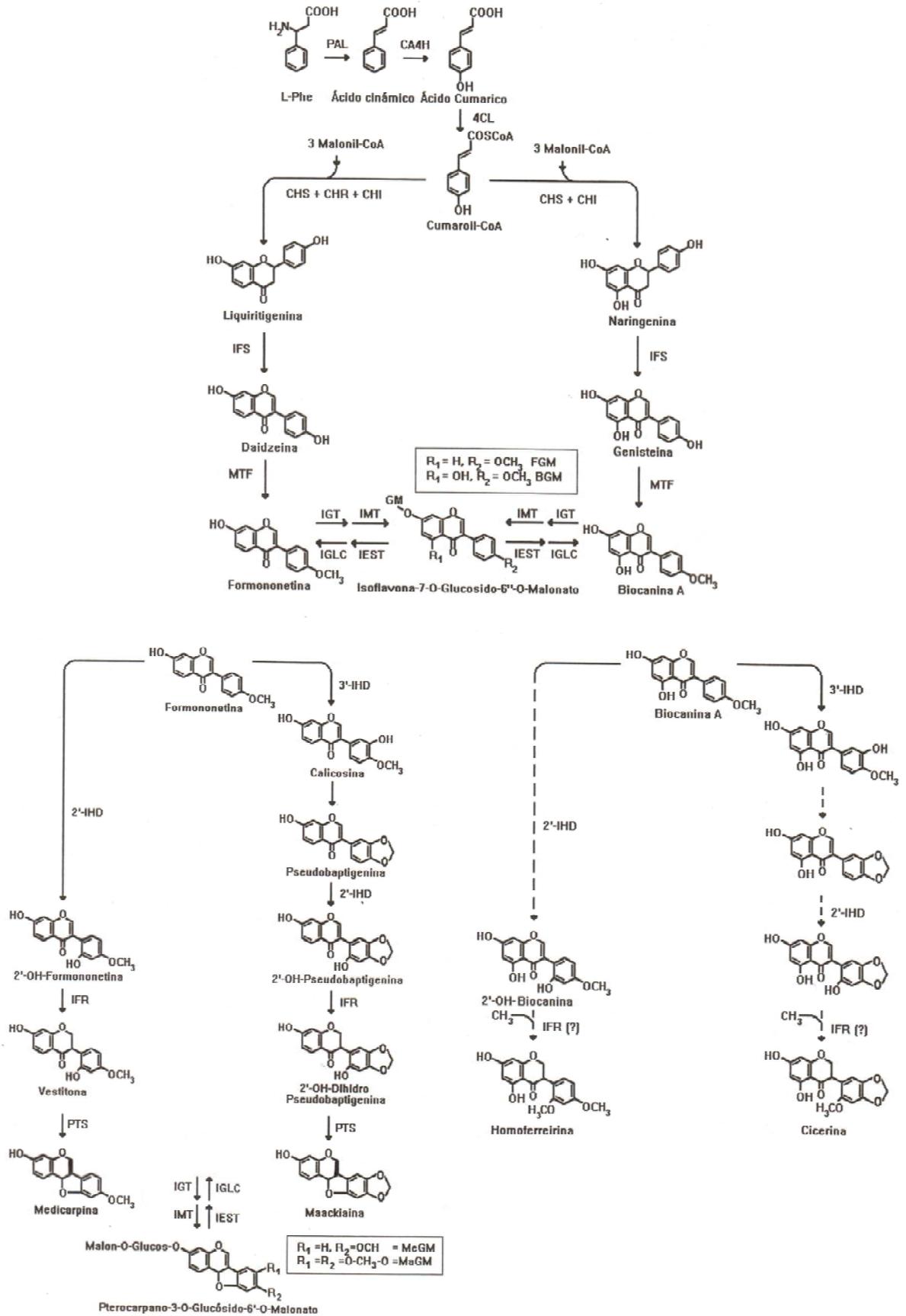


Figura 3.5.- Posibles rutas de formación de compuestos isoflavonoides propuestos por Barz y Welle (1992)

Entre las funciones modificadas en el parasitismo por los nematodos noduladores parece tener un papel importante la secreción por parte del nematodo de corismato mutasa, enzima que cataliza la conversión de corismato a prefenato. Corismato es un metabolito precursor de los tres aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), y los cambios en la relación de estos tres aminoácidos pueden inducir cambios en los precursores de la pared celular, la biosíntesis de hormonas vegetales y la síntesis de compuestos defensivos, así como en un incremento de la disponibilidad de alimento para el nematodo (Lambert *et al.*, 1999), como ya se indicó en la introducción. Esta respuesta localizada en los sitios de alimentación se correlaciona con una disminución moderada del transporte de aminoácidos totales a través de las plantas. Sin embargo, los aminoácidos fenilalanina y tirosina aumentan ligeramente su proporción en la savia bruta (Wang y Bergeson, 1974). La secreción de este enzima podría tener un papel esencial en la formación de las células gigantes al manipular un gran número de rutas bioquímicas en la célula. La acumulación intracelular de flavonoides ha sido observada en la formación de nódulos en las raíces (no en las células gigantes) de *Trifolium repens* L., especulándose como una posible razón de la acumulación de auxinas en el nódulo por la perturbación de su transporte en sentido basípeto hacia el ápice radical (Hutangara *et al.*, 1999). Un efecto similar ocurre en la formación del nódulo en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas (Eckardt, 2006). Otros enzimas en etapas iniciales de la ruta fenilpropanoide son reprimidos en su expresión por el parasitismo de nematodos, como ocurre con el enzima PAL según se ha concluido mediante el estudio de promotores en *Arabidopsis thaliana* y tabaco (Goddjiin *et al.*, 1993) ó mediante estudios de expresión génica en soja (Edens *et al.*, 1985). El gen de la isoflavona reductasa se sobre-expresó en cultivares de alfalfa susceptibles a *M. incognita* a las 72 horas de la inoculación con el nematodo (Potenza *et al.*, 2001). La alteración (aumento) del metabolismo fenilpropanoide en tabaco, mediante la sobre-expresión del factor de transcripción MYB, estimuló significativamente la reproducción de *M. incognita*, mientras que la sobre-expresión de PAL no produjo ningún efecto (Wuyts *et al.*, 2006). En mutantes TRANSPARENT TESTA de *A. thaliana*, con deficiencias en la ruta flavonoide, no se produjo ningún efecto en la reproducción de *M. incognita* (Wuyts *et al.*, 2006). Otros compuestos, relacionados con la formación de lignina, juegan también un papel importante en la transferencia de nutrientes a los sitios de alimentación, observándose una influencia en la reproducción. Así, en experimentos con *Arabidopsis*, elevados niveles de lignina siringílica provocaron disminuciones en la reproducción de *M. incognita*, mientras que bajos niveles de esta lignina en tabaco produjeron el efecto contrario (Wuyts *et al.*, 2006).

Desde un punto de vista más global, el efecto de la infección del nematodo puede inducir una disminución de las fitoalexinas en la planta. La inoculación conjunta de guandú o frijol de palo

[*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] con nematodos noduladores (*M. incognita* y *M. javanica*) y *Fusarium udum* Butler provocó una reducción del contenido de la fitoalexina cajanol, rompiendo la resistencia de esta leguminosa a la Fusariosis Vascular provocada por el hongo (Marley y Hillocks, 1994). Además se demostró que la disminución de los niveles de cajanol es una respuesta sistémica a la infección por el nematodo (Marley y Hillocks, 1994). Otras investigaciones han mostrado resultados similares en otros cultivos, como algodón (Bell, 1969) y alfalfa (Khan y Minton, 1979) con especies patógenas del género *Verticillium*. En otras especies de nematodos, como el nematodo del falso nudo o *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944, actuando solo ó conjuntamente con *Phytophthora capsici* Leonian, se mostró una reducción de la actividad PAL en plantas de pimiento, mientras que se observaba un aumento de actividad de este enzima en la inoculación solo con el hongo (Godinez-Vidal *et al.*, 2007).

Probablemente los mayores beneficios de la alteración biosintética creada por la inyección de corismato mutasa en el citoplasma de las células vegetales sea una mejora en la alimentación de las hembras del nematodo y una disminución localizada de compuestos defensivos, mientras que los cambios en el metabolismo global de la raíz estén más encaminados hacia una interacción clásica planta-patógeno ó alteraciones globales del metabolismo.

3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1.- INÓCULO UTILIZADO

3.2.1.1.- *Meloidogyne artiellia*

La población de *M. artiellia* usada en este capítulo fue obtenida de raíces infectadas de plantas de garbanzo, procedentes de campos comerciales situados en Castel del Monte (provincia de Bari, sur de Italia). Para ello, una masa de huevos de *M. artiellia*, seleccionada de un único nódulo conteniendo únicamente una hembra de nematodo, fue desinfectada con 1% NaOCl durante 4 minutos y se eliminó la solución desinfectante con 4 lavados en agua destilada estéril. La masa de huevos desinfectada se depositó alrededor del sistema radical de plantas de garbanzo (cv. UC27) de 2-3 semanas de edad y cultivadas en una mezcla de suelo (arena/limo, 2:1, vol/vol) esterilizado. Las plantas se cultivaron durante 3 a 4 meses a 21 ± 1 °C con un fotoperiodo de 14 horas de luz fluorescente a 360 ± 25 $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Para los experimentos, el inóculo de nematodos se incrementó extrayendo los huevos por el procedimiento NaOCl (Hussey y Baker, 1973), y reinoculando sucesivamente en nuevas plantas hasta alcanzar el nivel de inóculo deseado. Para la extracción, las raíces infectadas se lavaron con agua, se cortaron en segmentos de 1-2 cm de longitud, y se

agitaron durante 3 minutos en una solución 1% NaOCl. Posteriormente, la suspensión se filtró por tamices de 75 μm y 5 μm de apertura consecutivamente, y los huevos retenidos en el tamiz de 5 μm se lavaron varias veces para eliminar cualquier resto de NaOCl y se resuspendieron en agua destilada estéril. Para evaluar la densidad del inóculo de *M. artiellia* aplicado en cada uno de los experimentos, se determinó la población de huevos de la suspensión basal obtenida mediante dilución (1:100) a partir de alícuotas de 1 ml (repetidas 10 veces de forma independiente). Para inocular las plantas con *M. artiellia*, se añadió alrededor de la radícula de una semilla germinada, una suspensión de 4 ml de volumen conteniendo huevos o J2 de *M. artiellia* se aplicó en el momento de la siembra. Las plantas control se trataron de igual forma que las inoculadas, pero con agua destilada estéril sin inóculo del nematodo.

En el caso de los experimentos realizados sólo con juveniles de segunda edad (J2), las masas de huevos adheridas a las hembras fueron aisladas individualmente mediante pinzas y depositadas en tamices de 2 cm de diámetro y un diámetro de poro de 90 μm , que retiene las masas de huevos pero permite el paso de los J2s recién eclosionados. Los tamices se cubrieron con agua estéril hasta el nivel de las masas de huevos, manteniéndose en oscuridad y a una temperatura constante de 21 ± 1 °C. Cada tres días, se retiraron los nematodos, se contaron los individuos viables y se ajustó su concentración para su posterior inoculación en plantas

3.2.1.2.- *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*

En todos los experimentos realizados se ha utilizado el aislado Foc-8012 perteneciente a la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (*Foc 5*) (Jiménez-Díaz *et al.*, 1989b). Este aislado, obtenido de plantas de garbanzo infectadas del sur de España, ocasiona Marchitez Vascular en los cultivares susceptibles (Trapero-Casas y Jiménez-Díaz, 1985). Foc-8012 forma parte de la micoteca del Departamento de Protección de Cultivos, Instituto de Agricultura Sostenible, CSIC, Córdoba, España.

El cultivo activo de Foc-8012 se obtuvo de pequeñas alícuotas de suelo infestado, colocadas sobre agar patata dextrosa (APD) (20 g de agar, 250 g de patata, 20 g D-glucosa por litro de agua desionizada) en placas petri, que se incubaron a 25° C y un fotoperiodo de 12 h/día de luz fluorescente y cercana al ultravioleta (NUV) de 54 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante 7 días. Como inóculo, se utilizaron clamidosporas obtenidas en un sustrato colonizado por *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, que consistió en una mezcla de arena, harina de maíz y agua destilada (AMA) en proporción 9:2:1 en peso (Nene y Haware, 1980; Trapero Casas, 1983). La arena seca y tamizada se mezcló con la harina de maíz y el agua, y la mezcla se distribuyó en matraces Erlenmeyer de 1.000 ml (400 g /

matraz) y se esterilizó en autoclave (121°C, 75 min, dos veces en días consecutivos). Al sustrato esterilizado se añadieron 18 discos de agar de 5 mm de diámetro, tomados de un cultivo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* de 7 días de crecimiento en APD en las condiciones anteriores.

Los matraces se incubaron a 25°C y un fotoperiodo de 12h día⁻¹ de luz blanca y NUV de 36 µEm⁻²s⁻¹. Cada 2-3 días, los matraces se agitaron con el fin de distribuir el inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* y favorecer la colonización homogénea de la mezcla por éste. A los 15 días de incubación, el sustrato colonizado por el hongo se mezcló con suelo esterilizado en proporción 1:12 en peso. El suelo utilizado fue una mezcla de arena y limo (1:1 en peso) esterilizada en autoclave (21°C, 75 min, dos veces en días consecutivos). La mezcla resultante se distribuyó en matraces Erlenmeyer de 1.000 ml (400 g / matraz) y se incubó a 25°C en oscuridad durante 6 semanas, en el curso de las cuales los matraces se agitaron periódicamente para facilitar la colonización homogénea del sustrato por el hongo. Tras el periodo de incubación, el sustrato infestado se sometió a secado en estufa de calor seco a 30°C durante 3-4 días, tras los cuales se almacenó a 4°C hasta su utilización. La existencia de clamidosporas en el sustrato se comprobó mediante observaciones microscópicas.

Las determinaciones de concentración de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 para la infestación del suelo se realizaron por el método de dilución en placa. Para ello, de cada una de las mezclas de suelo infestado utilizadas en los experimentos se muestrearon al azar pequeñas cantidades, y dichas muestras se mezclaron para componer una mezcla única de un peso aproximado de 50 g en cada experimento. De dicha mezcla se utilizaron tres submuestras de 1 g, cada una de las cuales se incorporó a matraces Erlenmeyer con 100 ml de agar-agua estéril al 0,1%. La suspensión se homogeneizó en un agitador magnético durante 5 min y alícuotas de 1 ml de la suspensión se distribuyeron en placas petri con medio VOPA (200 ml jugo V8; 3 g CO₃Ca; 5 g D-glucosa; 2 g extracto de levadura; 5 g oxgall; 20 g agar; 800 ml agua desionizada; 100 mg aureomicina; 300 mg sulfato de estreptomicina; 500 mg pentacloro-nitrobenzeno) y las placas (tres por muestra de suelo) se incubaron en una cámara a 25°C en oscuridad. Tras 4-5 días, se identificaron y contabilizaron las colonias de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* para determinar el número de propágulos (ufc) por gramo de suelo. En cada uno de los experimentos, la densidad de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* en el suelo se determinó inmediatamente después de la incorporación del patógeno al mismo.

3.2.2.- MATERIAL VEGETAL

Para los experimentos realizados en este capítulo, se utilizaron dos líneas de garbanzo, CA 336.14.3.0 y ICC 14216K, que fueron seleccionadas por su reacción diferencial a *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 y su interacción con el nematodo *M. artiellia*, aún siendo ambas susceptibles al nematodo (Castillo *et al.*, 2003; Navas Cortés *et al.*, 2008). La línea CA 336.14.3.0, que es resistente a la raza 5 de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* tanto a bajas como elevadas densidades de inóculo del hongo (3.000 y 30.000 clamidosporas/g suelo, respectivamente), muestra resistencia inestable cuando se infecta simultáneamente con *M. artiellia* y el hongo en ambas densidades inoculo. Sin embargo, la línea de garbanzo ICC 14216K muestra resistencia a la raza 5, a ambas densidades de inóculo, independientemente de la coinfección o no con *M. artiellia* (Castillo *et al.*, 2003). La línea ICC14216K proviene de programas de mejora del ICRISAT (International Crops Research Institute for Semiarid Tropics, Hyderabad, India), mientras que la línea CA336.14.3.0 proviene de líneas avanzadas (F₆ - F₇) obtenidas en programas de mejora de resistencia a la FVG (en los que se usó la línea “desi” 81001 como fuente de resistencia), desarrollados por el grupo de Sanidad Vegetal (AGR-136), el Departamento de Agronomía y Mejora del CIDA-Córdoba, la Junta de Andalucía y Koipesol Semillas, S.A., siendo además resistente a un aislado altamente virulento de *D. rabiei* (Navas-Cortés *et al.*, 1998b) y a las razas 0, 1, 5 y 6 de *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* (Jiménez Díaz, *no publicado*).

3.2.3.- CONDICIONES EXPERIMENTALES

En todos los experimentos, las semillas de garbanzo utilizadas se desinfectaron superficialmente con una solución de NaOCl al 2% durante 3 min. Posteriormente, las semillas se germinaron en cámaras húmedas a 25°C en oscuridad durante 48 a 72h, seleccionándose semillas con una longitud de radícula estandarizada (1-2 cm). En cada uno de los experimentos, las semillas germinadas se sembraron en contenedores, de diferente volumen para cada experimento, con una mezcla de suelo (arena: limo; 2:1, v/v) esterilizado e infestado o no con el aislado de *Foc-5*, con *M. artiellia* o con ambos patógenos en el momento de la siembra. Las plantas se regaron con agua corriente de acuerdo a sus necesidades y semanalmente se fertilizaron con una solución nutritiva (Hoagland y Arnon, 1950). En todos los experimentos, los contenedores con las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento ajustada a $25 \pm 1^\circ \text{C}$ y un fotoperiodo de 14 h/día de luz fluorescente y NUV a $360 \pm 25 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ durante el tiempo de incubación requerido. Estas condiciones son óptimas para el desarrollo de la Fusariosis Vascular en garbanzo (Jiménez-Díaz *et*

al., 1993b; Landa *et al.*, 2001) y favorables para la reproducción de *M. artiellia* (Di Vito y Greco, 1988b; Castillo *et al.*, 2003).

3.2.3.1.- Estudio de las fases iniciales de la interacción (2-4 DAI)

Para estudiar las respuestas correspondientes a las fases iniciales de la interacción en el patosistema garbanzo-*Foc-5*-*M. artiellia*, se utilizaron plantas de 2 y 4 DAI, tiempo suficiente para que se produzca la germinación de las clamidosporas en contacto con la raíz y la penetración de J2 de *M. artiellia*. Para ello, las semillas germinadas se sembraron en frascos de plástico estériles de 50 cm³ de volumen conteniendo una mezcla de suelo (arena: limo; 2:1, v/v) esterilizado. Cada genotipo se sometió a cuatro tratamientos que fueron: (i) suelo estéril; (ii) suelo infestado con 1.000 J2 de *M. artiellia* por plántula en el momento de la siembra (aplicados en 1 ml de suspensión cerca de los cotiledones de la plántula); (iii) suelo infestado con 30.000 clamidosporas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 por gramo de suelo; y (iv) suelo infestado con 1.000 J2 de *M. artiellia* y 30.000 clamidosporas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 por gramo de suelo. Las plántulas se mantuvieron en las condiciones controladas indicadas anteriormente y las respuestas se evaluaron a los 2 y 4 DAI. La inoculación y estimación de la densidad de inóculo de ambos patógenos se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos indicados anteriormente en 3.2.1.1 y 3.2.1.2.

Para estandarizar en el tiempo el proceso infectivo de los J2 de *M. artiellia*, 48h después de la inoculación todas las plántulas se transplantaron a nuevos frascos estériles de iguales características pero sin nematodos, esto es conteniendo la misma mezcla de suelo esterilizado (tratamientos i y ii) o infestado con la misma densidad de inóculo de *Foc-5* (tratamientos iii y iv). El trasplante se realizó para homogenizar las infecciones de J2 al considerarse que durante el periodo de 48 horas los J2 penetran y migran intercelularmente en el córtex hasta alcanzar el cilindro vascular donde se convierten en sedentarios. La incubación, durante el segundo periodo de 48 horas, en suelo no infestado con el nematodo pretende impedir nuevas infecciones en los tratamientos de 4 DAI, que pueden inducir respuestas diferentes a las de la formación del sitio de alimentación en la planta, y así evitar dos tipos de comportamientos del nematodo en el mismo momento de muestreo.

En el capítulo II se se evaluó la penetración de J2 de *M. artiellia* mediante la estimación del número de J2 penetrados en cada plántula. Con ello, pudimos determinar el porcentaje de penetración en cada genotipo de garbanzo y tratamiento con *M. artiellia*, se determinó una penetración aproximada del 80% de los juveniles inoculados a las 48 horas (véase capítulo II). Además, para confirmar la presencia de J2 de *M. artiellia* y su estado de desarrollo en las raíces de

garbanzo, éstas se tiñeron con fucsina ácida (Bird, 1983) (veáse capítulo II). En ambos casos la inoculación de 1000 J2/planta y los periodos temporales muestreados se ajustaban a la biología de *M. artiellia* y la posible penetración por parte de *Foc-5*.

3.2.3.2.- Estudio de la interacción en fases avanzadas (35-40 DAI) y microdissección por láser

Para estudiar las respuestas en fases avanzadas de la interacción garbanzo-*Foc-5*-*M. artiellia* se utilizaron plantas de 35-40 DAI. Esta fase de la interacción se seleccionó de acuerdo a estudios previos de la interacción garbanzo-*M. artiellia* (Volvás *et al.*, 2005), los cuales mostraron que en la misma se producían elevados niveles de infección así como un buen desarrollo de las células gigantes. En este periodo de tiempo, la hembra está completamente desarrollada, con una deposición inicial de huevos en la masa gelatinosa (Di Vito y Greco, 1988a; Volvás *et al.*, 2005), y el hongo ha invadido el sistema vascular en las plantas susceptibles. Las semillas germinadas se sembraron en macetas de arcilla de 15 cm de diámetro conteniendo 800 cm³ de una mezcla de suelo (arena: limo; 2:1, v/v) esterilizado e infestado o no de acuerdo a los diferentes tratamientos. Cada genotipo se sometió a cuatro tratamientos que fueron: (i) suelo estéril; (ii) suelo infestado con 20 huevos + J2 de *M. artiellia* por centímetro cúbico de suelo (aplicados en una suspensión de 5 ml cerca de los cotiledones de la plántula); (iii) suelo infestado con 30.000 clamidosporas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 por gramo de suelo; y (iv) suelo infestado con 20 huevos + J2 de *M. artiellia* por centímetro cúbico de suelo y 30.000 clamidosporas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 por gramo de suelo. En cada maceta se sembraron cuatro plantas para facilitar la infección de *M. artiellia* y disminuir la variabilidad biológica y de infección entre plantas. La inoculación de *M. artiellia* se realizó en 5 ml de agua destilada estéril en el centro de las cuatro semillas, a la altura de las raíces y en el momento de plantar las semillas germinadas para favorecer la colonización de éstas por el nematodo. En los tratamientos sin nematodo, se añadieron igualmente 5 ml de agua destilada estéril siguiendo el mismo procedimiento. Las plántulas se inocularon en días consecutivos con objeto de obtener nódulos radicales de la misma edad y dar tiempo a la fase de selección y recolección de éstos.

3.2.4.- TOMA DE MUESTRAS

3.2.4.1.- Estudio de las fases iniciales de la interacción (2-4 DAI)

En este experimento se hizo un grupo de diversas plantas para cada tratamiento y periodo de tiempo. Las plantas seleccionadas se lavaron con agua, para eliminar las partículas de suelo adheridas a las raíces, y posteriormente con agua destilada estéril, y se hicieron grupos de unas 10 plántulas, las raíces de las cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su extracción.

3.2.4.2.- Estudio de la interacción en fases avanzadas (35-40 DAI)

En este caso cada repetición biológica consistió en el material vegetal obtenido de cada cuatro plantas/maceta. Las raíces cosechadas de las plantas, se lavaron sucesivamente con agua corriente y con agua destilada, como anteriormente.

Se seleccionaron nódulos producidos por *M. artiellia* en la raíz (tratamientos i y iv en 3.2.3.1) ó raíces de edad similar a las de los nódulos (tratamientos ii y iii en 3.2.3.1). Se optó por eliminar con cuidado la hembra y la masa de huevos, desechando cualquier nódulo dañado. Los nódulos radicales / raíces de edad similar cosechados se sumergieron inmediatamente en RNAlater™ (Ambion), para prevenir posibles degradaciones de RNA. Cuando la cantidad de material fue suficiente para ser manipulada, se fue depositando en tubos de microcentrífuga hasta obtener 100 mg de tejido vegetal, manteniéndose las muestras a -80 °C hasta su extracción. La cantidad de material por muestra se estableció combinando la capacidad de extracción del método RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) con la dificultad de obtener material (por requerir la localización del nematodo y su separación del nódulo) y la conveniencia de no dilatar excesivamente este proceso para reducir la posibilidad de perturbación de la expresión génica al estar las raíces de las plantas fuera del suelo.

3.2.4.3.- Microdissección por láser

Las muestras para la microdissección por láser se procesaron de la misma manera que para el experimento de nódulos (apartado 3.2.4.2). Los tejidos con el ARN estabilizado con RNAlater™ (Ambion) fueron lavados dos veces, durante 15 minutos y en rotación, con tampón fosfato salino y, seguidamente, se depositaron en una solución fijadora (etanol-ácido acético, 3:1, vol/vol) durante 4

horas a 4 °C, aplicando vacío durante 5 minutos cada 30 minutos. La deshidratación se realizó mediante un gradiente de etanol (70-90-100 % etanol en agua), en agitación durante 15 minutos a 4 °C, repitiéndose cada lavado dos veces, y dejando las muestras en 100% etanol toda la noche. El etanol fue eliminado con un gradiente de xileno-etanol (25-50-75-100% de xileno en etanol en agitación durante 15 minutos a 4 °C, repitiéndose cada paso una vez. Los tejidos fueron embebidos en parafina con punto de fusión a 56-58 °C (Panreac) en una cámara de vacío, quitando la presión cada 15 minutos, durante una hora. Posteriormente se eliminó esa parafina, añadiéndose fresca y repitiendo el proceso una segunda vez. Tras ser embebidos, los trozos radicales se posicionaron en moldes para hacer bloques de parafina y se refrigeraron durante toda la noche. Los tejidos parafinados fueron seccionados transversalmente, con un grosor de 10 µm, con un microtomo rotatorio y las secciones se montaron en portaobjetos de cristal cubiertas con PEN (polietileno naftalato), tratadas con RNaseZap™ (Ambion) y expuestas a la luz UV durante 30 minutos para eliminar posibles ARNasas. El montaje de las secciones se realizó en agua tibia tratada con DEPC (dietil pirocarbonato), un potente inhibidor de ARNasas, tras lo cual se dejaron secar éstas a temperatura ambiente. Justo antes de la microdissección, las secciones fueron desparafinadas mediante lavado en xileno durante 2 minutos (dos veces) y se dejaron secar a temperatura ambiente protegidas de ARNasas del ambiente. Las células gigantes en los tratamientos con el nematodo (tratamientos con *M. artiellia* ó la combinación de ambos patógenos) y las células del córtex de la raíz en los restantes (tratamientos control ó *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*), fueron microdisseccionadas y catapultadas del portaobjetos a un tapón de tubo de microcentrífuga de 0,5 ml con un impacto de mayor energía con el láser. Las secciones se capturaron en 30 µl de agua tratada con DEPC, y cada 30 minutos la muestra (conjunto de secciones en el tapón de microcentrífuga) fue depositada dentro del tubo de microcentrífuga para evitar disminuciones de volumen ó contaminaciones con ARNasas del ambiente, congelándose inmediatamente con nitrógeno líquido y manteniéndose a -80 °C hasta la extracción del ARN.

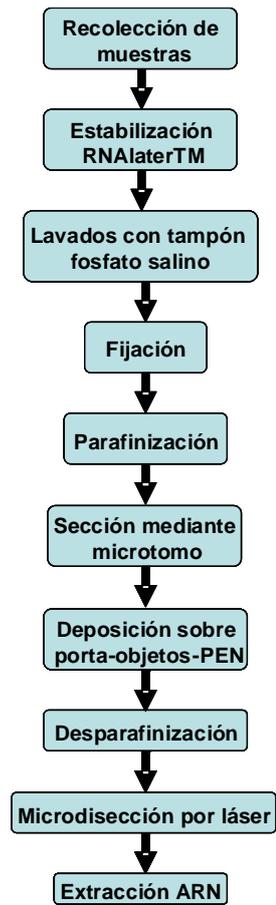


Figura 3.6.- Diagrama del flujo de trabajo en las muestras microdisseccionadas por láser.



Figura 3.7.- Microscopio preparado para la microdissección por láser.

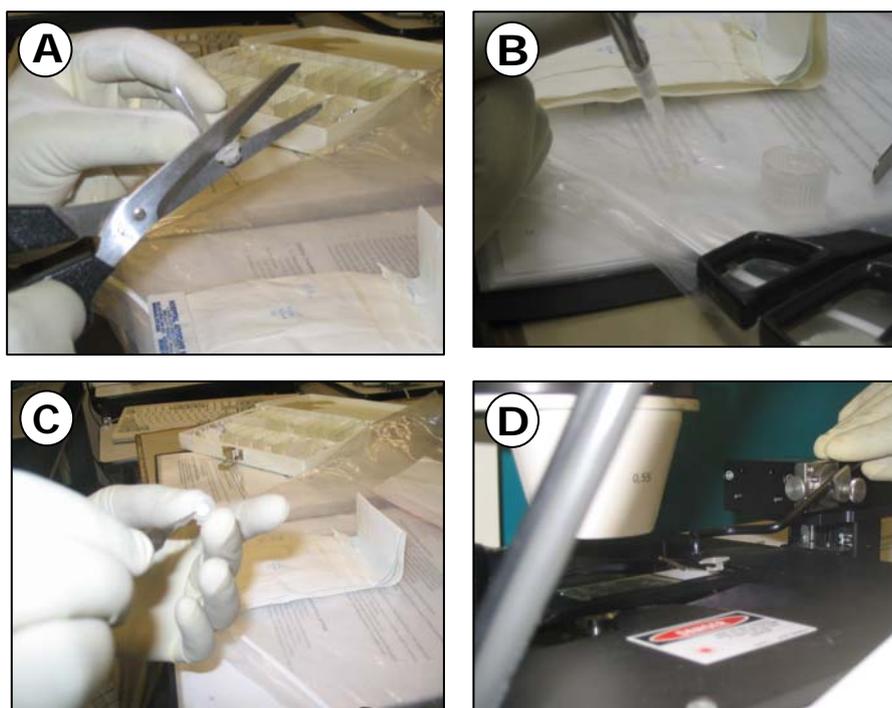


Figura 3.8.-Fases de la preparación de las muestras para la microdissección por láser: A, corte de la tapa de un tubo de microcentrifuga; B, aplicación de 30 μ l de agua mili-Q tratada con DEPC; C y D, colocación con pinzas sobre el soporte que se desplazará sobre la célula cortada para posteriormente catapultarla mediante un pulso de láser de mayor potencia.

3.2.5.- EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ARN Y PRODUCCIÓN DE ADNc

3.2.5.1.- Fases iniciales de la interacción (2-4 DAI)

En este experimento, la homogenización del material se llevó a cabo pulverizando el conjunto de raíces con nitrógeno líquido en mortero preenfriado. Para la extracción del ARN, se utilizó el kit comercial RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), empleándose la máxima cantidad de material pulverizado dentro del rango recomendado (100 mg) y siguiéndose el protocolo suministrado por el fabricante. El tratamiento con ADNasa I de las muestras de ARN se hizo directamente en la columna de fibra de vidrio de extracción, con RNase-Free DNase Set (Qiagen).

3.2.5.2.- Estudio de la interacción en fases avanzadas (35-40 DAI)

Tras la eliminación del RNAlater™ (Ambion), las muestras de nódulos y segmentos de raíces se colocaron en tampón de lisis y se homogeneizaron con esferas de vidrio de diferentes tamaños (2 de 2 mm, 20-30 medianas de 710-1.180 μ m, y una pequeña cantidad de esferas \leq 106 μ m;

Sigma) con FastPrep FP120 (Thermo), en tres series de 20 segundos a la máxima velocidad (6 m/s), enfriando ligeramente los tubos con hielo entre cada homogenización. Después de esto, los homogeneizados se centrifugaron a la máxima velocidad durante 1 minuto, para sedimentar las esferas de vidrio. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga limpio y se procedió a la extracción del RNA mediante el kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) y tratando las muestras con RNase-Free DNase Set (Qiagen), como anteriormente. Aunque la extracción con este kit produjo RNA de buena calidad, los rendimientos fueron relativamente bajos, probablemente debido a la edad de los tejidos y la cantidad de material utilizados (1,5-2 μg de ARN total/extracción).

3.2.5.3.- Microdissección por láser (35-40 DAI)

Las muestras del experimento de microdissección fueron extraídas con el kit comercial Pico Pure™ RNA Isolation Kit (Arcturus), que está específicamente diseñado para la extracción de muestras de escaso volumen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los rendimientos de extracción fueron elevados (aproximadamente 250 ng/ μl), pero probablemente la medida estuviera enmascarada por la elevada proporción de contaminantes debido a la elevada manipulación de la muestra.

3.2.5.4.- Cuantificación y calidad del ARN total

La calidad y cantidad del ARN total fue evaluado mediante Nanodrop® ND1000 (Thermo Scientific) midiendo la absorbancia a 260 nm (Sambrook *et al.*, 1989), en el que un valor de A_{260} de 1 corresponde, aproximadamente, a 40 mg ml^{-1} de ARN. La contaminación por proteínas fue determinada mediante el cociente A_{260}/A_{280} , y el de carbohidratos y fenólicos mediante cociente A_{260}/A_{230} . El valor para dichas relaciones debe estar comprendido entre 1,8 y 2. En algunas muestras, la cantidad total de ARN extraído permitió determinar dicha calidad mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se utilizaron geles al 1,6 % agarosa (Sigma) en tampón TBE 1x estéril [1,08 % (p/v) de Trizma base, 0,55 % (p/v) de ácido bórico y 0,093 % (p/v) de EDTA- Na_2 (BioRad)]. La agarosa se disolvió en tampón TBE 1x con ayuda de un horno de microondas y se añadió bromuro de etidio (0,5 μg ml^{-1}) (Sigma). El gel se dejó polimerizar, durante 1 hora, antes de aplicar las muestras. Éstas, conteniendo 1 μg de ARN total en todos los casos, se mezclaron con 2 μl de tampón de carga 5 x [25 % (v/v) de glicerol, EDTA- Na_2 1 mM, pH 8 y 0,2 % (p/v) de azul de bromofenol] y su volumen se ajustó a 10 μl con agua ultra pura tratada con DEPC. Tras la aplicación de las muestras, la electroforesis se llevó a cabo en tampón TBE 1x, a 50 V hasta que el azul de

bromofenol sobrepasó la mitad del gel. Para evitar la contaminación por RNasas, todo el material necesario para la electroforesis (peine, cama y cubeta) se trató previamente con NaOH 50 mM durante 12 horas y, posteriormente, se lavó con abundante agua ultra pura tratada con DEPC.

El ARN total extraído de nódulos ó raíces de su misma edad, resultó de menor cantidad (60-90 ng/ μ l) y calidad (A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9; A_{260}/A_{230} = 0,9-1,3), que el extraído de raíces más jóvenes. Aunque la contaminación por proteínas estuvo entre los límites recomendados, la contaminación por otros compuestos, como carbohidratos y fenólicos, si pudo ser superior y condicionar los resultados cualitativos y cuantitativos de la extracción. Por ello, se trató de mejorar el procedimiento con diversos métodos como: i) extracción con Nitrógeno líquido y mortero en la fase de disrupción del tejido; ii) sin estabilizar el tejido con RNAlater™ (Ambion); iii) aplicación del protocolo de limpieza indicado en el kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen); y iv) adición de 2 % de PVP (Polivinilpirrolidona) en el tampón de lisis. Sin embargo, los anteriores tratamientos no supusieron ninguna mejora en los resultados ó, de obtenerse alguna, produjeron pérdidas muy elevadas de ARN. En cualquier caso, las posteriores PCR no mostraron ninguna interferencia excesiva de estos compuestos contaminantes. En las extracciones de los tejidos microdisecionados, no se pudo determinar su calidad por análisis electroforético debido a la escasez de muestra, aunque los parámetros obtenidos mediante análisis espectrofotométrico indicaron una elevada contaminación por carbohidratos u otras impurezas (0,5-1,2) y una contaminación por proteínas no muy elevada (1,2-1,8). Sin embargo, la elevada aunque imprescindible manipulación de estas muestras durante la extracción, puede provocar cierta distorsión en estos valores.

3.2.5.5.- Amplificación del ARN

La amplificación del ARN de las muestras obtenidas por microdisección se llevó a cabo con SuperScript™ Amplification System (Invitrogen), que es un sistema basado en el protocolo de amplificación isoterma de ARN desarrollado en el laboratorio de Dr. Jones Eberwine (Van Gelder *et al.*, 1990). La primera etapa usa SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) para sintetizar la primera hebra de ADNc unida a un cebador oligo(dT) conteniendo un promotor de la T7 ARN polimerasa. Después de la síntesis de la segunda hebra con ADN polimerasa I y posterior purificación, el ADNc molde de doble hebra es amplificado *in vitro*, en forma de ARN antisentido (ARNa), utilizando la T7 RNA polimerasa con un volumen optimizado de enzima y composición del tampón indicado por el fabricante. En esta última etapa, las moléculas transcritas de ARNa resultan complementarias a las de ARNm de la muestra, manteniendo las distintas especies de ARNa las proporciones de los correspondientes ARNm presentes en el ARN total.

3.2.5.6.- Síntesis de ADNc

En los experimentos de las fases inicial (2 y 4 DAI) y tardía (35-40 DAI) de la interacción, la reacción de retrotranscripción se realizó con 900 ng de ARN total, inmediatamente después de la extracción o amplificación para evitar posibles degradaciones. La retrotranscripción se llevó a cabo mediante la retrotranscriptasa RNase H⁺ MMLV, usándose una mezcla optimizada de cebadores oligo-(dT) y cebadores aleatorios, tampón de reacción y agua libre de nucleasas, todos ellos incluidos en el iScript cDNA síntesis kit (BioRad). El protocolo seguido fue: fase 1) 5 min a 25 °C; fase 2) 30 min a 42 °C; fase 3) 5 min a 85 °C; fase 4) bajar la temperatura a 4 °C; fase 5) 5 min a 85 °C. Una vez finalizada la reacción, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta la realización de la PCR a tiempo real. En el experimento de microdissección por láser la retrotranscripción se realizó con 2 µg de ARN amplificado y también se llevó a cabo mediante la retrotranscriptasa RNase H⁺ MMLV, usándose en cada reacción, como cebadores, 1 µl de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (50 µM), 1 µl de mezcla 10 mM de dNTPs (10 mM de cada dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro) y agua destilada libre de nucleadas, todos ellos componentes del kit SuperSript™ Reverse Transcriptase (Invitrogen). La mezcla se calentó a 65 °C durante 5 min, para permitir la unión del cebador a la cadena de ARN, y posteriormente se incubó durante 1 min en hielo. Los contenidos de la reacción se centrifugaron ligeramente y se añadió el tampón de la reacción de la cadena complementaria de cDNA, 1 µl de 0,1 M DTT, 1 µl RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor (Invitrogen) y 1 µl de SuperScript™ III RT (200 U/ µl). La mezcla anterior se incubó a 50 °C durante 60 min y se inactivó la reacción a 70 °C durante 15 min.

3.2.6. GENES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA

Se seleccionaron tres grupos de genes de interés, atendiendo a los siguientes criterios: 1) tener una presunta función defensiva al estar implicados en la biosíntesis de fitoalexinas (genes de la ruta fenilpropanoide) o en su transformación en formas conjugadas (glucosiltransferasa); 2) codificar a proteínas cuya expresión se hubiera revelado como afectada de manera diferencial por la infección en los estudios de proteómica; y 3) ser expresados de forma constitutiva para su uso como genes de control interno o de referencia.

Los genes seleccionados de la ruta fenilpropanoide, y por tanto potencialmente relacionados con la biosíntesis de las fitoalexinas medicarpina y maackiaina en garbanzo, han sido los correspondientes a una probable glucosiltransferasa (AJ400859), a una chalcona sintasa (CHS;

AJ012690) y chalcona isomerasa (CHI; AB024988), a tres monooxigenasas de tipo citocromo P450 [Cyp81D9 (AJ249802); cinamato 4-hidroxilasa (C4H; AJ007449); y cyp81E3, de secuencia muy similar a la de la isoflavona 2'-hidroxilasa de regaliz (I2'H, AJ012581)], a fenilalanina amoniaco-liasa (PAL; AJ250836), y a isoflavona reductasa (IFR; X60755). Los dos primeros de los genes anteriores han sido caracterizados por el grupo de la Dra. Berta Dopico (Univ. Salamanca) a partir de librerías génicas de epicotilos etiolados de garbanzo, mientras que los restantes lo fueron en estudios realizados por el grupo del Dr Barz (Univ. Münster, Alemania) sobre respuestas de plantas y/o cultivos celulares de garbanzo a la infección con *Ascochyta rabiei* y/o tratamiento con elicitores. Dentro de la segunda clase de genes, se incluyeron los correspondientes a CHS (AJ012690), que dada su función lo hemos ya considerado dentro del grupo anterior, a una quitinasa de clase I (AJ012821) y a una catalasa (AJ131046), estos dos últimos también caracterizados por el grupo del Dr Barz en los estudios antes aludidos. Finalmente, dentro de los genes de referencia, se seleccionaron los correspondientes a una gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (AJ010224), a los espaciadores transcritos internos ITS 1 y ITS 2 del ARNr 5,8S (AJ237698) y a β -tubulina (X98406), ya que todos ellos han sido utilizados precedentemente en raíces de garbanzo expuestas a *F. oxysporum ciceris* como genes de control interno (García-Limones, 2003).

3.2.7.- DISEÑO DE CEBADORES Y PROTOCOLO DE LA PCR A TIEMPO REAL

Los cebadores utilizados fueron diseñados a partir de las secuencias disponibles para estos genes de garbanzo en el NCBI, mediante el programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Asimismo, se estudiaron las posibles estructuras secundarias de los ADNc utilizados mediante el programa ADN mfold (Zuker, 2003), y se analizaron finalmente las posibles coincidencias con genes de otros organismos mediante los motores de búsqueda de homología de secuencias-BLAST en el NCBI. Todas las parejas de cebadores, con sus secuencias, productos de amplificación y eficiencias de la reacción quedan recogidos en las Tablas 3.1 y 3.2. Para cada pareja de cebadores se optimizó la reacción de PCR a diversas concentraciones de cebadores, la temperatura de hibridación (entre 57 y 62°C) y la concentración de Mg^{2+} . Sin embargo, este último componente se mantuvo a la concentración de la solución maestra proporcionada por el kit comercial, al no observarse ninguna mejora con el aumento de su concentración. Con los datos anteriores, cada pareja de cebadores fue analizada mediante una serie de diluciones en serie para determinar si las reacciones eran reproducibles y calcular la eficiencia en el rango de concentraciones en el que se iban a desarrollar las PCRs. Las eficiencias de las parejas de cebadores estuvieron comprendidas entre el 89 y 104 %

y se determinaron mediante la fórmula (1), lo que fue realizado automáticamente por el iCycler (BioRad):

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1 \quad [1]$$

TABLA 3.1.- Parejas de cebadores utilizados en la PCR a tiempo real.

Nº de acceso al GenBank	Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Rango y tamaño del producto (pb)
AJ131046	Catalasa	CAT*1 _a	GGAAAGCGTGAAAGGTGCATACGTCCCAAG	142-265 (149)
		CAT*2 _a	CGGACTTCATGTGTGACGCGTGGGTC	
AB024988	Chalcona isomerasa	CHI*1	GGCGATGAAGAAGTTGAAGC	131-322 (191)
		CHI*2	CAACACTGCCGATGAAACTG	
AJ012690	Chalcona sintasa	CHS*1	GCAAGACATGGTGGTTGTTG	346-592 (247)
		CHS*2	ATCCTTAGCCAAACGAAGCA	
AJ249802	Cyp81D9 citocromo P450 monoxigenasa	Cyp81D9*1	TTACAGTTCATGAGAAGGTAGTTGC	499-648 (149)
		Cyp81D9*2	GAACAACACACATGTGCATCTC	
AJ012581	Cyp81E3 Isoflavona 2'-hidroxilasa	I2'H*1	GAAGTCTGCAATTGTCTGG	643-792 (149)
		I2'H*2	GTTGCGTTGTTCTTGAAGGAG	
AJ237698	Espaciadores transcritos internos, ITS1 y 2 de ARNr 5,8S	5R*1 _a	CACATATCGAAGCCCATTGCCGATTTCC	399-526 (154)
		5R*2 _a	GGTCTCGTGCGACACACAACCACCATC	
AJ250836	Fenilalanina amoniaco-liasa	PAL*1	CTGCGGTTGCTACACAGAAT	212-386 (174)
		PAL*2	GCACCACCCTGTTTTGTTCT	
AJ010224	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GP*1 _a	GCAGTACCGGAGCTGCTAAGGCTGTTGG	241-332 (147)
		GP*2 _a	TTTCGTCGTAGGTAGCGGCCTTCTCAAGC	
X60755	NADPH:Isoflavona reductasa	IFR*1	AACCTCCAAGGGACAAGGTT	608-804 (197)
		IFR*2	CCCAATCTTTTTCTCCCACA	
AJ400859	Probable glucosiltransferasa	Gluc*1	CAATGGAAGTCCGGTGT	870-965 (95)
		Gluc*2	CGCACAGCAATGTCCATATC	
AJ012821	Quitinasa clase I	B-Chi*1	ATTGCTGCTCCAATCCAAAC	962-1169 (207)
		B-Chi*2	TTATAAGGTGCGTGCGTGAA	
X98406	β-tubulina	Tu*1 _a	GGTGGGGTTTGACCTCTCACTTCTCG	807-922 (144)
		Tu*2 _a	GCAGATGCAGTCAAGTATCGGCCATGTGC	
AJ007449	Trans-cinnamato 4-monoxigenasa	C4H*1	CCACCGTAATCTCACCGACT	162-404 (243)
		C4H*2	GGCACCCTCATGATTCTTCT	

Para cada muestra, la reacción de PCR se realizó por triplicado, con los siguientes componentes en un volumen final de 25 µl: Tampón de reacción iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) 2 x [100mM KCl; 40 mM Tris-HCl, pH 8.4; 0,4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP); iTaq DNA polymerase, 50 unidades/ml; 6 mM MgCl₂; SYBR Green I; 20 nM fluoresceína, y estabilizantes]; 200 mM de cada cebador; y 1,28 µl de cDNA diluido 2x. El programa de la PCR fue 95 °C durante 3 min, seguido de 40 ciclos en los que cada uno consistía en una etapa de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, 30 s a la temperatura específica de hibridación del cebador, y la última de cada ciclo de 30 s a 72 °C. Una vez efectuadas las reacciones se realizó una curva de fusión para comprobar la especificidad de dicha reacción. La medición de la fluorescencia se realizó en la fase de polimerización del producto específico con la doble cadena de ADN con iCycler y los ciclos umbral (Ct) fueron determinados usando el programa iCycler (BioRad) para todos los tratamientos.

El tamaño y la especificidad de la reacción PCR también se comprobó mediante electroforesis en geles al 2 % de agarosa (Sigma) en tampón TBE 1x estéril [1,08 % (p/v) de Trizma base, 0,55 % (p/v) de ácido bórico y 0,093 % (p/v) de EDTA-Na₂] (Bio-Rad). La agarosa se disolvió en tampón TBE 1x con ayuda de un horno microondas y se le añadió bromuro de etidio (0,5 µg ml⁻¹) (Sigma). El gel se dejó polimerizar, durante 1 hora, antes de aplicar las muestras. Las alícuotas de 20 µg de producto de PCR se mezclaron con 5 µl de tampón de carga 5 x [25 % (v/v) de glicerol, EDTA-Na₂ 1 mM, pH 8 y 0,2 % (p/v) de azul de bromofenol]. Las muestras se aplicaron en el gel y se desarrolló la electroforesis en tampón TBE 1x, a 50 V hasta que el azul de bromofenol llegó la parte inferior del gel.

3.2.8.- ANÁLISIS DE DATOS

Las Ct obtenidas del iCycler fueron estudiadas usando Gene Expression Macro™ Version 1.1 (Bio-Rad), el cual usa los algoritmos descritos por Vandesompele *et al.* (2002), en los que se calcula la expresión relativa mediante diversos pasos:

1.- Para cada muestra se calcula una cantidad relativa a la muestra control para el mismo gen.

$$\text{Cantidad Relativa} = \text{eficiencia}^{(\text{Ct control} - \text{Ct muestra})} \quad [2]$$

2.- Para cada muestra se calcula un factor de normalización, que es la media geométrica de las cantidades relativas de todos los genes de referencia que se han obtenido de la misma.

$$\text{Factor de normalización} = (\text{cant. relat. 1} * \text{cant. relat. 2} * \dots * \text{cant. relat. N})^{(1/N)} \quad [3]$$

3.- El cálculo del nivel de expresión de la muestra se hace usando la ecuación:

$$\text{Nivel de expresión} = \text{Cant. relativa} / \text{Factor de normalización} \quad [4]$$

Con estos valores se obtienen unos niveles de expresión que se pueden referenciar a un tratamiento, dividiendo el nivel de expresión de todos los valores de expresión respecto a éste.

Se utilizaron los tres genes de referencia antes indicados, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, espaciadores transcritos internos ITS 1 y ITS 2 del ARNr 5,8S y β -tubulina (Tu*1 y 2), para normalizar los datos usando los algoritmos mencionados.

En los experimentos en los que solo se dispuso de una repetición biológica (fases iniciales de la interacción y microdissección por láser), no se pudo aplicar ningún análisis estadístico, mientras que en los experimentos en fases más avanzadas de la interacción (35-40 DAI), en los que sí se dispuso de repeticiones biológicas (35-40 DAI), los datos se analizaron mediante análisis multivariante de componentes principales, agrupación jerárquica y comparación dos a dos de su expresión normalizada (caso de expresión de genes de la ruta fenilpropanoide) ó con el test no paramétrico de Wilcoxon signed-rank (genes quitinasa clase I y catalasa).

Los análisis anteriores se hicieron con el paquete estadístico NIA Array Analysis (Sharov *et al.*, 2005), el cual selecciona los genes estadísticamente válidos mediante el análisis de varianza (ANOVA). Se siguieron varios pasos en el estudio: i) se realizó una agrupación jerárquica ("*hierarchical clustering*") para estudiar el conjunto de datos, y los resultados se representaron en un dendrograma; ii) el conjunto de datos fue analizado mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA) usando los siguientes parámetros: tipo de matriz de covarianza, extracción de los tres primeros componentes principales, una variación de al menos el doble en el nivel de expresión del gen y un nivel umbral de correlación para la obtención de las agrupaciones de 0,4; y representándose los resultados del análisis PCA en un diagrama bidimensional; iii) para cada gen se obtuvieron los niveles medios de expresión para cada uno de los tratamientos, iv) la comparación entre tratamientos.

3.3.- RESULTADOS

En todos los experimentos realizados, el análisis de los niveles de expresión de los genes de interés se realizó mediante la técnica de PCR a tiempo real. Trabajándose con plantas de garbanzo de las líneas CA336.14.3.0 e ICC 14216K, no inoculadas (control) e inoculadas individual y conjuntamente con *M. artiellia* y con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5, se tomaron muestras de raíces, tanto en las fases iniciales de la interacción (2 y 4 DAI) como en fases más avanzadas (35-40 DAI), cuyo ARN se extrajo según los protocolos indicados anteriormente. El ARN se convirtió en ADNc, mediante transcripción inversa (retro-transcripción), y se cuantificó mediante PCR a tiempo real, utilizándose los cebadores específicos para los genes de control interno (g3pdh, ITS 1 y 2 del ARNr 5,8S y β -tubulina) y para los genes diana.

3.3.1.- EXTRACCIÓN DEL ARN Y TRATAMIENTO CON ADNasa

La cantidad y calidad del ARN total extraído de las raíces fue muy variable, estando en relación con la edad de éstas. Así, de las raíces jóvenes (2-4 DAI) se obtuvo ARN de gran calidad (A_{260}/A_{280} = 2,10-2,19; A_{260}/A_{230} = 2,10-2,15) y con buen rendimiento (700-900 ng/ μ l), independientemente de la línea de garbanzo (CA336.14.3.0 e ICC 14216K). Sin embargo, la extracción de ARN total de nódulos ó raíces a los 35-40 DAI resultó con menores rendimientos (60-90 ng/ μ l) y una calidad inferior (A_{260}/A_{280} = 1,8-1,9; A_{260}/A_{230} = 0,9-1,3). La contaminación por proteínas estuvo dentro de los límites recomendados, pero se observó cierta contaminación de otros compuestos, como carbohidratos y fenólicos, en el parámetro A_{260}/A_{230} . Se mantuvo el método de trabajo, interpretándose que las diferencias observadas en las extracciones entre 2-4 DAI y 35-40 DAI podrían deberse a una menor actividad metabólica asociada a la mayor edad de los tejidos.

La integridad del ARN total extraído y la ausencia de contaminación por ADN tras el tratamiento con DNasa, se verificó mediante análisis electroforético de los extractos de plántulas de 2-4 DAI. En todos los casos (muestras control e inoculadas con *Foc-5*, *M. artiellia* y *Foc-5-M. artiellia*) se apreciaron tres bandas (Fig. 3.9), dos de ellas correspondientes a los ARN ribosómicos 18S y 28S y una tercera, de peso molecular algo mayor, que en principio se interpretó como de posible ARN ribosómico mitocondrial. No se observó ninguna banda de menor movilidad, que pudiera asignarse a ADN, en los geles. En cualquier caso, la ausencia de ADN en las muestras de ARN se pudo verificar mediante análisis por PCR a tiempo real de algunas de estas muestras antes de realizar la reacción de retro-transcripción.

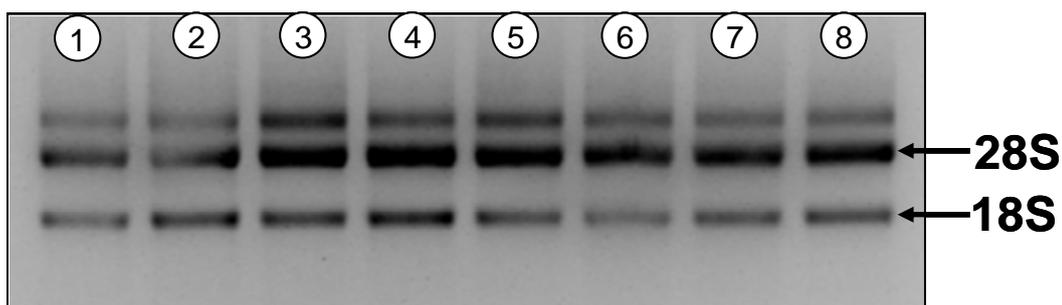


Figura 3.9.- Análisis electroforético del ARN total de raíces de garbanzo, extraído con el kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) y después del tratamiento con RNase-Free DNase Set (Qiagen). Las muestras de ARN se obtuvieron a partir de raíces de plantas de garbanzo de 4 DAI. Carriles 1 y 2, plantas control de 'CA336.14.3.0' e 'ICC14216K', respectivamente; carriles 3 y 4, plantas de 'CA336.14.3.0' e 'ICC14216K' inoculadas con *M. artiellia*, respectivamente; carriles 5 y 6, plantas de 'CA336.14.3.0' e 'ICC14216K' inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5, respectivamente; carriles 7 y 8 plantas de 'CA336.14.3.0' e 'ICC14216K' inoculadas con *M. artiellia* y *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5, respectivamente. En todos los casos se cargó la misma cantidad de ARN total (1 µg).

3.3.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE PCR A TIEMPO REAL

Para cada pareja de cebadores se determinó la temperatura de hibridación así como las posibles estructuras secundarias del ADNc en las condiciones de trabajo. En cada caso, se seleccionó la temperatura que producía una menor Ct, y una vez optimizada la temperatura de hibridación, también se optimizaron las concentraciones de cebadores y de Mg^{2+} , aunque en este último caso la suministrada por la mezcla maestra de reacción iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) era apropiada.

La eficiencia de la PCR se determinó para cada pareja de cebadores a la temperatura de hibridación utilizada en los ensayos (61,3 °C), de acuerdo con la ecuación [1] descrita en Materiales y Métodos (apartado 3.2.7). En todos los casos la eficiencia fue igual ó superior al 89% (Tabla 3.2).

Tabla 3.2.- Eficiencia de la PCR para las distintas parejas de cebadores. Los valores se calcularon a la temperatura de hibridación de 63,1°C, mediante la ecuación [1] descrita en Materiales y Métodos (apartado 3.2.7).

Nº de acceso al GenBank	Gen	Eficiencia (%)
AJ131046	Catalasa	96
AB024988	Chalcona isomerasa	99
AJ012690	Chalcona sintasa	97
AJ249802	Cyp81D9 citocromo P450 monoxigenasa	104
AJ012581	Cyp81E3 Isoflavona 2'-hidroxilasa	103
AJ237698	Espaciadores transcritos internos ITS1 y 2 de ARNr 5,8S	90
AJ250836	Fenilalanina amoniaco-liasa	94
AJ010224	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	92
X60755	NADPH:Isoflavona reductasa	99
AJ400859	Probable glucosiltransferasa	103
AJ012821	Quitinasa clase I	99
X98406	β-tubulina	89
AJ007449	Trans-cinnamato 4-monoxigenasa	98

3.3.3.- VERIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Los productos de PCR se evaluaron mediante el análisis de la curva de fusión y electroforesis en gel de agarosa. Las temperaturas de fusión, para los productos específicos de PCR, estuvieron comprendidas entre 83 y 86 °C, no detectándose la formación de algún producto inespecífico de PCR, ni por las curvas de fusión ni por la visualización de los productos de PCR en geles de agarosa.

Las parejas de cebadores solo generaron una banda única de amplificación del tamaño esperado (Tabla 3.1 y Fig. 3.11), al usar como molde el ADNc de raíces, tanto de plantas control sin inocular como de plantas inoculadas, separada o conjuntamente, con los dos patógenos. Como ejemplo de los estudios de verificación realizados se muestran, en la Fig. 3.11, las curvas de fusión

obtenidas en la amplificación de los genes gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa e isoflavona reductasa.

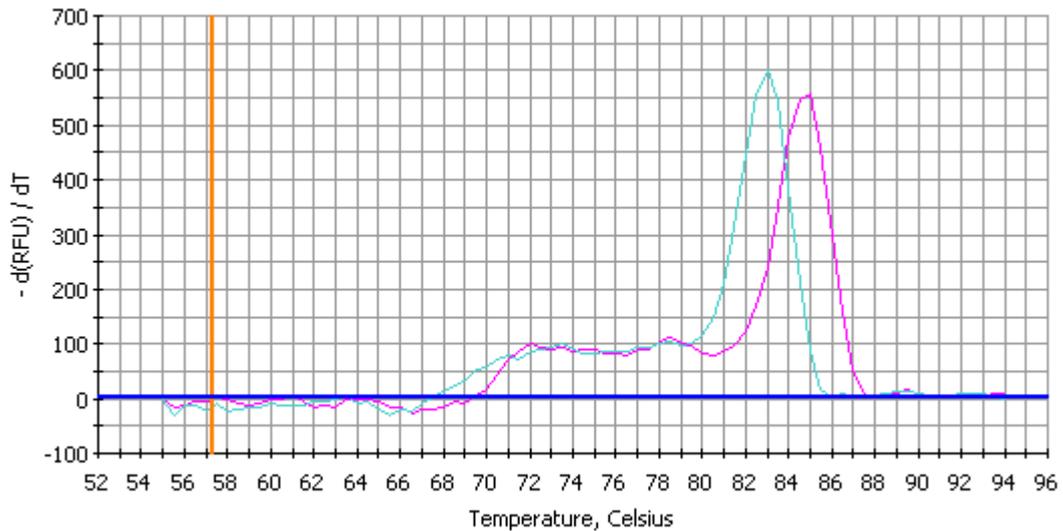


Figura 3.10.- Ejemplo de dos curvas de fusión tras la amplificación por PCR a tiempo real. Una muestra de ADNc de plantas control de la línea ICC14216K, en la cual se han amplificado los genes gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GP*1 y GP*2) (color fucsia) e isoflavona reductasa (IFR*1 y IFR*2) (color azul claro). En ambos casos se observó un único producto de amplificación, cuya temperatura de fusión fue de 85°C (para el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) o de 83°C (para el gen isoflavona reductasa).

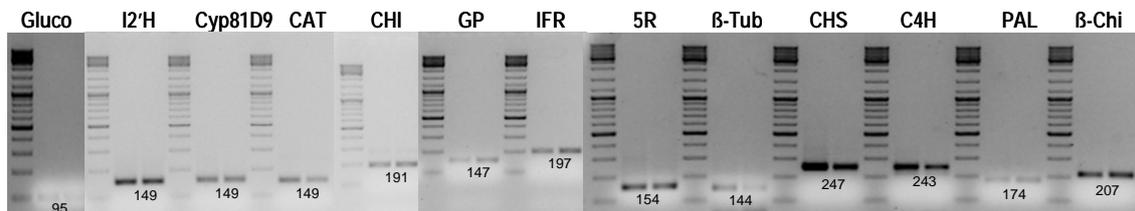


Figura 3.11.- Amplicones de los genes estudiados mediante PCR a tiempo real. El valor junto a la banda corresponde al tamaño teórico del amplicón. Abreviaturas: Gluco: Probable glucosiltransferasa (AJ400859); I2'H, Isoflavona 2'-hidroxilasa (AJ012581); Cyp81D9, citocromo P450 monooxigenasa (AJ249802); CAT, Catalasa (AJ131046); CHI, Chalcona isomerasa (AJ012690); GP, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; IFR, NADPH: Isoflavona reductasa (X60755); 5R, Espaciadores transcritos internos, ITS1 y 2 de ARNr 5,8S (AJ237698); β-Tub, β-tubulina (X98406); CHS, Chalcona sintasa (AJ012690); C4H, Trans-cinnamato 4-monooxigenasa (AJ007449); PAL, Fenilalanina amoniaco-liasa (AJ250836); β-Chi, -quitinasa clase I (AJ012821).

3.3.4.- NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA RUTA FENILPROPANOIDE

Para una serie de genes seleccionados, se ha estudiado su expresión diferencial en raíces en función del tipo de línea de garbanzo (líneas ICC14216K y CA336.14.3.0, con resistencia estable e inestable a *Foc-5*), de la inoculación (inoculaciones individuales con *Foc-5* o *M. artiellia* y conjunta con ambos patógenos) en la fase inicial o tardía de la interacción (respectivamente, ensayos a 2-4 y a 35-40 DAI).

Salvo dos excepciones, la de los genes Cyp81D9 (perteneciente al grupo de citocromo P450 monoxigenasas) y el de una posible glucosiltransferasa, cuya función específica en la ruta biosintética fenilpropanoide no está determinada, los restantes genes elegidos para el estudio, que son los señalados en rojo en la Fig. 3.12, sí ocupan posiciones clave en dicha ruta. Dichos genes se han seleccionado sobre la base de que: 1) su nivel de expresión puede suministrar información del grado de inducción de la ruta biosintética de fitoalexinas pterocarpánicas en garbanzo; y, como consecuencia de lo anterior, 2) dicho grado de inducción, mostrado bien similar o diferencialmente, puede explicar bien respuestas similares de resistencia en plantas infectadas con *Foc-5* (el caso de 'ICC14216K' y 'CA336.14.3.0') o diferenciales de mantenimiento (el caso de 'ICC14216K') y pérdida (el caso de 'CA336.14.3.0') de esa resistencia en plantas coinfectadas con *Foc-5* y *M. artiellia*.

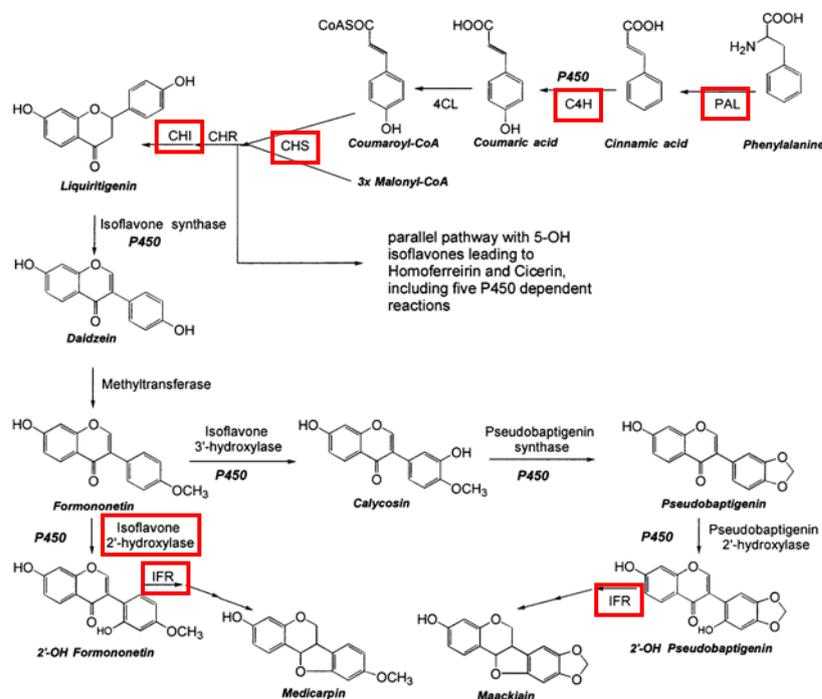


Figura 3.12.- Biosíntesis de las fitoalexinas tipo pterocarpano, medicarpina y maackiaina en garbanzo. P450, citocromo P450 monoxigenasa; PAL, fenilalanina amoniaco liasa; C4H, ácido trans-cinámico 4-hidroxilasa; 4CL, 4-cumarato CoA ligasa; CHS, chalcona sintasa; CHI, chalcona isomerasa; CHR, chalcona reductasa; IFR, Isoflavona reductasa. Los enzimas resaltados en cuadros rojos son los estudiados en este apartado. El gen cyp81D9 (perteneciente al grupo de citocromo P450 monoxigenasas) y el gen que codifica una probable glucosiltransferasa no se han señalado en el esquema. (Extraído de Overkamp *et al.*, 2000)

3.3.4.1.- Fases iniciales de la interacción (2-4 DAI)

En la Tabla 3.3 se recogen los resultados de expresión génica a 2 y 4 DAI, correspondientes a raíces de plantas control e inoculadas, con *Foc-5*, *M. artiellia* y la combinación de ambos patógenos, de las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K, habiéndose referido todos los valores a los del control a 2 DAI de CA336.14.3.0. Aunque estos valores se presentan graduados en escalones de 0,5 veces, en principio sólo se considerarán significativas las variaciones iguales o superiores a 2x (valores iguales o mayores / menores al doble / mitad del control). También debe destacarse que todas las variaciones registradas fueron de tipo cuantitativo; todos los genes estudiados se expresaron en los controles y ninguno de ellos dejó de hacerlo en alguno de los tratamientos.

Centrándonos ya en las variaciones encontradas, y refiriéndonos en principio a los niveles de expresión constitutiva en ambas líneas de garbanzo, la tendencia mostrada fue a mayores valores en 'ICC14216K' que en 'CA336.14.3.0', si bien en ningún caso las diferencias fueron significativas. También pudo apreciarse una tendencia, similar en ambas líneas, a menores niveles de expresión constitutiva en plantas de mayor edad, si bien sólo en un caso (expresión de IFR en 'CA336.14.3.0') esta regulación negativa resultó significativa (valor 2DAI/4DAI de 0,45).

Respecto a las plantas inoculadas, los resultados apuntaron tres tendencias principales: 1) superiores niveles de expresión de la mayoría de genes estudiados a 2DAI en 'ICC14216K' que en 'CA336.14.3.0'; 2) respuesta a 4DAI bastante similar en ambas líneas a las inoculaciones con *Foc-5* y con *Foc-5* / *M. artiellia*; y 3) respuesta a 4DAI diferente en ambas líneas a la inoculación con *M. artiellia*. La tendencia 1), que podríamos concretar en la inducción, en respuesta a la inoculación con los patógenos a 2 DAI en la línea ICC14216K, de algunos genes (CHS, CHI, I2'H y Cyp81D9), no llegó, sin embargo, a plasmarse en diferencias significativas, máxime si las comparaciones se hacen entre los niveles de expresión de ambas líneas referidos a sus propios controles (por ejemplo, en este caso los valores de sobre-expresión de Cyp81D9, el gen al que corresponde una mayor regulación positiva entre los datos correspondientes a 2DAI de la Tabla 3.3, pasarían de estar comprendidos en el intervalo de 2,02-2,81 a estarlo en el de 1,21-1,69). La tendencia 2) se puede concretar, principalmente, en la mayor expresión, respecto a los respectivos controles, de los genes PAL, C4H e IFR en respuesta a *Foc-5* y de esos mismos genes más CHS en respuesta a *Foc-5*/Ma, aunque los incrementos en el caso de ICC14216K no fueron en todos los casos significativos. Por último, la tendencia 3) se manifiesta en que mientras en 'ICC14216K' la inoculación con *M. artiellia* no tuvo a 4DAI ningún efecto en la expresión de los genes estudiados, en 'CA336.14.3.0' reprimió significativamente la de CHI, I2'H, IFR y Cyp81D9.

Tabla 3.3.- Perfiles de expresión en raíz de genes relacionados con la ruta fenilpropanoide a 2 y 4 DAI (Days After Inoculation)^a.

Ref gen Bank	Gen	2 DAI								4 DAI							
		CA336.14.3.3.0				ICC14216K				CA336.14.3.3.0				ICC14216K			
		Control	<i>Foc5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>	Control	<i>Foc5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>	Control	<i>Foc5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>	Control	<i>Foc5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>
AJ250836	Fenilalanina amoniaco liasa	1,00	0.91	1.06	1.25	1.64	1.51	1.32	1.76	0.93	2.92	2.62	0.64	1.19	2.96	2.19	1.27
AJ007449	Trans-cinamato 4-monoxigenasa	1,00	1.08	0.88	1.26	1.41	0.92	1.34	1.36	0.61	2.36	2.37	0.51	0.97	3.18	1.69	1.30
AJ012690	Chalcona sintasa	1,00	0.99	0.82	1.23	0.89	1.24	1.38	1.06	0.66	0.92	1.74	0.60	1.13	1.58	1.95	1.27
AB024988	Chalcona isomerasa	1,00	0.89	0.90	0.96	1.12	1.74	1.89	1.19	1.05	0.77	1.19	0.39	1.06	0.97	0.55	1.16
AJ012581	Isoflavona 2'-hidroxilasa-Cyp81E3	1,00	0.90	0.80	0.84	1.01	1.70	1.85	1.06	1.00	0.76	1.22	0.35	0.93	0.92	0.52	1.10
X60755	NADPH: Isoflavona reductasa	1,00	0.89	1.22	1.19	1.63	1.53	1.99	1.71	0.45	1.33	1.97	0.06	0.93	1.79	1.90	0.92
AJ400859	Probable glucosiltransferasa	1,00	1.19	0.95	0.87	1.19	0.92	0.79	1.25	0.76	1.44	1.15	0.76	0.82	0.98	1.00	1.10
AJ249802	Cyp81D9	1,00	1.06	1.26	1.36	1.66	2.81	2.67	2.02	1.13	1.19	2.02	0.35	1.21	1.70	0.89	1.47

^a La expresión de los genes seleccionados fue cuantificada mediante RT-PCR a tiempo real y los resultados se expresan como valores relativos a los de plantas control de la línea CA336.14.3.3 a los 2 DAI. Para una mejor visualización de los resultados, se han sombreado éstos con una graduación de colores de acuerdo con los valores relativos de expresión. Tratamientos: Control, plantas no inoculadas; *Foc-5*, plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g de suelo); *Foc-5-Ma*, plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g de suelo) y *M. artiellia* (1.000 J2/planta); *Ma*, plantas inoculadas con *M. artiellia* (1.000 J2/planta). Líneas: CA336.14.3.3.0 e ICC14216K.

Expresión génica:

Alta, >2	
1.51-2.00	
1.01-1.51	
0.51-0.99	
0.01-0.50	
Muy baja, 0.00	

3.3.4.2.- Estudio de la interacción en fases avanzadas (35-40 DAI)

A grandes rasgos, en el estudio de fases más avanzadas de la interacción (35-40 DAI), ambas líneas mostraron un patrón de expresión génica relativamente similar en respuesta a las inoculaciones, aunque dicho patrón varió según que la inoculación con *Foc-5* y *M. artiellia* fuera individual o conjunta (Fig. 3.20; Tabla 3.4). En plantas de 'CA336.14.3.0' inoculadas de forma individual se apreció un incremento de expresión de los genes más iniciales de la ruta fenilpropanoide (PAL, C4H y CHS), si bien éste fue sólo significativo (comparación de las expresiones dos a dos, Fig. 3.20) en el caso de los dos últimos; y una disminución de la expresión en algunos de los genes estudiados (CHI, IFR, la probable glucosiltransferasa y Cyp81D9), en la respuesta a *Foc-5*, y de los genes de la probable glucosiltransferasa y Cyp81D9, en la respuesta a *M. artiellia* (Fig. 3.20; Tabla 3.4). A su vez, las plantas de 'ICC14216K' inoculadas con uno u otro patógeno mostraron, en relación con el control, inducción y represión de también dos grupos de genes, igualmente con algunas excepciones. Así, dentro de los genes reprimidos, PAL, IFR, la probable glucosiltransferasa y Cyp81D9 vieron alterada su expresión con la inoculación de *Foc-5*, mientras que la inoculación con *M. artiellia* disminuyó la expresión de los genes CHI, I2'H, IFR, y Cyp81D9; mientras que el único gen inducido por la inoculación de ambos patógenos separadamente fue CHS (Fig. 3.20; Tabla 3.4). A señalar que la mayor parte de los integrantes del grupo de genes reprimidos (en concreto, CHI, I2'H, IFR y Cyp81D9) también presentó esa misma respuesta en los estudios a 4DAI, si bien en este caso la regulación negativa sólo se evidenció en plantas de la línea CA336.14.3.0 inoculadas con *M. artiellia* (Tabla 3.3). Por lo que respecta al efecto de la inoculación doble con ambos patógenos, ésta solo produjo la disminución de la expresión del gen de la probable glucosiltransferasa en CA336.14.3.0 y la de los genes PAL y C4H en ICC14216K (Fig. 3.20; Tabla 3.4). La expresión radical de algunos de los genes estudiados fue, en este periodo temporal, sensiblemente diferente en las plantas control de ambas líneas. En concreto, en relación con la línea CA336.14.3.0 (tomada como referencia a la hora de determinar los valores relativos de expresión que se indican en la Tabla 3.4), la línea ICC14216K mostró niveles superiores de expresión de los genes PAL (4,01x) y C4H (1,83x), e inferiores de los genes I2'H (0,57x) y de la probable glucosiltransferasa (0,47x), mientras que los restantes genes (CHS, CHI, IFR y Cyp81D9) se expresaron en cuantía similar (rango 1,00-1,17x).

Tabla 3.4.- Perfiles de expresión en nódulos-raíces de garbanzo de genes relacionados con la ruta fenilpropanoide a los 35-40 DAI^a.

Ref GenBank	Gen	FASES AVANZADAS DE LA INTERACCIÓN (35-40 DAI)							
		CA336.14.3.3.0				ICC14216K			
		Control	<i>Foc-5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>	Control	<i>Foc-5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>
AJ250836	Fenilalanina amoniaco liasa	1.00	1.87	1.20	1.59	4.01	1.13	0.53	2.28
AJ007449	Trans-cinamato 4-monoxigenasa	1.00	2.86	1.07	2.97	1.83	2.48	0.52	1.83
AJ012690	Chalcona sintasa	1.00	4.95	1.86	4.48	1	6.76	0.81	5.38
AB024988	Chalcona isomerasa	1.00	0.25	1.29	0.44	1.10	0.54	0.94	0.34
AJ012581	Isoflavona 2'-hidroxilasa-Cyp81E3	1.00	0.50	0.69	0.95	0.57	0.39	0.58	0.32
X60755	NADPH: Isoflavona reductasa	1.00	0.37	1.82	0.87	1.17	0.53	0.63	0.45
AJ400859	Probable glucosiltransferasa	1.00	0.25	0.27	0.30	0.47	0.16	0.29	0.29
AJ249802	Cyp81D9	1.00	0.11	1.17	0.21	1.01	0.16	1.31	0.18

^a La expresión de los genes seleccionados fue cuantificada mediante RT-PCR a tiempo real y los resultados se expresan como valores relativos a los de las plantas control del genotipo CA336.14.3.0, siendo promedio de cuatro repeticiones biológicas. Para una mejor visualización de los resultados, se han sombreado éstos con una graduación de colores de acuerdo con los valores relativos de expresión. Tratamientos: Control, secciones de raíces de plantas no inoculadas; *Foc-5*, secciones de raíces de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g suelo); *Foc-5-Ma*, nódulos de raíces de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g suelo) y *M. artiellia* (20 huevos-J2/cm³ suelo); *Ma*, nódulos de raíces de plantas inoculadas con *M. artiellia* (20 huevos-J2/cm³ suelo). Líneas: CA336.14.3.3.0 e ICC14216K.

Expresión génica:

Alta, >2	
1.51-2.00	
1.01-1.51	
0.51-0.99	
0.01-0.50	
Muy baja, 0.00	

Se realizó un análisis de agrupación jerárquica en base al cuadrado de la distancia euclídea entre las diferentes variables (tratamientos en nuestro caso), mediante el módulo de agrupamiento jerárquico del programa NIA Array Analysis. En ambas líneas de garbanzo, los tratamientos estudiados se agruparon de forma idéntica, separándose claramente en dos grupos: a) control sin inocular y plantas inoculadas simultáneamente con ambos patógenos; y b) plantas inoculadas individualmente con el hongo o el nematodo (Fig. 3.13).

Los genes estudiados con diferencias significativas de expresión se pudieron englobar en un único componente principal (explicando un 87 % de la variabilidad acumulada) en 'CA336.14.3.0' (Fig. 3.14) y en dos componentes principales (explicando ambos un 96 % de la variabilidad acumulada) en 'ICC14216K' (Fig. 3.15). La distribución de los tratamientos en el espacio determinado por los componentes principales mostró, en la línea CA336.14.3.0, cierta

asociación de las respuestas a las inoculaciones individuales con *M. artiellia* y con *Foc-5*, (Fig. 3.14). Sin embargo, en 'ICC14216K', las respuestas a las diferentes inoculaciones con patógenos se distribuyeron uniformemente por todo el espacio factorial (Fig. 3.15). Algunos genes mostraron expresiones similares en ambas líneas (Figuras 3.16 y 3.18), como principalmente ocurrió con los genes iniciales de la ruta C4H y CHS, que se indujeron significativamente en las plantas inoculadas con *Foc-5* y *M. artiellia* separadamente, y su comportamiento estuvo asociado a la correlación negativa del componente principal 1. La correlación positiva del componente principal 1 estuvo asociada a genes cuya expresión disminuyó en respuesta a la inoculación individual con *Foc-5* y/o con *M. artiellia* (Fig. 3.16), incluyendo a los genes IFR, CHI, Cyp81D9 y la probable glucosiltransferasa en 'CA336.14.3.0' y a CHI, Cyp81D9 e I2'H en 'ICC14216K', con lo que dos de estos genes (CHI y Cyp81D9) mostraron un comportamiento similar en ambas líneas (Figs. 3.16 y 3.18). En la línea ICC14216K la correlación positiva con el componente principal dos, asociada a genes cuya expresión disminuyó en plantas inoculadas con *Foc-5* ó con ambos patógenos simultáneamente, solo incluyó al gen PAL (Fig. 3.18). Los genes PAL e I2'H en la línea CA336.14.3.0 e IFR y de la probable glucosiltransferasa no se asociaron a ningún componente principal ni presentaron diferencias significativas en su expresión. La comparación dos a dos de los tratamientos con los diferentes genes ha permitido determinar estadísticamente en qué tratamientos aumenta/disminuye (2X) la expresión respecto al control (Fig. 3.20).

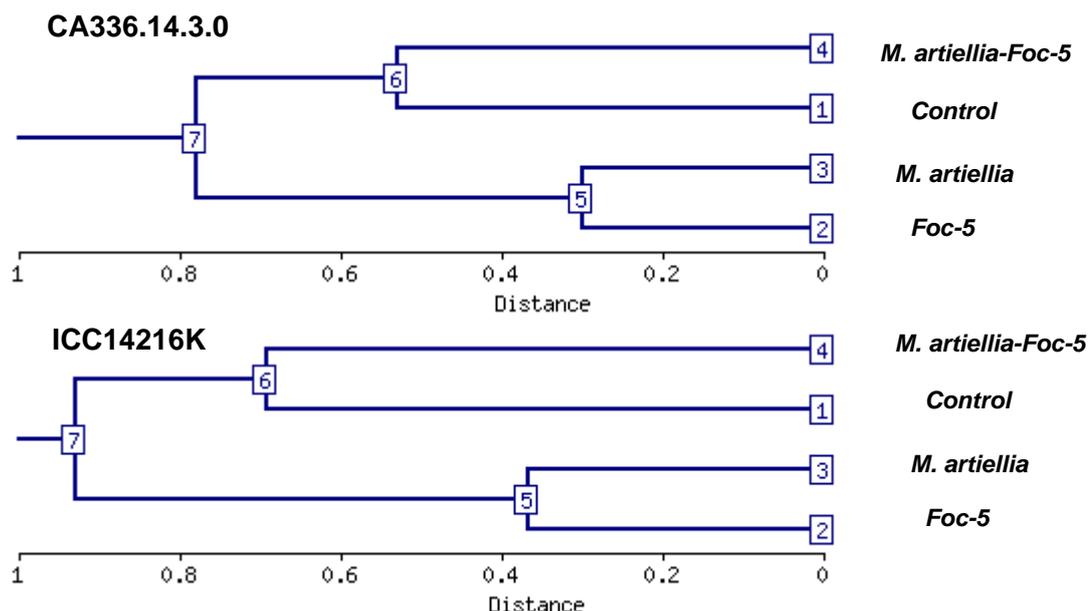


Figura 3.13.- Agrupación jerárquica de los tratamientos en fases avanzadas de la interacción *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*-garbanzo-*M. artiellia* (35-40 DA) en las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K, basada en la expresión de genes de la ruta fenilpropanoide. Tratamientos: Control, secciones de raíces de plantas no inoculadas; *Foc-5*, secciones de raíces de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g suelo); *Foc-5-Ma*, nódulos de raíces de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g suelo) y *M. artiellia* (20 huevos-J2/cm³ suelo); *Ma*, nódulos de raíces de plantas inoculadas con *M. artiellia* (20 huevos-J2/ cm³ suelo).

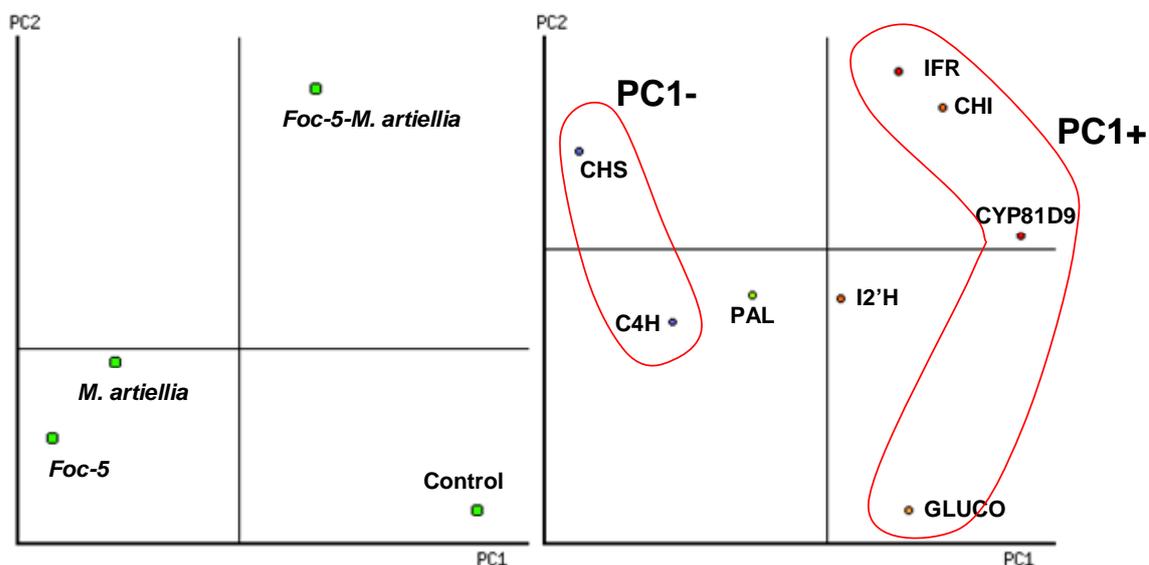


Figura 3.14.- Mapas bidimensionales, mostrando las asociaciones entre tratamientos y manchas electroforéticas, generados mediante el análisis de componentes principales (PCA), en la línea CA336.14.3.0. Tratamientos: Control, secciones de raíces de plantas no inoculadas; *Foc-5*, secciones de raíces de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g suelo); *Foc-5-Ma*, nódulos de raíces de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g suelo) y *M. artiellia* (20 huevos-J2/cm³ suelo); *Ma*, nódulos de raíces de plantas inoculadas con *M. artiellia* (20 huevos-J2/ cm³ suelo). Abreviaturas: CHI = chalcona isomerasa; IFR = isoflavona reductasa; GLUCO = probable glucosiltransferasa; CYP81D9 = citocromo P450 monooxigenasa; C4H = Trans-cinamato 4-monooxigenasa; CHS = chalcona sintasa; I2'H = isoflavona 2'-hidroxilasa; PAL = fenilalanina amoniaco liasa.

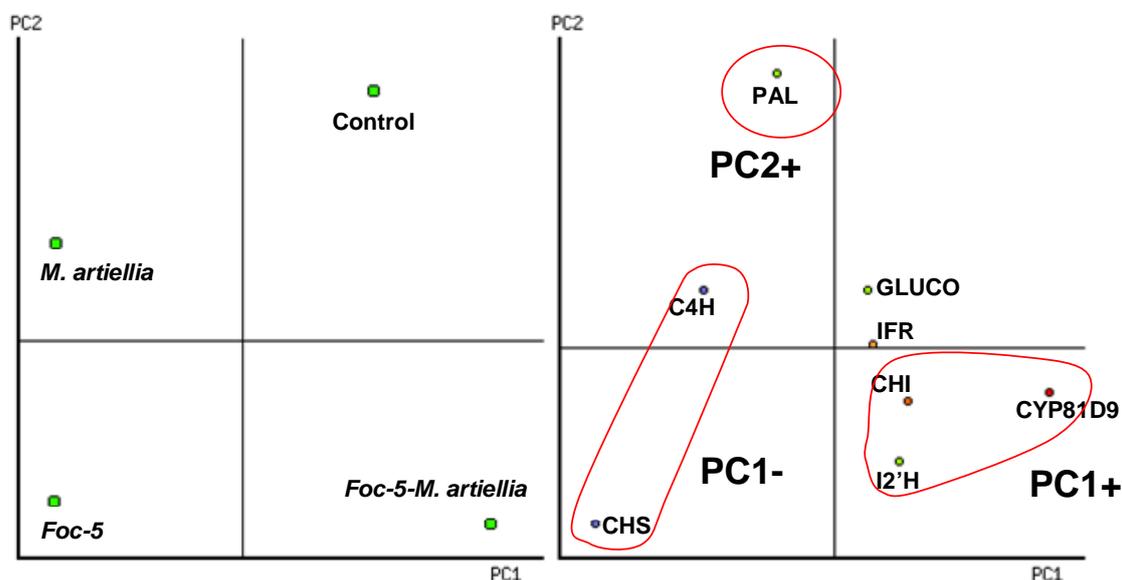


Figura 3.15.- Mapas bidimensionales, mostrando las asociaciones entre tratamientos y manchas electroforéticas, generados mediante el análisis de componentes principales (PCA), en la línea ICC14216K. Tratamientos: Control, secciones de raíces de plantas no inoculadas; *Foc-5*, secciones de raíces de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g suelo); *Foc-5-Ma*, nódulos de raíces de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g suelo) y *M. artiellia* (20 huevos-J2/cm³ suelo); *Ma*, nódulos de raíces de plantas inoculadas con *M. artiellia* (20 huevos-J2/cm³ suelo). Abreviaturas: CHI = chalcona isomerasa; IFR = isoflavona reductasa; GLUCO = probable glucosiltransferasa; CYP81D9 = citocromo P450 monoxigenasa; C4H = Trans-cinamato 4-monooxygenasa; CHS = chalcona sintasa; I2'H = isoflavona 2'-hidroxilasa; PAL = fenilalanina amoniaco liasa.

CA336.14.3.0

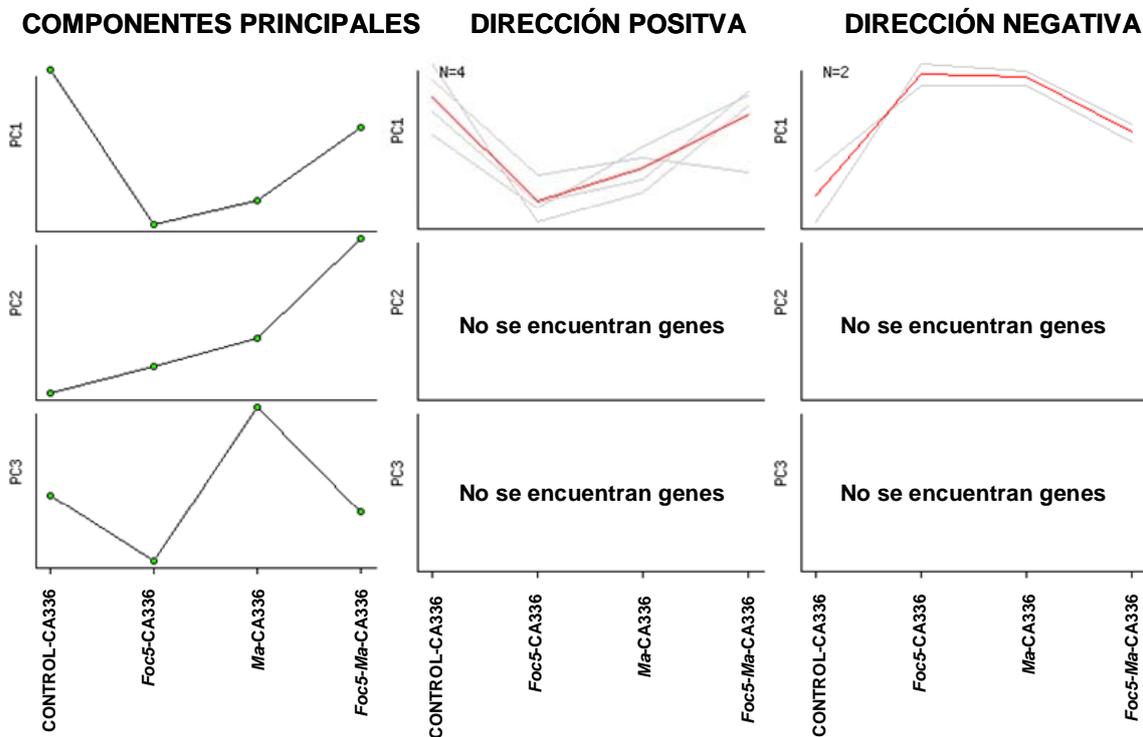


Figura 3.16.- Agrupaciones de genes en 'CA336.14.3.0', basadas en su expresión y determinadas mediante análisis de componentes principales (PCA). Para el componente principal 1 se han identificado dos agrupaciones de genes, que se correlacionan positiva y negativamente con dicho PC. Según el método descrito por Sharov *et al.*, (2005), el grado de cambio en la expresión de genes en un PC específico se ha determinado por la pendiente de la recta de regresión del *log* de los niveles de expresión *versus* el correspondiente autovector multiplicado por el rango de valores de éste. Si el cambio de expresión del gen supera el doble de su expresión, se considera asociado con el PC. Las agrupaciones de genes han sido realizadas secuencialmente, comenzando por el primer PC. No asociándose a sucesivos PCs genes ya agrupados en un PC previo. Los componentes principales se muestran en la izquierda y el número de genes agrupados se muestra en el extremo izquierdo de cada agrupación (N). Abreviaturas: PC, Componente principal; *Foc5*, *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* raza 5; *Ma*, *M. artiellia*.

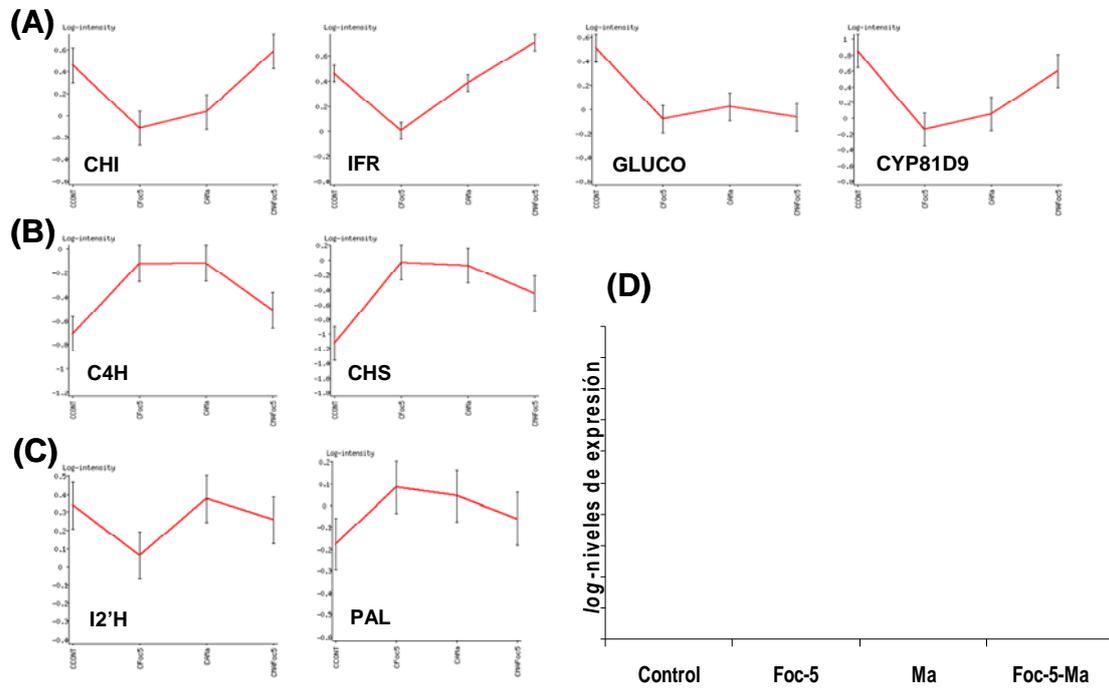


Figura 3.17.- Medias de los *log* de los niveles de expresión de los distintos genes, agrupados por su asociación a cada componente principal en la línea CA336.14.3.0. (A), Genes positivamente correlacionados con PC1; (B), Genes negativamente correlacionados con PC1; (C), Genes sin diferencias significativas de expresión y no correlacionados con ningún componente principal; (D), leyenda para las gráficas (A)-(C). Abreviaturas: CHI = chalcona isomerasa; IFR = isoflavona reductasa; GLUCO = probable glucosiltransferasa; CYP81D9 = citocromo P450 monooxigenasa; C4H = Trans-cinamato 4-monooxigenasa; CHS = chalcona sintasa; I2'H = isoflavona 2'-hidroxilasa; PAL = fenilalanina amoniaco liasa.

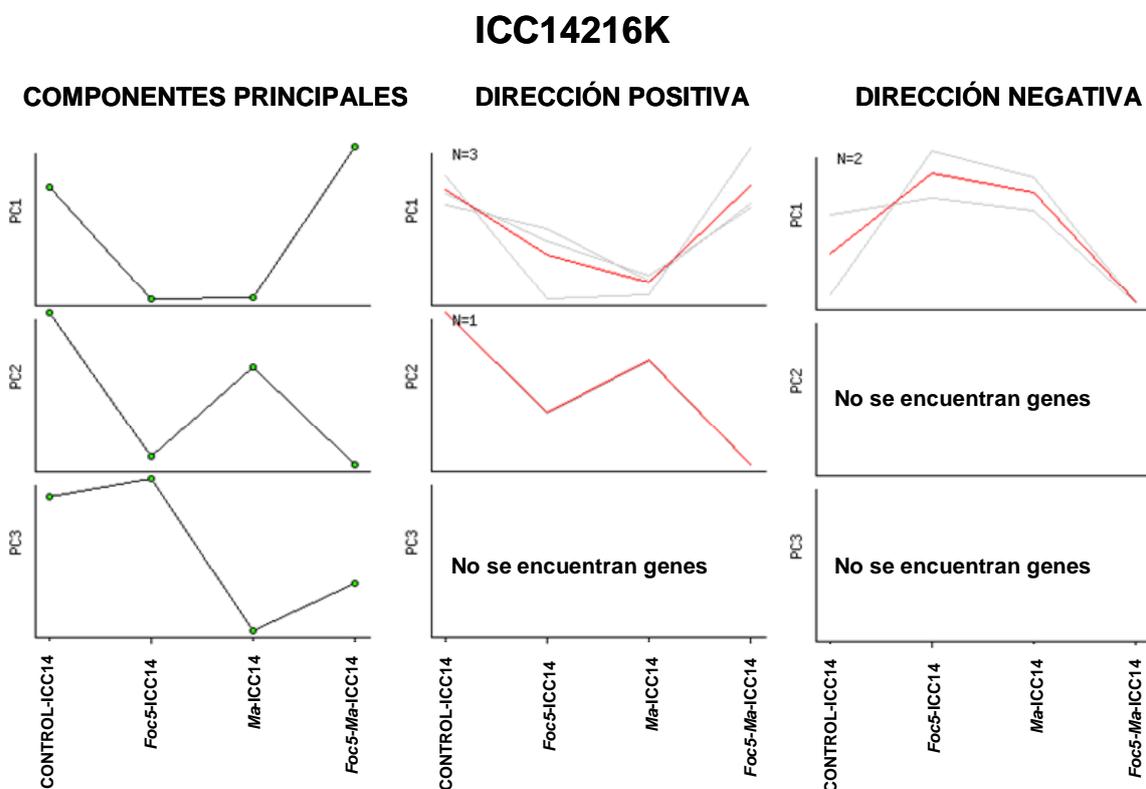


Figura 3.18.- Agrupaciones de genes en "ICC14216K", basadas en su expresión y determinadas mediante análisis de componentes principales (PCA). Para el componente principal 1 se han identificado dos agrupaciones de genes, que se correlacionan positiva y negativamente con dicho PC. Según el método descrito por Sharov *et al.*, (2005), el grado de cambio en la expresión de genes en un PC específico se ha determinado por la pendiente de la recta de regresión del *log* de los niveles de expresión *versus* el correspondiente autovector multiplicado por el rango de valores de éste. Si el cambio de expresión del gen supera el doble de su expresión, se considera asociado con el PC. Las agrupaciones de genes han sido realizadas secuencialmente, comenzando por el primer PC. No asociándose a sucesivos PCs genes ya agrupados en un PC previo. Los componentes principales se muestran en la izquierda y el número de genes agrupados se muestra en el extremo izquierdo de cada agrupación (N). Abreviaturas: PC, Componente principal; *Foc5*, *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* raza 5; *Ma*, *M. artiellia*.

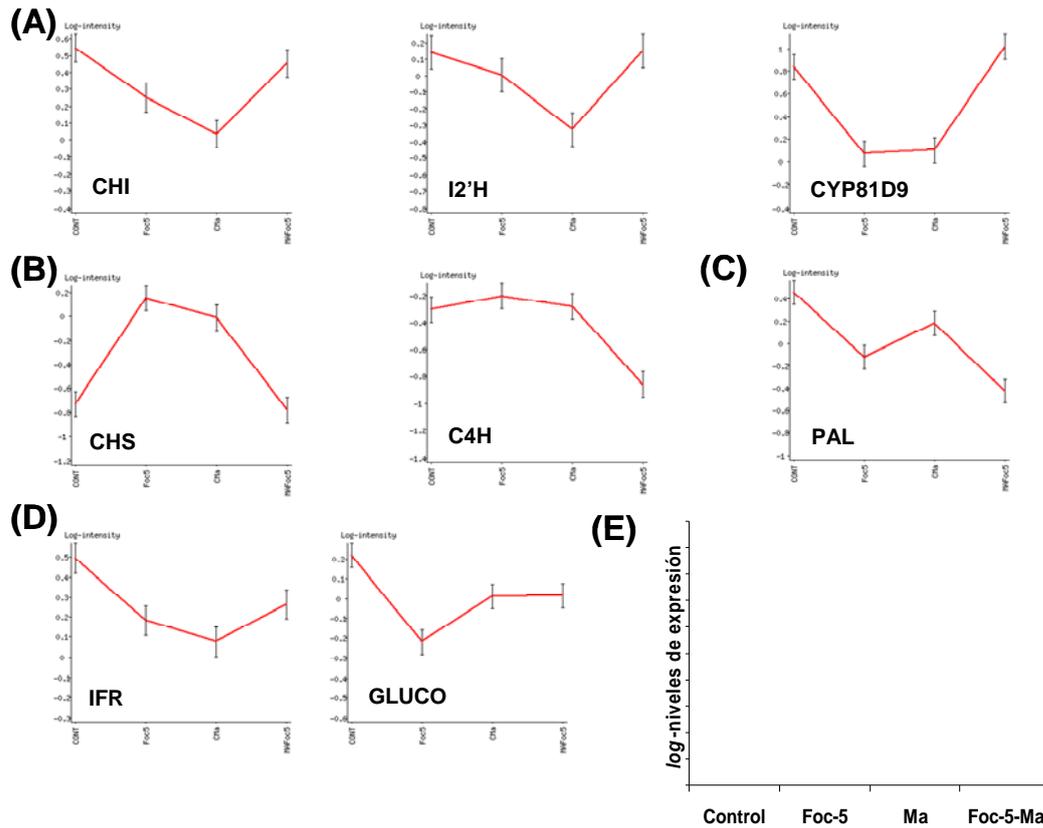


Figura 3.19.- Medias de los *log* de los niveles de expresión de los distintos genes, agrupados por su asociación a cada componente principal en la línea ICC14216K. (A), Genes positivamente correlacionados con PC1; (B), Genes negativamente correlacionados con PC1; (C), Genes sin diferencias significativas de expresión y no correlacionados con ningún componente principal; (D), leyenda para las gráficas (A)-(C). Abreviaturas: CHI = chalcona isomerasa; IFR = isoflavona reductasa; GLUCO = probable glucosiltransferasa; CYP81D9 = citocromo P450 monoxigenasa; C4H = Trans-cinamato 4-monooxygenasa; CHS = chalcona sintasa; I2'H = isoflavona 2'-hidroxilasa; PAL = fenilalanina amoniaco liasa.

Ref GenBank	GEN	Línea CA336.14.3.0			Línea ICC14216K		
		C vs F	C vs F + Ma	C vs Ma	C vs F	C vs F + Ma	C vs Ma
AJ250836	Fenilalanina amoniaco liasa						
AJ007449	Trans-cinamato 4-monoxigenasa						
AJ012690	Chalcona sintasa						
AB024988	Chalcona isomerasa						
AJ012581	Isoflavona 2'-hidroxilasa-Cyp81E3						
X60755	NADPH: Isoflavona reductasa						
AJ400859	Probable glucosiltransferasa						
AJ249802	Cyp81D9						

	MENOR expresión en el SEGUNDO tratamiento respecto al PRIMERO
	MAYOR expresión en el SEGUNDO tratamiento respecto al PRIMERO
	Variación no significativa entre ambos tratamientos

Figura 3.20.- Patrones de regulación de genes de la ruta fenilpropanoide en las líneas de CA336.14.3.0 e ICC14216K, basados en las comparaciones dos a dos de sus valores de expresión. Abreviaturas: C = Control; F = *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5; Ma = *M. artiellia*; F + Ma = ambos patógenos.

3.3.4.3.- Microdissección por láser

En el estudio de microdissección por láser, la expresión génica fue muy desigual entre plantas inoculadas y sin inocular con los patógenos. No se detectó ninguna pauta específica de expresión génica asociada a algún patógeno, como se observó en los experimentos anteriores. En ciertas muestras, como en los controles de ambas líneas y, también, en alguno de los tratamientos, no se detectó la presencia de transcritos de ciertos genes (Tabla 3.5), a pesar de que la cantidad de ARN amplificado aplicada en la retrotranscripción era suficiente para estudiar la expresión génica. Sin embargo, no se pudo verificar la integridad del ARN extraído mediante técnicas cromatográfica en chip con 2100 BioAnalyzer® (Agilent Technologies), como se ha realizado en otros estudios (Tang *et al.*, 2006), ni tampoco se correlacionó el ARN total obtenido con las áreas citoplasmáticas cortadas, al no poseer esta tecnología el equipo. Pese a la difícil interpretación de los resultados, entre los cambios más significativos observados podemos destacar el descenso acusado en la expresión de los genes PAL e I2'H en las plantas inoculadas con *Foc-5* y *M. artiellia*, tanto individual como conjuntamente, el incremento de expresión de la mayoría de los restantes genes estudiados en las plantas inoculadas con *Foc-5*, tanto de forma aislada como en combinación con *M. artiellia*, y la represión de la práctica totalidad de estos genes en las plantas inoculadas con *M. artiellia* de la línea ICC14216K (Tabla 3.5).

En el experimento con la microdissección por láser, las diferencias constitutivas fueron difíciles de determinar, al no haber amplificaciones en muchos de los genes estudiados (véase Tabla 3.5).

Tabla 3.5.- Perfiles de expresión de genes relacionados con la ruta fenilpropanoide en secciones de nódulos, cortados mediante la técnica de microdissección de células por láser, a los 35-40 DAI^a.

Ref GenBank	Gen	LCM							
		CA336.14.3.3.0				ICC14216K			
		Control	<i>Foc-5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>	Control	<i>Foc-5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>
AJ250836	Fenilalanina amonio liasa	1.00	0.02	0.14	0.00	0.00	0.09	0.01	0.00
AJ007449	Trans-cinnamato 4-monooxigenasa	- ^b	6.26	27.20	0.04	1.00	16.24	4.33	0.04
AJ012690	Chalcona sintasa	- ^b	1.00	0.27	- ^b	- ^b	0.48	0.10	0.00
AB024988	Chalcona isomerasa	- ^b	95.91	142.05	1.11	1.00	15.90	9.25	2.30
AJ012581	Isoflavona 2'-hidroxilasa-Cyp81E3	1.00	0.00	0.00	0.00	0.59	0.00	0.00	0.00
X60755	NADPH: Isoflavona reductasa	- ^b	78.35	170.16	1.75	1.00	20.08	18.68	0.43
AJ400859	Probable glucosiltransferasa	- ^b	1.00	- ^b	1.56	- ^b	2.99	- ^b	0.22
AJ249802	Cyp81D9	1.00	39.86	0.00	58.74	- ^b	6.20	1.19	0.01

^a La expresión de los genes seleccionados fue cuantificada mediante RT-PCR a tiempo real y los resultados se expresan como valores relativos al de un tratamiento tomado como referencia (expresión 1,00), que no pudo ser el mismo en todos los casos al no haber transcritos (-) en algunos de los controles. Para una mejor visualización de los resultados, se han sombreado éstos con una graduación de colores de acuerdo con los valores relativos de expresión. Tratamientos: Control, células parenquimáticas del córtex de raíces de plantas no inoculadas; *Foc-5*, células parenquimáticas del córtex de raíces de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g suelo); *Foc-5-Ma*, células gigantes de nódulos de raíces de plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g suelo) y *M. artiellia* (20 huevos-J2/cm³ suelo); *Ma*, nódulos de raíces de plantas inoculadas con *M. artiellia* (20 huevos-J2/cm³ suelo). Líneas: CA336.14.3.3.0 y ICC14216K.

^b:no ha presentado amplicón.

Expresión génica:

Alta, >2	Red
1.51-2.00	Orange
1.01-1.51	Yellow
0.51-0.99	Light Blue
0.01-0.50	Blue
Muy baja, 0.00	Dark Blue

3.3.5.- NIVELES DE EXPRESIÓN DE OTROS GENES CON POSIBLE RELACIÓN CON LA PATOGÉNESIS

Como los estudios de proteómica habían indicado que en las fases avanzadas de la interacción (nódulos de 35-40 DAI) se producía una acumulación significativa de dos enzimas típicamente defensivas como quitinasa y catalasa, se decidió incluir en el estudio de expresión génica la de sendos genes de garbanzo relacionados con estas enzimas. El trabajo se realizó con el doble objetivo de poder evidenciar, por un lado, si los cambios previamente observados implicaban un proceso de inducción transcripcional y, por el otro, si tal proceso tenía ya lugar en

fases más tempranas de la interacción (2-4 DAI), cuando los estudios de proteómica no habían revelado la producción de cambios en los contenidos de estas proteínas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.6.

En las fases iniciales de la interacción, a 2 DAI no se apreciaron cambios cuantitativamente significativos de expresión de los dos genes estudiados por efecto de alguno de los tratamientos, mientras que a 4 DAI sí se registraron ciertos cambios aunque fundamentalmente restringidos a la línea 'CA336.14.3.0' que, en este sentido, mostró un comportamiento diferencial respecto a la 'ICC14216K'. Así a 4 DAI, en 'CA336.14.3.0' se indujo, respecto al control a ese tiempo, la expresión del gen de la quitinasa clase I en respuesta a la inoculación simple con *Foc-5* (3,6x) y a la doble con ambos patógenos (4,2x), y la del gen de la catalasa en respuesta a la inoculación con *Foc-5* (2,4x), mientras que ambos genes resultaron reprimidos en la inoculación simple con *M. artiellia* (valores de 0,2x y 0,4x, respectivamente) (Tabla 3.6-A). En contraste, la única respuesta cuantitativamente significativa mostrada por la línea ICC14216K fue la inducción de la catalasa en las plantas inoculadas con *Foc-5* (2,1x) (Tabla 3.6-A)

En fases avanzadas de la interacción (35-40 DAI), los resultados de las muestras de nódulos/raíces fueron bastante discordantes, según provinieran aquéllas de disección manual (Tabla 3.6-B) o de microdisección por láser (Tabla 3.6-C). En el primer caso, las variaciones de expresión génica cuantitativamente más importantes fueron, por lo que a la línea CA336.14.3.0 se refiere, la inducción de la quitinasa de clase I en respuesta a la doble inoculación (3,2x) y la represión de la catalasa en las inoculaciones simples con *Foc-5* (0,4x) y *M. artiellia* (0,4x), mientras que, en la línea ICC14216K, la represión del gen de la quitinasa clase I en respuesta a la inoculación simple con *M. artiellia* (0,3x), fue la única variación cuantitativamente significativa experimentada por las plantas inoculadas respecto al control sin inocular (Tabla 3.6-B). Por el contrario, ambos genes resultaron inducidos por la totalidad de los tratamientos en las muestras microdiseccionadas de la línea CA336.14.3.0. En este caso, no se apreció expresión de la quitinasa clase I en el control, mostrando dicho gen altos niveles de expresión en las muestras inoculadas con *Foc-5*, bien de manera individual (15,6x el nivel de expresión en el control de la línea ICC14216K) o conjuntamente con *M. artiellia* (87,7x el nivel de expresión en el control de la línea ICC14216K), y bastante más bajos en la muestra inoculada con *M. artiellia* (0,5x el nivel de expresión en el control de la línea ICC14216K), mientras que la catalasa, que sí se expresó en el control, resultó inducida en cuantía relativamente similar (rango de 3,9-5,7x) en respuesta a las tres inoculaciones (Tabla 3.6-C). Respecto a las muestras microdiseccionadas de la línea ICC14216K, la quitinasa clase I se indujo en respuesta a la inoculación simple con *Foc-5* (19,2x)

y la doble con *Foc-5* y *M. artiellia* (4,5x) y fue reprimida de forma completa (ausencia de amplicón) en la inoculación simple con *M. artiellia*, y la catalasa resultó inducida y reprimida, respectivamente, en las inoculaciones simples con *M. artiellia* (3,6x) y con *Foc-5* (0,4x) y su expresión no se modificó de forma significativa, respecto al control, en la inoculación doble con ambos patógenos (Tabla 3.6-C).

En líneas generales, la heterogeneidad de los resultados de expresión de ambos genes (quitinasa clase I y catalasa) en las distintas muestras hace muy difícil cualquier intento de conclusión sobre la existencia de patrones de expresión asociados a las inoculaciones y periodos temporales estudiados.

Tabla 3.6.- Perfiles de expresión de los genes quitinasa clase I y catalasa en muestras de raíces/nódulos obtenidas: A) a los 2 y 4 DAI; B) 35-40 DAI; C) 35-40 DAI- Microdissección por láser.^a

A)		2 DAI								4 DAI							
Ref GenBank	Gen	CA336.14.3.3.0				ICC14216K				CA336.14.3.3.0				ICC14216K			
		Control	<i>Foc-5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>	Control	<i>Foc-5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>	Control	<i>Foc-5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>	Control	<i>Foc-5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>
AJ012821	Quitinasa clase I	1.00	0.78	1.22	0.92	1.08	1.44	1.85	1.12	0.49	1.78	2.04	0.09	1.21	2.34	0.86	1.07
AJ131046	Catalasa	1.00	0.58	1.67	0.72	0.95	0.60	0.52	0.96	0.86	2.07	1.00	0.32	0.67	1.44	1.18	0.51

B)		FASES AVANZADAS DE LA INTERACCIÓN (35-40 DAI)							
Ref GenBank	Gen	CA336.14.3.3.0				ICC14216K			
		Control	<i>Foc-5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>	Control	<i>Foc-5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>
AJ012821	Quitinasa clase I	1.00	0.74	3.17	1.22	0.58	0.35	0.83	0.15
AJ131046	Catalasa	1.00	0.43	0.66	0.41	0.67	0.39	1.14	0.40 ^b

C)		LCM							
Ref GenBank	Gen	CA336.14.3.3.0				ICC14216K			
		Control	<i>Foc-5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>	Control	<i>Foc-5</i>	<i>Foc5-Ma</i>	<i>Ma</i>
AJ012821	Quitinasa clase I	- ^c	15.58	87.68	0.47	1.00	19.23	4.51	- ^c
AJ131046	Catalasa	1.00	5.71	3.87	4.95	2.02	0.88	2.33	7.31

^aLa expresión de los genes seleccionados fue cuantificada mediante RT-PCR a tiempo real y los resultados se expresan como valores relativos respecto a una referencia a la que se asigna un valor unitario de expresión. Para una mejor visualización de los resultados, se han sombreado éstos con una graduación de colores de acuerdo con los valores relativos de expresión. Tratamientos: Control, plantas no inoculadas; *Foc-5*, plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g suelo); *Foc-5-Ma*, plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5 (30.000 clamidosporas/g suelo) y *M. artiellia* (1000 J2/planta en 2-4 DAI y 20 huevos-J2/cm³ suelo en 35-40 DAI); *Ma*, plantas inoculadas con *M. artiellia* (1.000 J2/planta en 2-4 DAI y 20 huevos-J2/cm³ suelo en 35-40 DAI). Líneas: CA336.14.3.3.0 y ICC14216K.

^b Tratamientos significativos al comparar el control de la línea respecto a este tratamiento mediante el test "Wilcoxon Rang Sum".

^cNo ha presentado amplicón.

Expresión génica::

Alta, >2	
1.51-2.00	
1.01-1.51	
0.51-0.99	
0.01-0.50	
Muy baja, 0.00	

3.4.- DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha estudiado la expresión de genes relacionados principalmente con la ruta fenilpropanoide en el patosistema *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* raza 5-garbanzo-*M. artiellia* en diferentes fases de la interacción. Asimismo, como excepción, se ha estudiado la expresión de dos genes presuntamente defensivos de garbanzo, por su posible relación con proteínas (quitinasa y catalasa) que los estudios proteómicos previos indicaron que resultaban modificadas por los tratamientos en fases avanzadas de la interacción (nódulos 35-40 DAI).

El estudio ha sido abordado en dos periodos temporales diferentes, correspondientes a fases iniciales (2 y 4 DAI) y más avanzada (35-40 DAI) de la interacción de la planta con los patógenos. El periodo inicial de la interacción comprende las etapas de penetración de los juveniles infectivos de *M. artiellia* a los 2 DAI y el inicio de la formación del sitio de alimentación a los 4 DAI. Teniendo en cuenta los datos de la literatura al respecto, este periodo de tiempo se ha considerado suficiente para la germinación de las clamidosporas de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, así como la colonización superficial y penetración de la raíz por el hongo. De hecho, experimentos con un aislado de la misma raza de *Foc* que la aquí utilizada (raza 5) permitieron aislar el hongo de las raíces de plantas susceptibles y resistentes de garbanzo a las 48 horas posteriores a la inoculación (Basallote-Ureba, 1987). Los estudios a los 35-40 DAI se circunscribieron a los nódulos originados por la infección de *M. artiellia*, ó muestras de raíces de edad y posición similar de las plantas inoculadas solamente con el hongo ó los controles sin inocular.

El muestreo ha estado influenciado por la dificultad de obtención de material vegetal y de localización de los patógenos en la planta. En garbanzo, la penetración del hongo es principalmente a través de los cotiledones y de las zonas del hipocotilo y epicotilo subterráneo próximas a ellos, ocurriendo en menor proporción en zonas de la raíz principal, excepto en el ápice radical (Basallote-Ureba, 1987). Sin embargo, la zona cotiledonar preferente para el hongo no coincide específicamente con la de penetración de los juveniles infectivos del nematodo, ni tampoco con la de formación de sus sitios permanentes de alimentación, que es la zona de diferenciación de los tejidos en la raíz, cerca del ápice radical (Vanholme *et al.*, 2004; Karssen y Moens, 2006). Por este motivo, en las fases iniciales de la interacción se estudió toda la raíz de la plántula y no la parte más cercana a los cotiledones.

a) *Extracción de ARN*

La extracción de ARN total de los tejidos jóvenes no presentó ningún problema, al ser éstos, presumiblemente, tejidos muy activos y con pocas sustancias interferentes. Los diversos kits y tipos de extracción ensayados determinaron como más efectivo al RNeasy Plant Mini kit, desarrollado por Qiagen, con el cual se obtuvieron los mayores rendimientos así como los mejores parámetros de calidad. La observación de tres bandas de ARN puede deberse a la extracción, con nuestro método, de ARN ribosómico mitocondrial, ya que previamente en extractos de ARN total de raíces de garbanzo, obtenidos mediante fenol equilibrado: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1, v / v / v), sólo se habían observado dos bandas (García-Limones, 2003). Esta tercera banda no estuvo influenciada por la biomasa del patógeno/s presente en nuestro tejido, debido a que también se apreció en proporciones similares en los tejidos control sin inocular de todos los tratamientos a 2 y 4 DAI. La extracción de tejidos de mayor edad (35-40 DAI) resultó siempre en menor cantidad y calidad del ARN, probablemente debido a la menor actividad metabólica y la superior acumulación de compuestos interferentes, como polisacáridos y compuestos fenólicos, en tales tejidos. La dificultad de obtención y manipulación de estas muestras (nódulos y secciones de raíces a los 35-40 DAI) nos llevó a la utilización de RNAlater (Ambion) de cara a estabilizar el ARN total extraído y hacer más cómodo el proceso de extracción. Las diversas alternativas ensayadas para mejorar la calidad del ARN (ver materiales y métodos, apartado 3.3.6.4) no supusieron ninguna mejora en este parámetro y/o produjeron disminuciones excesivas de ARN. Como se ha explicado en el apartado de materiales y métodos de este capítulo, con estas muestras, dado el bajo rendimiento de ARN total obtenido, no se pudo determinar su calidad y cantidad relativa mediante electroforesis en gel.

b) *Genes estudiados*

Los diferentes genes estudiados han sido elegidos teniendo en cuenta su posible función defensiva y la disponibilidad de secuencias en la base de datos de garbanzo. Especial atención se prestó a la ruta fenilpropanoide, por ser la responsable de la biosíntesis de las fitoalexinas de garbanzo, medicarpina y maackiaina. En concreto, ocho de los diez genes de interés se seleccionaron en relación con dicha ruta. Es el caso de los genes PAL (AJ250836), C4H (AJ007449), CHI (AB024988), CHS (AJ012690), I2'H (AJ012581), IFR (X60755), Cyp81D9 (AJ249802) y el de la probable glucosiltransferasa (AJ400859). Funcionalmente, la implicación en la ruta fenilpropanoide de los seis primeros genes es clara, ya que todos ellos codifican

enzimas que ocupan posiciones clave en dicha ruta (Fig. 3.12); la de Cyp81D9 puede justificarse por la amplia presencia que las citocromo P450-monooxigenasas tienen en la referida ruta fenilpropanoide, donde al menos once reacciones (entre ellas las de C4H e I2'H) son dependientes de este tipo de actividad (Overkamp *et al.*, 2000), mientras que resulta más cuestionable en el caso de la glucosiltransferasa. Este gen se seleccionó por ser el único codificante de un enzima transferidor de azúcares presente en la base de datos de garbanzo, aunque no existe evidencia de su participación en la formación de derivados glucosilados de fitoalexinas de cara a su almacenamiento en vacuolas. La comparación con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI dan para este gen una cierta homología con una "celulose synthase-like C8" (NM 1280024) de *Arabidopsis thaliana* (la secuencia de cobertura es el 66% de la secuencia y la homología en este tramo es del 76%) lo que, unido al tipo de estudio en el que se caracterizó (desarrollo de plántulas etioladas de garbanzo), apunta a un posible papel en la formación de la pared celular. A pesar de esto, se consideró interesante su inclusión en nuestro estudio, dada la relevancia que los sucesos a nivel de pared celular pueden tener en la respuesta defensiva a la Fusariosis Vascular.

Los dos genes de interés restantes, el de la quitinasa clase I (AJ012821) y la catalasa (AJ131046), se seleccionaron por su reconocido carácter de genes relacionados con la defensa en garbanzo frente a la Fusariosis Vascular (Cachinero *et al.*, 2002; García-Limones *et al.*, 2002) y haberse evidenciado, en los experimentos de proteómica a los 35-40 DAI (Capítulo II), que los mismos podrían estar sometidos a regulación en nuestro sistema.

Se seleccionaron tres genes de control interno (g3pdh, ITS 1 y 2 del ARNr 5,8S y β -tubulina), que habían sido utilizados en anteriores estudios en nuestro laboratorio sobre la interacción garbanzo-*F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (García-Limones, 2003; García-Limones *et al.*, 2009). La normalización de las Ct se realizó mediante un índice de genes de referencia (Vandesompele *et al.*, 2002), que utiliza la suma geométrica de las cantidades relativas de cada uno de ellos, lo que permite una normalización más robusta entre diferentes muestras. Se compararon los genes de referencia utilizando, para cada uno de ellos, los otros como normalizadores, obteniéndose valores de expresión similares entre tratamientos. La utilización de tres genes de referencia, en vez de uno solo, se ha efectuado en diferentes estudios (Udvardi *et al.*, 2008; Snowden *et al.*, 2005; Jacobs *et al.*, 2003), proporcionando buenos resultados.

La mayoría de las actividades relacionadas con los genes objeto de estudio en el presente trabajo resultan reguladas en plantas por varios genes o por familias génicas, más que por genes únicos. Aunque la amplitud de esta multiplicidad no es bien conocida en garbanzo, se sabe por

ejemplo la presencia de al menos cuatro CHSs en el genoma de *Arabidosis* y 26 en el de arroz (Pfaff y Kahl, 2003). En el caso de garbanzo, se han descrito dos loci CHS (AJ012690, el incluido en nuestro estudio, y AJ012822), ambos codificantes de una misma secuencia polipeptídica. Lo anterior, relativiza cualquier conclusión que pretenda relacionar niveles de expresión de genes individuales con la posible manifestación de una actividad determinada sometida a regulación por un conjunto redundante de genes.

c) *Expresión génica de la ruta fenilpropanoide*

De la débil tendencia constatada, de una mayor expresión, en algunos de los genes estudiados a los 2 DAI en la línea ICC14216K respecto a la CA336.14.3.0, tanto a un nivel constitutivo como en la respuesta a la inoculación con los patógenos, no podría concluirse que ambas líneas se diferencien en su comportamiento a este corto tiempo de interacción. La mayoría de las diferencias de expresión no resultaron significativas (a excepción del gen *Cyp81D9* en ICC14216K) en los términos en que se han planteado (2x en aumentos ó 0,5x en represiones). En el caso de la inoculación con *Foc-5*, esta débil respuesta temprana podría deberse a una relativamente lenta colonización de la raíz de garbanzo por el hongo, en contraste con otros patosistemas de marchiteces vasculares, como en la resistencia de especies de *Gossypium* frente a *V. dahliae*, (Bell, 1994) ó de palmera datilera (*Phoenix dactylifera* L.) a *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* (El Modafar *et al.*, 2006), donde sí se han observado respuestas tempranas relacionadas con la activación de la ruta fenilpropanoide. Tampoco la migración intercelular de juveniles de *M. artiellia* en este periodo de tiempo (2 DAI) produjo alguna alteración de la expresión de estos genes, observándose un resultado similar en la penetración de juveniles de *M. incognita* en soja (Edens *et al.*, 1995). La falta de respuesta podría también en este caso ser debida a una localización muy restringida de la misma a la zona preferencial de penetración de los nematodos noduladores, esto es el ápice de la raíz. La coinfección de la planta simultáneamente con ambos patógenos podría dar lugar a una mezcla de respuestas diferencialmente localizadas, que en general, y pese a la falta de diferencias significativas entre tratamientos, resultó más similar a la respuesta a *Foc-5* que a *M. artiellia*. Esta tendencia, especialmente patente en la línea ICC14216K, probablemente indique una mayor superficie de colonización, con lo que la respuesta al hongo predomina o resulta analíticamente más perceptible que la respuesta a *M. artiellia*.

La similitud de las respuestas a la inoculación con *Foc-5*, tanto de forma individual como conjuntamente con *M. artiellia*, quedó bien patente en los resultados a 4 DAI, donde pudieron

apreciarse inducciones bastante consistentes de varios de los genes de la ruta fenilpropanoide estudiados (PAL, C4H, CHS e IFR). En este caso, ambas líneas mostraron de forma acusada dicha tendencia, siendo incluso la línea CA336.14.3.0 la que exhibió una mayor amplitud o intensidad de respuesta (Tabla 3.3). Admitiendo que las anteriores respuestas son reacciones de defensa de la planta inducidas por *Foc-5*, el similar comportamiento de ambas líneas resulta coherente con el carácter de resistencia completa que ambas presentan frente al hongo (Castillo *et al.*, 2003), pudiéndose desde esta evidencia incluso postular un posible papel de la inducción de estos genes en la reacción de resistencia. Por el contrario, dicha inducción parece no tener relación con la estabilidad de la resistencia a la fusariosis vascular tras la coinfección con *Foc-5* y *M. artiellia*, lo que podría considerarse un argumento en contra de su papel en la reacción de resistencia. Respecto al referido papel, los escasos antecedentes bibliográficos no son nada concluyentes. Cho y Muehlbauer (2004) encontraron que la inoculación de garbanzo con la raza 1 de *Foc* inducía la expresión de los genes PAL e I2'H en el periodo de 3 a 72 horas posteriores a la inoculación, si bien la respuesta fue similar en los cultivares WR-315 (resistente) y JG-62 (susceptible). Por otro lado, Arfaoui *et al.* (2007) evidenciaron que la inoculación de garbanzo con la raza 0 de *Foc* provocaba una inducción de genes de la ruta fenilpropanoide (PAL, CHS e IFR) que resultaba incrementada por la pre-inoculación con *Rhizobium* y se mostraba en mayor cuantía en una línea moderadamente resistente que en otra susceptible al patógeno.

El tratamiento con *M. artiellia* afectó sensiblemente a la línea CA336.14.3.0, con disminuciones importantes de la expresión de genes involucrados específicamente en la extensión flavonoide/isoflavonoide de la ruta fenilpropanoide y por tanto en la síntesis de fitoalexinas de garbanzo (genes CHI, I2'H, IFR y Cyp81D9), mientras que no produjo ningún efecto en ICC14216K. El significado de esta regulación diferencial no es claro, ya que, por un lado, no puede relacionarse con la respuesta de tolerancia al nematodo, al ser ambas líneas igualmente susceptibles, y, por otro, parece de difícil justificación que lo esté con la estabilidad de la resistencia a *Foc-5* tras la doble inoculación, aspecto este último en el que el comportamiento de ambas líneas sí fue diferente (pérdida de resistencia en CA336.14.3.0 y mantenimiento de la misma en ICC14216K). En efecto, si la represión, en este periodo temprano de la inoculación (4 DAI), efectuada por *M. artiellia* en CA336.14.3.0 pero no en ICC14216K, condiciona la pérdida de resistencia a *Foc-5*, uno habría esperado encontrar esa respuesta diferencial en las plantas de ambas líneas sometidas a la doble inoculación, cosa que no se produjo. Como única posible justificación de este último hecho (y por tanto a favor del mantenimiento de la hipótesis), estaría la aparente predominancia en la doble inoculación de la

respuesta a *Foc-5* sobre la de *M. artiellia* ó una respuesta localizada diferencial en la raíz, como ya se apuntó al discutir los resultados a 2 DAI.

Como se ha comentado precedentemente, en garbanzo, hay múltiples isoformas de los enzimas chalcona sintasa y chalcona reductasa, las cuales pueden ser inducidas diferencialmente en la elicitación de cultivos celulares (Bless, 1992), como se ha observado también en alfalfa (Gowri *et al.*, 1991; Junghans *et al.*, 1993). Las respuestas en algunos enzimas podrían estar condicionadas por la isoforma afectada por cada patógeno ó diferencias en la inducción de actividades enzimáticas, como se ha observado en suspensiones celulares elicidadas de tomate (Görlach *et al.*, 1995), alfalfa (Ni *et al.*, 1996) ó garbanzo (Barz y Mackenbrock, 1994).

En la respuesta observada anteriormente se constata la paradoja del papel del gen IFR respecto a la inoculación con los diferentes patógenos, en la que se detecta una inducción por *Foc-5* y en la inoculación de ambos patógenos, mientras que se produce una disminución de su expresión en la línea CA336.14.3.0 infectada por *M. artiellia* solamente. Una posible explicación para este aspecto podría ser la distinta penetración inicial de ambos patógenos ó una respuesta más localizada en las plantas inoculadas con *Ma* que podría ser enmascarada por una respuesta más contundente y generalizada de *Foc-5* entre los diferentes fondos genéticos de las líneas estudiadas. Sin embargo, la expresión del enzima IFR es incrementada levemente su expresión a las 72 horas en plantas de alfalfa infectadas por *M. incognita* (Potenza *et al.*, 2001). Los resultados correspondientes al periodo de 35-40 DAI mostraron sensibles diferencias con los obtenidos a 4 DAI. A grandes rasgos, las respuestas a las inoculaciones individuales, bien con *Foc-5* o con *M. artiellia*, se asemejaron bastante, mientras que las muestras correspondientes a la doble inoculación se asemejaron a los controles no inoculados (Tabla 3.4 y Fig. 3.20), siendo en general coincidente, a grandes rasgos, el comportamiento de ambas líneas. Las anteriores similitudes de respuestas entre tratamientos, que resultó corroborada por el análisis de éstos mediante agrupación jerárquica (Fig. 3.13), causan una cierta sorpresa si se tiene en cuenta la disparidad de las muestras utilizadas en los tratamientos de respuesta similar. Así, mientras en los tratamientos que incluían a *M. artiellia* (inoculación individual con el nematodo y conjunta con éste y con *Foc-5*) se hizo una toma de muestras de nódulos (por tanto enriquecida en células gigantes frente a las células radicales normales), en la inoculación individual con *Foc-5* y en el control la toma de muestras sólo fue, obviamente, de tejido radical normal. Parece, pues, evidente, que ninguna de las respuestas obtenidas a este tiempo puede asociarse de forma específica con el nematodo (o con el metabolismo especial de las células gigantes) o con el hongo, resultado éste último que contrasta con el de los estudios a periodos más cortos de la

interacción (especialmente a 4 DAI). Lo que sí apunta bastante analogía con los resultados de los estudios a tiempos inferiores, es en los genes que mostraron respuesta a los tratamientos y en la inclusión de éstos en dos grupos principales, uno sometido a regulación positiva, que engloba a actividades más previas de la ruta fenilpropanoide, y otro regulado negativamente, que engloba a actividades posteriores (Tabla 3.4 y Figs. 3.13, 3.15 y 3.20).

La disminución de la expresión génica a partir del gen CHS, como ocurre en la respuesta de la línea CA336.14.3.0 frente a la infección por *M. artiellia* a 4 DAI, probablemente esté mediada por los mismos mecanismos de represión de la expresión génica.

En la expresión constitutiva de los genes, PAL y C4H mostraron un nivel superior en la línea ICC14216K respecto a la línea CA336.14.3.0, mientras que en otros genes más cercanos a las fitoalexinas, como I2'H y el de la glucosiltransferasa, se observó una tasa de expresión inferior en la línea ICC14216K que en "CA336.14.3.0". La posible explicación de estos resultados no parece muy evidente, y probablemente sea debido a una mayor actividad metabólica de la línea ICC14216K en la que podría producirse una mayor cantidad de los diferentes productos intermediarios de la ruta felnilpropanoide.

Respecto al estudio a este mismo periodo de 35-40 DAI, pero utilizando para la toma de muestras la técnica de aislamiento de citoplasmas con microdiseción con láser, hubo una gran diferencia de expresión entre genes y tratamientos. Los resultados obtenidos mediante esta técnica deben de considerarse como muy preliminares, sin poderse obtener ninguna conclusión clara de los mismos más allá de aportar alguna evidencia sobre el potencial de aplicación de dicha técnica al campo de la investigación fitonematológica. La complejidad de la respuesta probablemente haya también estado influenciada por la edad de las plantas y la manipulación de las muestras, ya que todo su procesamiento se realizó en la Universidad de Murdock (Australia) durante el periodo de una estancia, con lo cual el material tuvo que soportar largos periodos de transporte, con posibles efectos perjudiciales pese a la utilización de RNAlater® (Ambion) como estabilizador frente a la degradación de ARN.

d) *Expresión génica de genes de quitinasa clase I y catalasa.*

No se ha observado ninguna respuesta en la expresión génica de la quitinasa clase I a los 2 DAI, registrándose solo una inducción en la línea CA336.14.3.0 en la inoculación simple con *Foc-5* y en la doble con ambos patógenos a los 4 DAI. No obstante, la inducción de la actividad quitinasa se ha asociado con la respuesta defensiva de garbanzo en las fases iniciales de la

interacción con *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* (Cachinero *et al.*, 2002; Saikia *et al.*, 2005), con máximos de actividad a 2 y 3 DAI. Sin embargo, esta respuesta es difícil enlazarla con la pérdida de resistencia en la inoculación doble de ambos patógenos. La fuerte disminución en las plantas de CA336.14.3.0 inoculadas con *M. artiellia* si que podría estar asociada a una peor respuesta defensiva a nematodos noduladores.

En periodos temporales posteriores (35-40 DAI), el aumento de la expresión se constata en plantas inoculadas por ambos patógenos en la línea CA336.14.3.0, observándose esta inducción en estudios con plantas de algodón susceptibles a la Fusariosis Vascular en periodos más iniciales de la interacción con *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Dowd *et al.*, 2004). Sin embargo, estos datos son completamente diferentes de los obtenidos mediante las técnicas proteómicas (capítulo II), en los que se observó un incremento significativo en los niveles de quitinasa clase I en todas las inoculaciones con patógenos, en la línea ICC14216K, aunque en muchos casos ambas técnicas no son coincidentes. La quitinasa básica (clase I) en tabaco ó en garbanzo, presenta una actividad antifúngica *in vitro* superior que las ácidas (clase II ó clase III) (Melchers *et al.*, 1993; Sela-Buurlage *et al.*, 1993; Vogelsang y Barz, 1993a, 1993b). La respuesta diferencial de este enzima en nuestras líneas de garbanzo a la infección por *M. artiellia* es difícil de explicar. Los resultados obtenidos en estudios de la actividad quitinasa con otros patosistemas son bastante discordantes; así, plantas de soja infectadas con *M. incognita* experimentaron un aumento lento de esta actividad, alcanzando su máximo a los 34 DAI, lo cual se correlacionó con el incremento de algunas isoformas en raíz de quitinasas ácidas (Qiu *et al.*, 1997), mientras que en la interacción de *Meloidogyne marylandi* Jepson y Golden, 1987 y *Festuca arundinacea* Schreb. se indujo sistémicamente la actividad quitinasa en hojas, pero no en las raíces (Roberts *et al.*, 1992). Las quitinasas han mostrado un efecto en la mortalidad de los huevos y en una eclosión prematura *in vitro* (Mercer *et al.*, 1992).

El enzima catalasa está involucrado en la destoxificación de H₂O₂. Altas concentraciones de H₂O₂ parecen favorecer el desarrollo dentro del huésped de algunos patógenos necrotrofos (Govrin y Levine, 2000). En este caso, las EROs que se producen durante la defensa de la planta, más que causar daño al patógeno, se relacionan positivamente con la patogénesis (Govrin y Levine, 2000; Mayer *et al.*, 2001). En garbanzo se ha constatado una asociación entre la inducción temprana de la actividad catalasa y niveles de esta proteína, y la resistencia a la Fusariosis Vascular; sin embargo, este incremento no se reflejó en el posterior estudio de expresión génica (García-Limones, 2003). El aumento de la expresión de la catalasa en la inoculación con *Foc-5* en ambas líneas a los 4 DAI podría, con los antecedentes descritos, relacionarse con la reacción de resistencia que muestran estas líneas a la fusariosis vascular. La

respuesta de la catalasa a *Foc-5*, en cualquier caso, parece transitoria, a juzgar por los resultados obtenidos a periodos posteriores (35-40 DAI), donde no mostró una inducción significativa (caso de ICC14216K) o incluso resultó reprimida. Por el contrario, el gen de la catalasa no modificó significativamente su expresión en respuesta a la doble inoculación, mientras que en la interacción simple con el nematodo resultó reprimido tanto a 4 DAI como a 35-40 DAI en la línea CA336.14.3.0. Este último resultado parece interesante, ya que corrobora el obtenido en los estudios de proteómica, donde una de las proteínas reguladas negativamente en CA336.14.3.0 por efecto de la inoculación con *M. artiellia* fue identificada como una catalasa. A este respecto, se ha observado una inducción de la expresión de catalasa clase II en nódulos provocados por *M. incognita* en patata y en el resto de la planta a las seis semanas después de la inoculación (Niebel *et al.*, 1995). La interacción compatible con nematodos noduladores muestra una inducción de EROs en la penetración de los juveniles (12 horas después de la inoculación), disminuyendo su concentración en fases posteriores (24-48 horas después de la inoculación), mientras que no se observa ningún incremento significativo de H₂O₂ en la formación del sitio de alimentación, evadiendo el nematodo la posible respuesta defensiva de la planta principalmente mediante una posible inducción de la actividad NADPH peroxidasa (Melillo *et al.*, 2006). Nuestros datos parecen apoyar que la disminución de los niveles de H₂O₂ esté modulada principalmente por NADPH peroxidasas al no aumentar el nivel de expresión de la catalasa.

3.5.- CONCLUSIONES

Los resultados del estudio de expresión génica, aunque no han aportado evidencias suficientemente contrastadas como para establecer hipótesis robustas sobre los posibles mecanismos de pérdida/mantenimiento de la resistencia a la Fusariosis Vascular por la coinfección con *M. artiellia* en las líneas estudiadas, permiten proponer las siguientes conclusiones:

1. Respecto a la expresión de genes relacionados con la ruta fenilpropanoide, las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K muestran una similar respuesta temprana, sólo manifestada a 4DAI (no a 2DAI), a la inoculación simple con *Foc-5* y a la doble con *Foc-5* y *M. artiellia*, pero muy diferente a la inoculación simple con *M. artiellia*. Mientras que la respuesta similar incluye varias inducciones génicas (PAL, C4H, CHS e IFR), la respuesta diferencial se caracteriza por la

represión de diversos genes (CHI, I2'H, IFR y Cyp81D9) en la línea CA336.14.3.0 y ausencia de efecto en ICC14216K.

2. En periodos posteriores de la interacción (35-40 DAI), ambas líneas responden de manera relativamente similar a los tratamientos. Frente a la doble inoculación, la tendencia es a una ausencia de efecto; mientras que frente a las dos inoculaciones individuales, la tendencia es a la inducción y represión de dos grupos de genes que, a grandes rasgos, coinciden con los grupos de genes incluidos en la respuesta temprana común y diferencial descrita precedentemente en la anterior conclusión.

3. La expresión de los genes quitinasa clase I y la catalasa ha resultado ser muy variable en los periodos temporales estudiados, lo que hace muy difícil cualquier intento de relacionar tal expresión con las reacciones de susceptibilidad o resistencia a los patógenos desarrolladas en los distintos tratamientos.

4. El estudio con muestras obtenidas mediante microdissección por láser, se debe considerar como preliminar y la respuesta encontrada como una mera indicación del potencial de la técnica en el ámbito de la fitonematología, con escaso valor de pronóstico, dado que los resultados han podido verse afectados por las duras condiciones de manipulación y transporte hasta el lugar de procesamiento.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

En el contexto de una agricultura productiva, y a la vez sostenible, la utilización de los sistemas de Control Integrado de Enfermedades incluye la aplicación racional de productos fitosanitarios, así como de otras medidas culturales y genéticas que determinen condiciones ambientales menos favorables para el desarrollo de las enfermedades.

Esta Tesis Doctoral se planteó con el objetivo de determinar y analizar los posibles mecanismos involucrados en la pérdida/mantenimiento de la resistencia a la Fusariosis Vascular (FVG) del garbanzo por la coinfección de la planta con *M. artiellia* y *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*. Para ello, el estudio se planteó desde la utilización de dos herramientas novedosas en el estudio de interacciones planta-patógeno: (1) análisis proteómico diferencial entre diversas inoculaciones con ambos patógenos separada- y conjuntamente, y (2) análisis de la expresión de genes con posible relación funcional con la resistencia (ruta fenilpropanoide y otros seleccionados del estudio proteómico). Ambos estudios se desarrollaron para obtener la máxima información dentro de las limitaciones del patosistema (biotrofo obligado en el caso de *M. artiellia* con largos periodos de aumento de poblaciones, inoculaciones en suelo, dificultad en la obtención de J2s, así como de tejido suficiente por el tamaño del nódulo producido). La integración (combinación) de los resultados y conclusiones obtenidas en esta tesis doctoral puede clarificar la pérdida de resistencia frente a otros patógenos inducida por los nematodos noduladores en garbanzo ó en otras especies de plantas. La elección de la metodología proteómica del estudio se debió a las ventajas que puede presentar respecto a otras metodologías, principalmente la de poder ofrecer una visión global de las proteínas involucradas en las interacciones. Sin embargo, esta metodología también puede presentar cierto tipo de limitaciones como: i) la imposibilidad de amplificación de los niveles de proteínas (no existe una tecnología de amplificación tipo PCR), esto hace que el resultado de los análisis sea muy dependiente de la cuantía de la respuesta y de la sensibilidad de detección del sistema analítico (resolución geles, tinciones, sensibilidad de la espectrometría de masas, etc.); ii) el proteoma es más complejo que el transcriptoma, varias proteínas pueden ser producidas por el mismo gen (diferente "*splicing*", modificaciones post-traduccionales, etc.); iii) las grandes diferencias de concentración que suelen darse entre proteínas de una misma muestra; y iv) los diferentes tipos de células en cada órgano o tejido tienen su propia "firma proteómica". A su vez, la elección de la técnica de expresión génica se hizo, más que para acometer un segundo abordaje de tipo general, para completar el estudio en ciertos momentos de la interacción en los que las técnicas proteómicas

parecían menos eficaces. Así, los genes elegidos se determinaron bien por los resultados del estudio proteómico anterior (quitinasa clase I y catalasa) o con el ánimo de desvelar la implicación de una ruta muy relevante desde el punto de vista de la defensa, como es en garbanzo la ruta fenilpropanoide responsable de la biosíntesis de las fitoalexinas medicarpina y maackiaina. No existen antecedentes de estudios proteómicos en la FVG, mientras que los existentes respecto a la expresión génica en la FVG son escasos y nada concluyentes. Cho y Muehlbauer (2004) encontraron que la inoculación de garbanzo con la raza 1 de *Foc* inducía la expresión de los genes fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) e isoflavona 2'-hidroxilasa (I2'H) en el periodo de 3 a 72 horas posteriores a la inoculación, si bien la respuesta fue similar en los cultivares WR-315 (resistente) y JG-62 (susceptible). Por otro lado, Arfaoui *et al.* (2007) mostraron que la inoculación de garbanzo con la raza 0 de *Foc* provocaba una inducción de genes de la ruta fenilpropanoide (PAL, chalcona sintasa (CHS) e isoflavona reductasa (IFR)) que, además, resultaba incrementada por la pre-inoculación con *Rhizobium* y se mostraba en mayor cuantía en una línea moderadamente resistente que en otra susceptible al patógeno. Por tanto, nos pareció interesante estudiar estos genes incluyendo la inoculación simple con *M. artiellia* y la inoculación simultánea de ambos patógenos.

Los periodos temporales iniciales incluidos en nuestro estudio, no han sido muy informativos respecto de la obtención de datos que permitan resolver el/los mecanismo/s implicado/s en el comportamiento diferencial de las dos líneas estudiadas (CA336.14.3.0 e ICC14216K, ambas resistentes a la Fusariosis Vascular causada por la raza 5 de *Foc*) de, respectivamente, pérdida o mantenimiento de la resistencia tras la inoculación conjunta con ambos patógenos. La respuesta proteómica temprana ha demostrado ser muy poco sensible a este respecto; sin embargo, sí aportó información sobre diferencias cualitativas y cuantitativas entre las proteínas constitutivas de ambas líneas de garbanzo. Dentro de las proteínas constitutivas diferenciales entre las dos líneas, una gran cantidad de ellas se relacionaron funcionalmente con la defensa, siendo de expresión muy variable desde el punto de vista temporal (4 y 8 DAI). La expresión génica en los periodos iniciales de la interacción ha permitido observar cierta respuesta defensiva a los 4 DAI, siendo la respuesta diferencial especialmente interesante en la línea CA336.14.3.0, donde se produjo una disminución de la transcripción de varios genes de la ruta fenilpropanoide (chalcona isomerasa (CHI), I2'H, IFR y Cyp81D9) en plantas inoculadas con *M. artiellia*.

Los estudios referidos a fases más avanzadas de la interacción (35-40 DAI) revelaron una mayor respuesta proteómica de la planta, lo que fundamentalmente podría justificarse en base a la mayor extensión de la interacción desde el punto de vista temporal y de la zona de contacto de la planta con los patógenos. El material de estudio utilizado consistió en muestras de raíces sin nódulos (control y *Foc*-5) ó muestras de nódulos (*M. artiellia* y *Foc*-5-*M. artiellia*). Se observaron

diferencias en la expresión proteómica de ambas líneas en respuesta a la inoculación con ambos patógenos tanto separada como conjuntamente, siendo la más intensa la correspondiente a la combinación de ambos patógenos en la línea CA336.14.3.0. En este periodo temporal se observó la expresión/represión diferencial de diversas proteínas con una posible función defensiva [principalmente, quitinasa clase I, proteínas del metabolismo secundario, enzimas relacionados con el metabolismo de las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), proteínas de unión a nucleótidos y una proteína R], aunque sólo en muy pocos casos, como en el de una proteína R y una ascorbato peroxidasa, la respuesta de ambas líneas fue común. En este estudio, la tasa de identificación de proteínas ha sido escasa, habiendo probablemente influido en ello tanto la baja cantidad de proteína aplicada a los geles como el bajo número de secuencias depositadas en las bases de datos, por lo que dentro del amplio grupo de proteínas diferenciales no-identificadas se podrían encontrar ejemplares interesantes de cara al establecimiento de posible mecanismos responsables de la respuesta diferencial de mantenimiento / pérdida de resistencia mostrada por ambas líneas. Al contrario de los estudios de proteómica, este periodo temporal no determinó diferencias significativas entre líneas que pudieran relacionarse con su diferente comportamiento a la inoculación simultánea de ambos patógenos. En este caso, se apreció una respuesta general similar entre las líneas; aunque ésta puede haber sido influenciada por el tipo de muestreo utilizado ó la edad avanzada de la planta. El estudio de la expresión de genes en los citoplasmas obtenidos mediante técnicas de microcaptura con láser se debe considerar como preliminar, pudiendo los resultados obtenidos haber sido influenciados en cierta medida por la manipulación de la muestra y el transporte hasta su lugar de procesamiento (Universidad de Murdock, Australia).

Desde el punto de vista del papel del apoplasto en la resistencia a la FVG, la respuesta débil en las líneas resistentes ('CA336.14.3.0' e 'ICC14216K') contrasta con la amplia respuesta de la línea susceptible JG62, por lo que ésta pudiera asociarse bien con el estrés hídrico de la planta producido por la enfermedad ó bien con la inducción tardía de mecanismos de defensa una vez el hongo ha penetrado en el haz vascular, ya que el aumento de los niveles de quitinasas también pueden ser inducidas por heridas, etileno, auxinas y citoquininas (Graham y Sticklen, 1994). La posibilidad de una respuesta más específica y localizada en el cilindro vascular, así como que la respuesta esté más centrada en otro periodo temporal, pueden haber sido una de las causas de la escasa respuesta en las líneas resistentes. Así, en estudios de la Fusariosis Vascular del tomate (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) se ha determinado que la reacción de susceptibilidad y resistencia está parcialmente asociada a la interacción con los vasos xilemáticos (Rep *et al.*, 2002). La expresión del gen *I-2*, que proporciona resistencia a la raza 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, ha sido localizada

en el tejido parenquimático que engloba al cilindro vascular. Con lo que, se puede especular que la respuesta más consistente a la fusariosis vascular esté localizada en esa región de la raíz.

Los experimentos mediante "split-root" determinaron que la resistencia no se rompe por la presencia de algún efecto ó sustancia translocable en la planta producido o inducido por *M. artiellia*, en las condiciones y densidades de patógeno utilizadas. Así, en el estudio del fluido apoplástico de estas plantas no se observó ningún componente proteico diferencial en el apoplasto de las partes radicales separadas de la misma planta. La falta de respuesta proteica pudo ser debida a varios efectos: i) a la elevada edad de las raíces; ii) a que las moléculas implicadas en el efecto de la pérdida de resistencia sean de naturaleza no-proteica; y/o iii) a que los mecanismos de sistemia que puede provocar el nematodo en la raíz sean de naturaleza no-proteica y solo se transmitan en la misma raíz, y no en toda la planta. Respecto a este último punto, se puede destacar que el hongo no penetra las células gigantes para alcanzar el cilindro vascular, como parece deducirse del resultado de estudios histopatológicos con cultivares de tomate, susceptible y resistente a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, inoculados con *M. javanica* (Fattah y Webster, 1983). Sin embargo, las plantas presentaron una mayor coloración oscura y menor crecimiento en la parte radical inoculada con *Foc-5*, y estos síntomas fueron superiores en las plantas inoculadas en ambas partes radicales, aunque las diferencias solo fueron significativas en uno de los tratamientos, el de la línea ICC14216K inoculada con ambos patógenos. La elevada densidad de inóculo (clamidosporas) del hongo podría producir estos efectos en la parte de la raíz inoculada junto con el efecto de sumidero del nematodo, aunque en ningún momento se perdió la resistencia a *Foc-5*.

En conclusión, en esta Tesis Doctoral se ha pretendido dar una posible explicación de los mecanismos involucrados en la pérdida/mantenimiento de la resistencia a la Fusariosis Vascular del garbanzo por la coinfección de la planta por *M. artiellia* y *F. oxysporum* f.sp. *ciceris*. Al respecto, se ha estudiado la inoculación con diferentes combinaciones de los patógenos (*Foc-5*, *M. artiellia* y *Foc-5-M. artiellia*) en un curso temporal de las interacciones (estados iniciales en la interacción, 35-40 DAI), analizando diferentes partes de sistema radical (raíz completa, nódulos, fluido apoplástico) con el empleo de técnicas de proteómica y de expresión génica). Esta puede ser la base para continuar con el desarrollo de nuevos trabajos de investigación que permitan determinar los mecanismos específicos provocados por el nematodo para romper la resistencia a la FVG. Así como evitar desarrollos experimentales que en nuestro caso, no han sido tan concluyentes como esperábamos al estudiar las dos líneas. Entre las posibles futuras vías de estudio podrían estar: i) la introducción de líneas susceptibles o moderadamente resistentes en los estudios, las cuales podrían determinar otros factores expresados por la planta, para entender la pérdida de la resistencia en la

co-infección por ambos patógenos en algunas líneas ii) la aplicación de la tecnología de cDNA-AFLPs, la cual se ha observado bastante satisfactoria con otras líneas de garbanzo (Nimbalkar *et al.*, 2006), pero con nuestro sistema de inoculaciones, iii) mejorar la técnica de microdissección por láser enlazando con el punto anterior, y iv) obtención de fluido xilématico ó un muestreo más localizado en el cilindro vascular para estudios mediante técnicas proteómicas, el cual ha dado buenos resultados en el patosistema tomate-*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Rep *et al.*, 2002, 2003).

CONCLUSIONES GLOBALES DE LA TESIS

Las conclusiones de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1) La pérdida/mantenimiento de la resistencia a la FVG por la co-infección de *M. artiellia* y *Foc-5* en líneas de garbanzo resistentes al hongo puede estar condicionada (entre otros posibles mecanismos) por una represión de genes de la ruta fenilpropanoide en fases tempranas de la interacción y por una expresión proteica diferencial en periodos posteriores de la interacción.

2) Como respuestas diferenciales entre las líneas CA336.14.3.0 e ICC14216K asociables a, respectivamente, la pérdida/mantenimiento de la resistencia a la FVG por la coinfección de ambos patógenos se puede destacar la mayor expresión proteica de la quitinasa clase I en periodos más avanzados de la interacción (35-40 DAI) de la línea ICC14216K con resistencia estable a la coinfección.

3) Como respuestas asociables a la reacción de pérdida de la resistencia a la FVG se encontraron las siguientes:

a) La línea CA336.14.3.0 presenta una fuerte disminución de la expresión de genes relacionados con la ruta fenilpropanoide (Chalcona isomerasa, Isoflavona 2'-hidroxilasa, Isoflavona reductasa y Cyp81D9) en plantas inoculadas sólo con *M. artiellia* a los 4 DAI.

b) Respuesta diferencial y superior en número de proteínas alteradas por *M. artiellia* en periodos más avanzados de la interacción en la línea CA336.14.3.0.

c) Disminución de los niveles de enzimas relacionados con la ruta fenilpropanoide en la inoculación simple con el nematodo (chalcona isomerasa) y ambos patógenos (hidroxiisoflavona reductasa) en la línea CA336.14.3.0.

4) Existe una respuesta proteica diferencial entre ambas líneas de garbanzo que no se pudo asociar al mantenimiento/pérdida de la resistencia (ej. catalasa, proteínas asociadas al metabolismo, etc.,..).

5) La expresión de la ascorbato peroxidasa estuvo asociada a la interacción de ambos patógenos en ambas líneas.

6) No se observó que la pérdida de resistencia esté ocasionada por algún efecto sistémico en la planta provocado por el parasitismo del nematodo en la raíz.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E.G.J., Deleury, E., Perfus-Barbeoch, L., Anthouard, V., Artiguenave, F., Blok, V.C., Caillaud, M.C., Coutinho, P.M., Dasilva, C., De Luca, F., Deau, F., Esquibet, M., Flutre, T., Goldstone, J.V., Hamamouch, N., Hewezi, T., Jaillon, O., Jubin, C., Leonetti, P., Magliano, M., Maier, T.R., Markov, G.V., McVeigh, P., Pesole, G., Poulain, J., Robinson-Rechavi, M., Sallet, E., Segurens, B., Steinbach, D., Tytgat, T., Ugarte, E., van Ghelder, C., Veronico, P., Baum, T. J., Blaxter, M., Bleve-Zacheo, T., Davis, E.L., Ewbank, J.J., Favery, B., Grenier, E., Henrissat, B., Jones, J.T., Laudet, V., Maule, A.G., Quesneville, H., Rosso, M.N., Schiex, T., Smant, G., Weissenbach, J., Patrick, W. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, **26**: 909-915.
- Abawi, G.S., Bakker, K.P. 1984. Effects of cultivar, soil temperature and population levels of *Meloidogyne incognita* on root necrosis and Fusarium wilt of tomatoes. *Phytopathology*, **74**: 433-438.
- Abián, J. 2004. Proteómica: aplicaciones en biomedicina. En *Medicina Interna-Rodes* (J. Rodes, ed.). Ed. Masson, Barcelona, España. 3.872 pp.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA, 922 pp.
- Aksamit-Stachurska, A., Korobczak-Sosna, A., Kulma, A., Szopa, J. 2008. Glycosyltransferase efficiently controls phenylpropanoid pathway. *BMC Biotechnology*, **8**: 25-41.
- Alabouvette, C., Edel, V., Lemanceau, P., Olivain, C., Recobert, G., Steinberg, C. 2001. Diversity and interactions among strains of *Fusarium oxysporum*: Application to biological control. En *Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations* (M.J. Jeger, N.J. Spence, eds.). CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 131-158.
- Alcalá Jiménez, A.R. 1995. Aspectos epidemiológicos del patosistema *Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo & Sato / *Cicer arietinum* L. P. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 284 pp.
- Allen, D.J. 1983. *The Pathology of Tropical Food Legumes*. John Wiley and Sons, New York, U.S.A., 413 pp.
- Almagro, L., Gómez Ros, L.V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., Pedreño, M.A. 2008. Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 377-390.

- Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S., Van Loon, L.C.** 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology*, **47**: 79-87.
- Arfaoui, A., El Hadrami, A., Mabrouk, Y., Sifi, B., Boudabous, A., El Hadrami, I., Daayf, F., Chérif, M.** 2007. Treatment of chickpea with *Rhizobium* isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **45**: 470-479.
- Armero, J., Requejo, R., Jorin, J., López-Valbuena, R., Tena, M.** 2001. Release of phytoalexins and related isoflavonoids from intact chickpea seedlings elicited with reduced glutathione at root level. *Plant Physiology and Biochemistry*, **39**: 785-795.
- Atkinson, G.F.** 1892. Some diseases of cotton. *Alabama Agricultural Experimental Station Bulletin*, **41**: 61-65.
- Azevedo, C., Betsuyaku, S., Peart, J., Takahashi, A., Noel, L., Sadanandom, A., Casais, C., Parker, J., Shirasy, K.** 2006. Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *EMBO journal*, **25**: 2007-2016.
- Baker, J.C., Orlandi, E.W.** 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, **33**: 229-321.
- Baker, R.A., Tatum, J.H.** 1998. Novel anthraquinones from stationary cultures of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **85**: 359-361.
- Baldridge, G.D., O'Neill, N.R., Samac, D.A.** 1998. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) resistance to the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans*: defense-response gene mRNA and isoflavonoid phytoalexin levels in roots. *Plant Molecular Biology*, **38**: 999-1010.
- Balestrini, R., Gómez-Ariza, J., Lanfranco, L., Bonfante, P.** 2007. Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **20**: 1055–1062.
- Bar-Or, C., Kapulnik, Y., Koltai, H.** 2005. A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *European Journal of Plant Pathology*, **111**: 181-192.
- Barz, W., Bless, W., Borger-Papendorf, G., Gunia, G., Mackenbock, V., Meier, D., Otto, C., Super, E.** 1990. Phytoalexins as a part of induced defense mechanisms in plants: Their elicitation, function and metabolism. En *Bioactive Compounds from Plants* (D.J. Chadwick, J. Marsh, eds.). John

- Wiley and Sons, New York, USA. pp. 140-156.
- Barz, W., Welle, R.** 1992. Biosynthesis and metabolism of isoflavones and pterocarpan phytoalexins in chickpea, soybean and phytopathogenic fungi. En *Recent Advances in Phytochemistry* (H.A. Stafford, R.K. Ibrahim, eds.). Plenum Press, New York. pp. 139-164.
- Barz, W., Mackenbrock, U.** 1994. Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpan in chickpea (*Cicer arietinum*) cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **38**: 199-211.
- Basallote Ureba, M.J.** 1987. Relaciones huésped-parásito en la marchitez del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 239 pp.
- Bayles, B.A., Dean, J.F.D., Anderson, J.D.** 1990. An ethylene biosynthesis-inducing endoxylanase elicits electrolyte leakage and necrosis in *Nicotiana tabacum* cv. *xhanti* leaves. *Plant Physiology*, **94**: 1849-1854.
- Beckman, C.H., Halmos, S.** 1962. Relation of vascular occluding reactions in banana roots to pathogenicity of root invading fungi. *Phytopathology*, **52**: 893-897.
- Beckman, C.H.** 1987. *The nature of Wilt Diseases of Plants*. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN. U.S.A., 175 pp.
- Beckman, C.H.** 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **57**: 101-110.
- Beintema, J.J.** 2007. Hev b 11, a peculiar class I chitinase? *Journal of Rubber Research*, **10**: 127-130.
- Bekal, S., Niblack, T.L., Lambert, K.N.** 2003. A chorismate mutase from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* shows polymorphisms that correlate with virulence. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **16**: 439-446.
- Bell, A.A.** 1969. Phytoalexin production and Verticillium wilt resistance in cotton. *Phytopathology*, **59**: 1119-1127.
- Bell, A.A.** 1994. Mechanisms of disease resistance in *Gossypium* species and variation in *Verticillium dahliae*. En *Proceedings World Cotton Research Conference*, (G.A. Constable, N.W. Forrester, eds.). CSIRO, Melbourne, Australia, Brisbane, Australia, pp. 225-235.
- Bell, A.A., Wheeler, M.H., Liu, J., Stipanovic, R.D., Puckhaber, L.S., Orta, H.** 2003. United States Department of Agriculture—Agricultural Research Service studies on polyketide toxins of *Fusarium oxysporum* f sp *vasinfectum*: potential targets for disease control. *Pest Management*

Science, **59**: 736-747.

- Bellafiore, S., Shen, Z., Rosso, M. N., Abad, P., Shih, P., Briggs, S. P.** 2008. Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS pathogens*, **4**: e1000192. doi:1000110.1001371/journal.ppat.1000192.
- Bellés, J.M., López-Gresa, M. P., Fayos, J., Pallás, V., Rodrigo, I., Conejero, V.** 2008. Induction of cinnamate 4-hydroxylase and phenylpropanoids in virus-infected cucumber and melon plants. *Plant Science*, **174**: 524-533.
- Benhamou, N., Grenier, J., Asselin, A., Legrand, M.** 1989. Immunogold localization of β -1,3-glucanases in two plants infected by vascular wilt fungi. *The plant Cell*, **1**: 1209-1221.
- Benko Isepon, A.M., Winter, P., Huettel, B., Staginnus, C., Muehlbauer, F.J., Kahl, G.** 2003. Molecular markers closely linked to *Fusarium* resistance genes in chickpea show significant alignments to pathogenesis-related genes located on *Arabidopsis* chromosomes 1 and 5. *Theoretical Applied Genetics*, **107**: 379-386.
- Bent, A.F., Mackey, D.** 2007. Elicitors, Effectors and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology*, **45**: 399-436.
- Bergenson, G.B.** 1972. Concepts of nematode-fungus association in plant diseases complexes: a review. *Experimental Parasitology*, **32**: 301-304.
- Bergeson, G.B., Van Gundy, S.D., Thomason, I. J.** 1970. Effect of *Meloidogyne javanica* on rhizosphere microflora and Fusarium wilt of tomato. *Phytopathology*, **60**: 1245-1249.
- Bestel-Corre, G., Dumas-Gaudot, E., Poinso, V., Dieu, M., Dierick, J.F., Tuinen, D.V., Remacle, J., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S.** 2002. Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*, **23**: 122-137.
- Bhushan, D., Pandey, A., Chattopadhyay, A., Choudhary, M.K., Chakraborty, S., Datta, A., Chakraborty, N.** 2006. Extracellular matrix proteome of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) illustrates pathway abundance, novel protein functions and evolutionary prespect. *Journal of Proteome Research*, **5**: 1711-1720.
- Bhushan, D., Pandey, A., Kant, M., Choudhary, M.K., Datta, A., Chakraborty, S., Chakraborty, N.** 2007. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in chickpea extracellular matrix during dehydration stress. *Molecular and cellular proteomics*, **6**: 1868-1884.
- Biely, P., Vrsanska, M., Tenkanen, M., Kluepfel, D.** 1997. Endo-beta-1,4-xylanase families: differences

- in catalytic properties. *Journal of Biotechnology*, **57**: 151-166.
- Biles, C.L., Martyn, R.D.** 1989. Local and systemic resistance induced in watermelon by formae speciales of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **79**: 856-860.
- Biondi, D.M., Rocco, C., Ruberto, G.** 2003. New dihydrostilbene derivatives from the leaves of *Glycyrrhiza glabra* and evaluation of their antioxidant activity. *Journal of Natural Products*, **66**: 477-480.
- Birch, P.R.J., Boevink, P.C., Gilroy, E. M., Hein, I., Pritchard, L., Whisson, S.** 2008. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**: 373–379.
- Bird, A.** 1983. Changes in the dimensions of the oesophageal glands in root-knot nematodes during the onset of parasitism. *International Journal of Parasitology*, **13**: 343-348.
- Bird, A.F., Loveys, B.R.** 1980. The involvement of cytokinins in a host-parasite relationship between the tomato (*Lycopersicon esculentum*) and a nematode (*Meloidogyne javanica*). *Parasitology*, **80**: 497-505.
- Bird, A.F., Bonig, I., Bacic, A.** 1988. A role for the 'Excretory' system in Secernentean nematodes. *Journal of Nematology*, **20**: 493-496.
- Blee, E.** 1998. Phytooxylipins and plant defense reactions. *Progress in Lipid Research*, **37**: 33-72.
- Bless, W.** 1992. Untersuchungen zur biosynthese der pterocarpan-phytoalexine in der kichererbse (*Cicer arietinum* L.). Nachweis und charakterisierung einer pterocarpan-synthase und einer chalkonreduktase. Tesis Doctoral. University of Münster.
- Block, A., Li, G., Fu, Z. Q., Alfano, J.R.** 2008. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**: 396-403.
- Böckenhoff, A., Grundler, F.M.W.** 1994. Studies on the nutrient uptake of the beet cyst nematode *H. schachtii* by in situ microinjection of fluorescent probes into the feeding structures in *Arabidopsis thaliana*. *Parasitology*, **109**: 249-254.
- Böhm, J., Hahn, A., Schubert, R., Bahnweg, G., Adler, N., Nechwatal, J., Oehlmann, R., Osswald, W.** 1999. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mossae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *Journal of Phytopathology*, **147**: 409–416.
- Boller, T.** 1987. Plant-Microbe Interactions. En *Molecular and Genetic Perspectives* (T. Kosuge, E. W. Nester, eds.). MacMillan, New York, U.S.A., vol. II, pp. 385–413.

- Borisjuk, N., Sitailo, L., Adler, K., Malysheva, L., Tewes, A., Borisjuk, L., Manteuffel, R.** 1998. Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. *Planta*, **206**: 504-514.
- Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Lafitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., Esquerré-Tugayé, M.T., Pont-Lezica, R.** 2005. Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics*, **5**: 212–221.
- Bousslama, M.** 1980. Chickpea improvement in Tunisia. En *Proceedings of the International Workshop on Chickpea Improvement*. ICRISAT, Hyderabad, India, pp. 277-280.
- Boydston, R., Paxton, J.D., Koeppe, D.E.** 1983. Glyceollin: a site-specific inhibitor of electron transport in isolated soybean mitochondria. *Plant Physiology*, **72**: 151-155.
- Bozhkov, P.V., Suarez, M.F., Filonova, L.H., Daniel, G., Zamyatnin J.A.A., Rodriguez-Nieto, S., Zhivotovsky, B., Smertenko, A.** 2005. Cysteine protease mcll-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proceedings National Academy of Sciences U.S.A.*, **102**: 14463-14468.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R., Lamb, C.** 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *The plant Cell*, **6**: 1703-1712.
- Brotman, Y., Silberstein, L., Kovalski, I., Perín, C., Dogimont, C., Pitrat, M., Klinger, J., Thompson, G.A., Perl-Treves, T.R.** 2002. Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, **104**: 1055-1063.
- Brumbarova, T., Matros, A., Mock, H.P., Bauer, P.** 2008. A proteomic study showing differential regulation of stress, redox regulation and peroxidase proteins by iron supply and the transcription factor FER. *The Plant Journal*, **54**: 321-334.
- Brune, A., Urbach, W., Dietz, K.J.**, 1994. Compartmentation and transport of zinc in barley primary leaves as basic mechanisms involved in zinc tolerance. *Plant Cell and Environment*, **17**: 153-162.
- Büchter, R., Strömberg, A., Schmelzer, E., Kombrink, E.** 1997. Primary structure and expression of acidic (class II) chitinase in potato. *Plant Molecular Biology*, **35**: 749-761.
- Buddenhagen, I.W., Workneh, F.** 1988. Fusarium wilt of chickpea in California. *Phytopathology*, **78**: 1563 (Abstract).
- Buer, C.S., Muday, G.K., Djordjevic, M.A.** 2007. Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **145**: 478-490.

- Busch, M., Seuter, A, Hain, R.** 2002. Functional analysis of the early steps of carotenoid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, **128**: 439–453.
- Byrd, D.W., Kirkpatrick, T., Barker, K.R.** 1983. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. *Journal of Nematology*, **15**: 142-142.
- Cabrera de la Colina, J., Trapero Casas, A., Jiménez Díaz, R.M.** 1987. Host range and symptomless carriers of *Fusarium* spp. infecting chickpeas in Andalucía. En *Proceedings of the 7th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union* (SEFIMPU, eds.), pp 20-26.
- Cachinero, J.M., Hervás, A., Jimenez Díaz, R.M., Tena, M.** 2002. Plant defense reactions against fusarium wilt in chickpea induced by incompatible race 0 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and nonhost isolates of *F. oxysporum* *Plant Pathology*, **51**: 756-776.
- Caillaud, M.C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., de Almeida Engler, J., Abad, P., Rosso, M.N., Favery, B.** 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *Journal of Plant Physiology*, **165**: 104-113.
- Callahan, F.E., Jenkins, J.N., Creech, R.G., Lawrence, G.W.** 1997. Changes in cotton root proteins correlated with resistance to root knot nematode development. *Journal of Cotton Science*, **1**: 38-47.
- Cánovas, F.M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorrín, J., Mock, H.P., Rossignol, M.** 2004. Plant proteome analysis. *Proteomics*, **4**: 285-298.
- Capy, P., Gasperi, G., Biémont, C., Bazin, C.** 2000. Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity*, **85**: 101-106.
- Carpentier, S.C., Witters, E., Laukens, K., Deckers, P., Swennen, R., Panis, B.** 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics*, **5**: 2497-2507.
- Castillo, P., Gómez Barcina, A., Jiménez Díaz, R.M.** 1996. Plant parasitic nematodes associated with chickpea in southern Spain and effect of soil temperature on reproduction of *Pratylenchus thornei*. *Nematologica*, **42**: 211-219.
- Castillo, P., Navas-Cortés, J.A., Gomar-Tinoco, D., Di Vito, M., Jiménez-Díaz, R.M.** 2003. Interactions between *Meloidogyne artiellia*, the cereal and legume root-knot nematode, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 5 in chickpea. *Phytopathology*, **93**: 1513-1523.
- Castillo, P., Navas-Cortes, J.A., Landa, B.B., Jimenez-Diaz, R.M., Vovlas, N.** 2008. Plant-parasitic nematodes attacking chickpea and their in planta interactions with Rhizobia and phytopathogenic

fungi. *Plant Disease*, **92**: 840-853.

Chauhan, S.K. 1962. Observations on certain symptoms in Fusarium Wilt of gram (*Cicer arietinum* L.). *Agra University Journal of Research*, **11**: 285-293.

Chauhan, Y.L., Nene, Y.L., Johansen, C., Haware, M.P., Saxena, N.P., Singh, S., Sharma, S.B., Sahrawat, K.L., Burford, J.R., Rupela, O.P., Kumar R., Sithanantham, S. 1988. Effect of soil solarization on pigeonpea and chickpea. *ICRISAT Research Bulletin*, **11**: 502-524.

Chavanne, F., Zhang, D. Liaud, M.F., Cerff, R. 1998. Structure and evolution of Cyclops: a novel giant retrotransposon of the Ty3/Gypsy family highly amplified in pea and other legume species. *Plant Molecular Biology*, **37**: 363-375.

Cheng, S.H., Sheen, J., Gerrish, C., Bowtell, G.P. 2001. Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active *Arabidopsis* CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS letters*, **503**: 185-188.

Chi, C.C., Childers, W.R., Hanson, E.W. 1964. Penetration and subsequent development of three *Fusarium* species in alfalfa and red clover. *Phytopathology*, **54**: 434+437.

Chishlom, S.T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B.J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124** 803-814.

Chivasa, S., Simon, W. J., Yu, X.L., Yalpani, N., Slabas, A.R. 2005. Pathogen elicitor-induced changes in the maize extracellular matrix proteome. *Proteomics*, **5**: 4894-4904.

Cho, S., Muehlbauer, F.J. 2004. Genetic effect of differentially regulated fungal response genes on resistance to necrotrophic fungal pathogens in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **64**: 57-66.

Cho, S., Chen, W., Muehlbauer, F.J. 2005. Constitutive expression of the flavanone 3-hydroxylase gene related to pathotype-specific ascochyta blight resistance in *Cicer arietinum* L. *Physiology Molecular Plant Pathology*, **67**: 100-107.

Christensen, A., Ho Cho, B., Naesby, M., Gregersen, P., Brandt, J., Madriz-Ordeñana, K., Collinge, D., Thordal-Christensen, H. 2002. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology*, **3**: 135-144.

Dieterich, C., Schuster, L.N., Chinwalla, A., Delehaunty, K., Dinkelacker, I., Fulton, L., Fulton, R., Godfrey, J., Minx, P., Mitreva, M., Roeseler, W., Tian, H., Witte, H., Yang, S.P., Wilson, R.K., Sommer & Dieterich, R.J., Clifton, S.W., Schuster, L.N., Chinwalla, A., Delehaunty, K.,

- Dinkelacker, I., Fulton, L., Fulton, R., Godfrey, J., Minx, P., Mitreva, M., Roeseler, W., Tian, H., Witte, H., Yang, S.P., Wilson, R., Sommer, R. 2008. The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode life-style and parasitism. *Nature Genetics*, **40**: 1193-1198
- Ciopraga, J., Gozia, O., Tudor, R., Brezuica, L., Doyle, R.J. 1999. *Fusarium* sp. growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1428**: 424-432.
- Colditz, F., Nyamsuren, O., Niehaus, K., Eubel, H., Braun, H.P., Krajinski, F. 2004. Proteomic approach: identification of *Medicago truncatula* proteins induced in roots after infection with the pathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Plant Molecular Biology*, **55**: 109-120.
- Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., Nielsen, K.K., Rasmussen, U., Vad, K. 1993. Plant chitinases. *Plant Journal*, **3**: 31-40.
- Considine, M.J., Daley, D.O., Whelan, J. 2001. The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiology*, **126**: 1619-1629.
- Consortium, *C. elegans* Sequencing. 1998. Genome sequence of the nematode *Caenorhabditis elegans*. A platform for investigating biology. *Science*, **282**: 2012-2018.
- Coolen, W.A. 1979. Methods for the extraction of *Meloidogyne* spp. and other nematodes from roots and soil. En *Root-knot nematodes (Meloidogyne species) Systematics, Biology and Control* (F. T. Lamberti, C. E. Taylor, eds.). Academic Press, London, pp. 317-329.
- Costa Manso, E.S.B.G., Huang, C. S. 1986. Interação entre *Meloidogyne incognita* (Raça 4) e isolados de *Rhizoctonia solani*, em *Phaseolus vulgaris* cv. Rico 23. *Fitopatología Brasileira*, **11**: 857-864.
- Covarrubias, A.A., Ayala, J.W., Reyes, J.L., Hernandez, M., Garciarrubio, A. 1995. Cell-wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Physiology*, **107**: 1119-1128.
- Cunnac, S., Occhialini, A., Barberis, P., Boucher, C., Genin, S. 2004. Inventory and functional analysis of large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Molecular Microbiology*, **53**: 115-128.
- Czichi, U., Kindl, H. 1975. Formation of p-coumaric acid and o-coumaric acid from L-phenylalanine by microsomal membrane fractions from potato: evidence of membrane-bound enzyme complexes. *Planta*, **125**: 115-125.
- Dahan, J., Etienne, P., Petitot, A.S., Houot, V., Blein, J.P., Scily, L. 2001. Cryptogein affects

- expression of $\alpha 3$, $\alpha 6$ and $\beta 1$ 20S proteasome subunits encoding genes in tobacco. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 1947-1948.
- Dangl, J.** 1998. Plant just say NO to pathogens. *Nature*, **394**: 525-526.
- Daniel, S., Tiemann, K., Wittkamp, U., Bless, W., Hinderer, W., Barz, W.** 1990. Elicitor-induced metabolic changes in cell cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Ascochyta rabiei*. I. Investigations of enzyme activities in isoflavone and pterocarpan phytoalexin biosynthesis. *Planta*, **182**: 270-278.
- Daniel, S., Barz, W.** 1990. Elicitor-induced metabolic changes in cell cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Ascochyta rabiei*. II. Differential induction of chalcone-synthase-mRNA activity and analysis of in-vitro-translated protein patterns. *Planta*, **182**: 279-286.
- Davies, W.J., Jones, H. G.** 1991. *Abscisic acid: physiology and biochemistry*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 266 pp.
- Davis, E.E., Venette, R.C.** 2004. Mini Risk Assessment. British root-knot nematode: *Meloidogyne artiella* Franklin (Nematoda: Meloidogynidae). Department of Entomology, University of Minnesota.
www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/pest_detection/downloads/pramartielliapra.pdf
- Davis, E.L., Hussey, R.S., Baum, T.J.** 2004. Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends in Parasitology*, **20**: 134-141.
- Davis, E.L., Mitchum, M. G.** 2005. Nematodes. Sophisticated Parasites of legumes. *Plant Physiology*, **137**: 1182-1188.
- De Almeida Engler, J., Van Poucke, K., Karimi, M., De Groot, R., Gheysen, G., Engler, G.** 2004. Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. *Plant Journal*, **38**: 12-26.
- De Almeida Engler, J., De Vleeschauwer, V.V., Burssens, S., Celenza, Jr. J.L., Inze, D., Van Montagu, M., Engler, G., Engler, G., Gheysen, G.** 1999. Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. *Plant Cell*, **11**: 793-808.
- De Ascensao, A.R.F.D.C., Dubery, I.A.** 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* *Phytochemistry*, **63**: 679-686.

- De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., Cervone, F.** 2001. The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, **39**: 313-335.
- De Lorenzo G., Ferrari, S.** 2002. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against pathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology*, **5**: 1-6.
- De Meutter, J., Tytgat, T., Witters, E., Gheysen, G., Van Onckelen, H., Gheysen, G.** 2003. Identification of cytokinins produced by the plant parasitic nematodes *Heterodera schachtii* and *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant Pathology*, **4**: 271-277.
- De Young, B.J., Innes, R.W.** 2006. Plant NB-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunology*, **7**: 1243-1249.
- Défago, G., Kern, H., Sedlar, L.** 1983. Genetic analysis of tomatine insensitivity, sterol content and pathogenicity for green tomato fruits in mutants of *Fusarium solani*. *Physiology Molecular Plant Pathology*, **22**: 39-43.
- Delledone, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C.** 2001. Signal interaction between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings National Academy of Sciences U.S.A.*, **98**: 13454-13459.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C.** 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, **394**: 585-588.
- Delledonne, M., Murgia, I., Ederle, D., Sbicego, P.F., Biondani, A., Polverari, A., Lamb, C.** 2002. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signalling in the plant hypersensitive disease-resistance response. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**: 605-610.
- Demeure, Y., Freckman, D.W., van Gundy, S.D.** 1979a. Anhidrotic coiling of nematodes in soil. *Journal of Nematology*, **11**: 189-195.
- Demeure, Y., Freckman, D.W., van Gundy, S.D.** 1979b. In vitro response of four species of nematodes to desiccation and discussion of this related phenomena. *Revue de Nématologie*, **2**: 203-210.
- Desikan, R., Mackerness, S., Hancock, T.J., Neill, S.J.** 1998. Hairpin and hydrogen peroxide induce the expression of a homologue of gp91-*phox* in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Journal of Experimental Botany*, **49**: 1767-1771.
- Dewick, P.M.** 1994. Isoflavonoids. En *The Flavonoids* (J. B. Harborne, ed.). Chapman and Hall London, UK, pp 117-232.
- Dewick, P.M.** 1998. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, **15**: 17-58.
- Di Pietro, A., Roncero, M.I.G.** 1996. Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp.

lycopersici: purification, characterization, and production during infection of tomato plants. *Phytopathology*, **86**: 1324-1330.

Di Pietro, A., Roncero, M.I.G. 1998. Cloning, expression, and role in pathogenicity of *pg1* encoding the major extracellular endopolygalacturonase of the vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **11**: 91-98.

Di Pietro, A., Huertas-Gonzalez, M.D., Gutierrez-Corona, J.F., Martinez-Cadena, G., Meglec, E., Roncero, M.I.G. 2001. Molecular characterization of a subtilase from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **14**: 653-662.

Di Pietro, A., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J., Roncero, M.I.G. 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*, **4**: 315-325.

Di Vito, M., Greco, N., Zaccheo, G. 1985. On the host range of *Meloidogyne artiellia*. *Nematologia Mediterranea*, **13**: 207-212.

Di Vito, M., Greco, N. 1988a. Investigation on the biology of *Meloidogyne artiellia*. *Revue Nematol.*, **11**: 223-237.

Di Vito, M., Greco, N. 1988b. Investigation on the biology of *Meloidogyne artiellia*. *Revue Nematol.*, **11**: 223-237.

Di Vito, M., Greco, N., Halila, H.M., Mabsoute, L., Labdi, M., Beniwal, S.P.S., Saxena, M.C., Singh, K.B., Solh, M.B. 1994a. Nematodes of cool-season food legumes in North Africa. *Nematologia Mediterranea*, **22**: 3-10.

Di Vito, M., Greco, N., Oreste, G., Saxena, M.C., Singh, K.B., Kusmenoglu, I. 1994b. Plant parasitic nematodes of legumes in Turkey. *Nematologia Mediterranea*, **22**: 245-251.

Dieterich, C., Clifton, S. W., Schuster, L.N., Chinwalla, A., Delehaunty, K., Dinkelacker, I., Fulton, L., Fulto, R., Godfrey, J., Minx, P., Mitreva, M., Roeseler, W., Tian, H., Witte, H., Yang, S.P., Wilson, R.K., Sommer, R.J. 2008. The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode lifestyle and parasitism *Nature Genetics*, **40**: 1193 - 1198.

Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C., Dangl, J.L. 1997. A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell*, **88**: 685-694.

Dietz, K.J. 1997. Functions and responses of the leaf apoplast under stress. *Progress in Botany*, **58**: 221-254.

- Ditt, R.F., Nester, E. W., Comai, L. 2001. Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings National Academy of Sciences*, **98**: 10954-10959.
- Dixon, R.A. 1986. The biochemistry and physiology of plant-disease. *Nature*, **322**: 604-604
- Dixon, R.A., Harrison, M.J., Paiva, N.L. 1995. The isoflavonoid pathway: From enzymes to genes to transcription factors. *Plant Physiology*, **93**: 385-392.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant Cell*, **7**: 1085-1097.
- Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C., Reddy, M. S.S., Wang, L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, **3**: 371-390.
- Dmowska, E. 1982. Interactions of soil nematodes and fungi and bacteria responsible for plant diseases. *Wiadomosci Ekologiczne*, **28**: 219-226.
- Dorsett, D., Eissenberg, J.C., Misulovin, Z., Martens, A., Redding, B., McKim, K. 2005. Effects of sister chromatid cohesion proteins on cut gene expression during wing development in *Drosophila*. *Development*, **132**: 4743-4753.
- Dowd, C., Wilson, L.W., McFadden, H. 2004. Gene expression profile changes in cotton root and hypocotyl tissues in response to infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **17**: 654-667.
- Doyle, E.A., Lambert, K.N. 2003. *Meloidogyne javanica* chorismate mutase I alters plant cell development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**: 123-131.
- Dropkin, V.H., Helgeson, J.P., Upper, C.D. 1969. The hypersensitivity reaction of tomatoes resistant to *Meloidogyne incognita*: reversal by cytokinins. *Journal of Nematology*, **1**: 55-61.
- Dumas-Gaudot, E., Amiour, N., Weidmann, S., Bestel-Corre, G., Valot, B., Lenogue, S., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. 2004. A technical trick for studying proteomics in parallel to transcriptomics in symbiotic root-fungus interactions. *Proteomics*, **4**: 451-453.
- Durner, J., Klessig, D.F. 1999. Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**: 369-374.
- Ebel, J., Cosio, E.G. 1994. Elicitors of plant defense responses. *International Review of Cytology*, **148**: 1-36.
- Ebrahim-Nesbat, F., Behnke, S., Kleinhofs, A., Apel, K. 1989. Cultivar-related differences in the distribution of cell-wall-bound thionins in compatible and incompatible interactions between barley and powdery mildew. *Planta*, **179**: 203-210.

- Echandi, E.** 1970. Wilt of chickpeas or garbanzo beans (*Cicer arietinum* L.) incited by *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, **60**: 1539.
- Eckardt, N.A.** 2006. The role of flavonoids in root nodule development and auxin transport in *Medicago truncatula*. *The plant Cell*, **18**: 1539-1540.
- Edens, R.M., Anand, S.C., Bolla, R.I.** 1995. Enzymes of the phenylpropanoid pathway in soybean infected with *Meloidogyne Incognita* or *Heterodera Glycines*. *Journal of Nematology*, **27**: 292-303.
- El Modafar, C., El Boustani, E., Rahioui, B., El Meziane, A., El Alaoui-Talibi, Z.** 2006. Suppression of phenylalanine ammonia-lyase activity elicited in date palm by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* hyphal wall elicitor. *Biologia plantarum*, **50**: 697-700.
- Elling, A.E., Davis, E.L., Hussey, R.S., Baum, T.J.** 2007. Active uptake of cyst nematode parasitism proteins into the plant cell nucleus. *International Journal for Parasitology*, **37**: 1269-1279.
- El-Zahaby, H.M., Gullner, G., Király, Z.** 1995. Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate-glutathione cycle and other antioxidants in different host-plant pathogen interactions. *Phytopathology*, **85**: 1225-1230.
- Endo, B.Y.** 1987. Ultrastructure of esophageal gland secretory granules in juveniles of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, **19**: 469-483.
- Escobar, C., Fenoll, C.** 2007. Cambios en la expresión génica como resultado de la interacción planta-nematodo: métodos de estudio. En *Herramientas biotecnológicas en fitopatología* (V. Pallás, C. Escobar, P. Rodríguez Palenzuela, J. F. Marcos, eds.). Sociedad Española de Fitopatología, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España, pp. 41-58.
- Espelie, K., E., Franceschi, V.R., Kolattukudy, P.E.** 1986. Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. *Plant Physiology*, **81**: 487-492.
- Eulgem, T.** 2005. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends in Plant Science*, **10**: 71-78.
- Eulgem, T., Somssich, I.E.** 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**: 366-371.
- Fanelli, E., Di Vito, M., Jones, J.T., De Giorgi, C.** 2005. Analysis of chitin synthase function in a plant parasitic nematode, *Meloidogyne artiellia*, using RNAi. *Gene*, **349**: 87-95.
- FAO** 2007. Food and Agriculture Organization. FAOSTAT: Statistic Database
- Farag, M.A., Huhman, D.V., Dixon, R.A., Sumner, L.W.** 2008. Metabolomics reveals novel pathways

- and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiology*, **146**: 387-402.
- Farmer, E.E., Weber, H., Vollenweider, S.** 1998. Fatty acid signalling in *Arabidopsis*. *Planta*, **206**: 167-174.
- Fattah, F., Webster, J.M.** 1983. Ultrastructural changes caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Meloidogyne javanica* induced giant cells in *Fusarium* resistant and susceptible tomato cultivars. *Journal of Nematology*, **15**: 128-135.
- Favery, B., Chelysheva, L.A., Lebris, M., Jammes, F., Marmagne, A., De Almeida-Engler, J., Lecomte, P., Vaury, C., Arkowitz, R.A., Abad, P.** 2004. Arabidopsis formin AtFH6 is a plasma membrane-associated protein upregulated in giant cells induced by parasitic nematodes. *The plant Cell*, **16**: 2529-2540.
- Fecht-Christoffers, M.M., Braun, H.P., Lemaitre-Guillier, C., Van Dorselaer, A., Horst, W.J.** 2003. Effect of Manganese toxicity on the proteome of the leaf apoplast in cowpea. *Plant Physiology*, **133**: 1935-1946.
- Ferraris, L., Abbatista-Gentile, I., Matta, A.** 1987. Activation of glycosidases as a consequence of infection stress in Fusarium wilt of tomato. *Journal of Phytopathology*, **118**: 317-325.
- Ferreira, R., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, C.N., Chen, Z., Batista, L.M., Duarte, J., Borges, A., Teixeira, A.R.** 2007. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, **8**: 677-700.
- Ferris, H., Schneider, S.M., Semenov, M.C.** 1984. Distributed egg production functions for *Meloidogyne arenaria* in grape varieties and consideration of the mechanistic relationship between plant and parasite. *Journal of Nematology*, **16**: 178-183.
- Fioretti, L., Porter, A., Haydock, P.J., Curtis, R.** 2002. Monoclonal antibodies reactive with secreted-excreted products from the amphids and the cuticle surface of *Globodera pallida* affect nematode movement and delay invasion of potato roots. *International Journal for Parasitology*, **32**: 1709-1718.
- Fleming, C.C., McKinney, S., McMaster, S., Johnston, M.J.G., Donnelly, P., Kimber, M.J., Maule, A.G.** 2007. Getting to the root of neuronal signalling in plant-parasitic nematodes using RNA interference. *Nematology*, **9**: 301-315.
- Fofana, B., McNally, D.J., Lobbé C., Boulanger, R., Benhamou, N., Séguin, N., Bélanger, R.** 2002. Milsana-induced resistance in powder mildew-infected cucumber plants correlates with the

- induction of chalcone synthase and chalcone isomerase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **61**: 121-132.
- France, R.A., Abawi, G.S.** 1994. Interaction between *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* on selected bean cultivars. *Journal of Nematology*, **26**: 467-474.
- Fridborg, I., Grainger, J., Page, A., Coleman, M., Findlay, K., Angell, S.** 2003. TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of Potato virus X. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**: 132-140.
- Frisullo, S., Ciccarese, F., Amenduni, M., Zamani, H.R.** 1989. Wilt of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* Schlech. in southern Italy. *Diffesa delle Piante*, **12**: 181-185.
- Gachon, C., Mingam, A., Charrier, B.** 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, **55**: 1445-1454.
- Gao, B., Allen, R., Maier, T., Davis, E.L., Baum, T.J., Hussey, R.S.** 2003. The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **16**: 720-726.
- García, F.I., Di Pietro, A., Roncero, M.I.G.** 1997. Purification and characterization of a novel exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* *FEMS Microbiology letters*, **154**: 37-43.
- García-Limones, C., Hervás, A., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M., Tena, M.** 2002. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **61**: 325-337.
- García-Limones, C.** 2003. Inducción del sistema antioxidante de garbanzo y otros marcadores de estrés oxidativo en el curso de la interacción huésped-específica con *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 197 pp.
- García-Limones, C., Dorado, G., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M., Tena, M.** 2009. Changes in the redox status of chickpea roots in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: apoplastic antioxidant enzyme activities and expression of oxidative stress-related genes. *Plant Biology*, **11**: 194-203.
- García-Maceira, F.I., Di Pietro, A., Huertas-Gonzalez, M.D., Ruiz-Roldan, M.C., Roncero, M.I.** 2001. Molecular characterization of an endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* expressed during early stages of infection. *Applied Environmental Microbiology*, **67**: 2191-2196.
- García-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J.M., Rodríguez-Palenzuela, P.** 1998. Plant defense

- peptides. *Biopolymers (Peptide Science)*, **47**: 479-491.
- Gassmann, W., Hinsch, M.E., Staskawicz, B.J.** 1999. The Arabidopsis RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease resistance genes. *The Plant Journal*, **20**: 265-277.
- Gaumann, E.** 1951. Some problem of pathological wilting in plants. *Advance in Enzymology*, **11**: 491.
- Gaumann, E.** 1957. Fusaric acid as a wilt toxin. *Phytopathology*, **47**: 342-357.
- German, M.A., Kandel-Kfir, M., Swarzburg, D., Matsevitz, T., Granot, D.** 2003. A rapid method for the analysis of zygosity in transgenic plants. *Plant Science*, **164**: 183-187.
- Ghanekar, A.M., Sethi, S.C., Jalali, B.L., Nene, Y.L.** 1990. ICCV6 (ICCC32) a kabuli chickpea resistant to Fusarium wilt and Root rots. *International Chickpea Newsletter*, **23**: 22-23.
- Ghedini, E., Wang, S., Spiro, D., Caler, E., Zhao, Q., Crabtree, J., Allen, J. E., Delcher, A.L., Guiliano, D.B., Miranda-Saavedra, D., Angiuoli, S.V., Creasy, T., Amedeo, P., Haas, B., El-Sayed, N.M., Wortman, J.R., Feldblyum, T., Tallon, L., Schatz, M., Shumway, M., Koo, H., Salzberg, S.L., Schobel, S., Pertea, M., Pop, M., White, O., Barton, G.J., Carlow, C.K.S., Crawford, M.J., Daub, J., Dimmic, M.W., Estes, C.F., Foster, J.M., Ganatra, M., Gregory, W.F., Johnson, N.M., Jin, J., Komuniecki, R., Korf, I., Kumar, S., Laney, S., Li, B. W., Li, W., Lindblom, T.H., Lustigman, S., Ma, D., Maina, C.V., Martin, D.M.A., McCarter, J.P., McReynolds, L., Mitreva, M., Nutman, T.B., Parkinson, J., Peregrín-Alvarez, J.M., Poole, C., Ren, Q., Saunders, L., Sluder, A.E., Smith, K., Stanke, M., Unnasch, T.R., Ware, J., Wei, A.D., Weil, G., Williams, D.J., Zhang, Y., Williams, S.A, Fraser-Liggett, C., Slatko, B., Blaxter, M.L., Scott, A.L.** 2007. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science*, **317**: 1756–1760.
- Gheysen, G., Fenoll, C.** 2002. Gene expression in nematode feeding sites. *Annual Review of Phytopathology*, **40**: 191-219.
- Ghiran, I., Klickstein, L.B., Nicholson-Weller, A.** 2003. Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses CD59 as an adaptor molecule. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 21024-21031.
- Giovanelli, J., Mudd, S.H., Datko, A.H.** 1985. Quantitative analysis of pathways of methionine metabolism and their regulation in *Lemna*. *Plant Physiology*, **78**: 555-560.
- Glazebrook, J.** 2001. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*– 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**: 301-308.

- Glazebrook, J.** 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **43**: 205-227.
- Goddijn, M., Lindsey, K., Van der Lee, F., Klap, J., Sijmons, P.** 1993. Differential gene expression in nematode induced feeding structures of transgenic plants harboring promoter-gusA fusion constructs. *Plant Journal*, **4**: 863-873.
- Godinez-Vidal, D., Rocha-Sosa, M., Sepúlveda-García, E.B., Lara-Reyna, J., Rojas-Martínez, R., Zavaleta-Mejía, E.** 2007. Phenylalanine ammonia lyase activity in chilli CM-334 infected by *Phytophthora capsici* and *Nacobbus aberrans*. *European Journal of Plant Pathology* **120**: 1573-8469.
- Gomez, K.A., Gomez, A.A.** 1984. *Statistical Procedures for Agricultural Research*, John Wiley. New York, U.S.A. 671 pp.
- Gonçalves, M.C., Klerks, M.M., Verbeek, M., Vega, J., van den Heuvel, J.F.** 2002. The use of molecular beacons combined with NASBA for the sensitive detection of Sugarcane Yellow Leaf Virus. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 401-407.
- Görlach, J., Raesecke, H.R., Rentsch, D., Regenass, M., Roy, P., Zala, M., Keel, C., Boller, T., Amrhein, N., Schmid, J.** 1995. Temporally distinct accumulation of transcripts encoding enzymes of the prechorismate pathway in elicitor-treated cultured tomato cells. *Proceedings National Academy of Sciences U.S.A.*, **92**: 3166-3170.
- Goverse, A., Rouppe van der Voort, J., Rouppe van der Voort, C., Kavelaars, A., Smant, G., Schots, A., Bakker, J., Helder, J.** 1999. Naturally induced secretions of the potato cyst nematode co-stimulate the proliferation of both tobacco leaf protoplasts and human peripheral blood mononuclear cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**: 872-881.
- Goverse, A., de Almeida Engler, J., Verhees, J., van der Krol, S., Helder, J., Gheysen, G.** 2000. Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. *Plant Molecular Biology*, **43**: 747-761.
- Govrin, E.M., Levine, A.** 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology*, **124**: 21-29.
- Gowri, G., Paiva, N.L., Dixon, R.A.** 1991. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 12. Sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) cDNA clones and appearance of PAL transcripts in elicitor-treated cell cultures and developing fruits. *Plant Molecular Biology*, **17**: 415-429.
- Graham, L.S., Sticklen, M.B.** 1994. Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany*, **72**: 1057-1083.

- Greco, N., Di Vito, M., Reedy, M.V., Saxena, M.C.** 1984. A preliminary report of survey of plant-parasitic nematodes of leguminous crops in Syria. *Nematologia Mediterranea*, **12**: 87-93.
- Greco, N.** 1984. Presenza di *Meloidogyne artiellia* su cece in Italia. *Nematologia Mediterranea*, **12**: 235-238.
- Griffith, M., Ala, P., Yang, D.S.C., Hon, W.C., Moffatt, B.A.** 1992. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant Physiology*, **100**: 593-596.
- Griffiths, B.S., Robertson, W.M.** 1984. Morphological and histochemical changes occurring during the life-span of root-tip galls on *Lolium perenne* induced by *Longidorus elongatus*. *Journal of Nematology*, **16**: 223-229.
- Grisebach, H., Ebel, J.** 1978. Phytoalexins, chemical defense substances of higher plants? *Angewandte Chemie International Edition*, **17**: 635-647.
- Hahlbrock, K., Schell, D.** 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **40**: 339-367.
- Halila, H.N., Harabi, M.M.** 1990. Breeding for dual resistance to *Ascochyta* and wilt diseases in chickpea. *Options Méditerranéennes. Série Séminaires*, **9**: 163-166.
- Halila, M.H., Strange, R.N.** 1996. Identification of the causal agent of wilt of chickpea in Tunisia as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 0. *Phytopathologia Mediterranea*, **35**: 67-74.
- Halterman, D.A., Wei, F.S., Wise, R.P.** 2003. Powdery mildew-induced *Mla* mRNAs are alternatively spliced and contain multiple up-stream open reading frames. *Plant Physiology*, **131**: 558-567.
- Hammerschmidt, R.** 1999. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*, **37**: 285-306.
- Hammes, U.Z., Schachtman, D. P., Berg, R.H., Nielsen, E., Koch, W., McIntyre, L.M., Taylor, C.G.** 2005. Nematode-induced changes of transporter gene expression in *Arabidopsis* roots. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **18**: 1247-1257.
- Harari-Steinberg, O., Ohad, I., Chamovitz, D.A.** 2001. Dissection of the light signal transduction pathways regulating the two early light-induced protein genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **127**: 986-997.
- Harborne, J.B., Williams, C.A.** 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**: 481-504.
- Harris, A.R., Ferris, H.** 1991a. Interactions between *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* and *Meloidogyne* spp. in *Vigna unguiculata*. 1. Effects of different inoculum densities on *Fusarium* wilt

Plant Pathology, **40**: 445-456.

- Harris, A.R., Ferris, H.** 1991b. Interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* and *Meloidogyne* spp. in *Vigna unguiculata*. 2. Especificity of different taxa. *Plant Pathology*, **40**: 457-464.
- Harris, A.R., Ferris, H.** 1991c. Interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* and *Meloidogyne* spp. in *Vigna unguiculata*. 3. Pathogenesis by *F. o. tracheiphilum* as effected by *M. javanica* and host cultivar. *Plant Pathology*, **40**: 465-475.
- Haware, M.P., Nene, Y.L., Rajeshwari, R.** 1978. Erradication of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* transmitted in chickpea seed. *Phytopathology*, **68**: 1364-1367.
- Haware, M.P., Nene, Y. L.** 1982. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Disease*, **66**: 809-810.
- Haware, M.P., Nene, Y. L., Mathur, S. B.** 1986a. Seed borne diseases of chickpea. *Technical Bulletin 1*, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Copenhagen, DK., 32 pp.
- Haware, M.P., Nene, Y.L., Mathur, S.B.** 1986b. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in soil in absence of chickpea. En *Management of Soilborne Diseases of Crop Plants: Proceeding of National Seminar*. Coimbatore, India: Tamil Nadu Agricultural University, pp. 8-10.
- Haware, M.P.** 1990. Fusarium wilt and other important diseases of chickpea in the Mediterranean area. *Options Méditerranéennes Série Séminaires*, **9**: 61-64.
- Haware, M.P., Nene, Y.L.** 1980. Influence of wilt at different stages on the yield loss in chickpea. *Tropical Grain Legume Bulletin*, **19**: 38-40.
- Haware, M.P., Nene, Y.L.** 1982. Symptomless carriers of the chickpea wilt Fusarium. *Plant Disease*, **66**: 250-251.
- Hawtin, G.C., Chancellor, G.J.** 1978. Food legume improvement and development. En *Proceeding of Workshop Held at the University of Aleppo*. ICARDA y IDRC, Syria. 216 pp.
- Heath, M.C.** 1980. Reaction of nonsuscepts to fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **18**: 211-236.
- Heath, M.C.** 1998. Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology*, **104**: 117-144.
- Heil, M., Baldwin, I. T.,** 2002. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science*, **7**: 61-67.

- Hemming, M.N., Basuki, S., McGrath, D.J., Carroll, B.J., Jones, D.A.. 2004. Fine mapping of the tomato *I-3* gene for *Fusarium* wilt resistance and elimination of a co-segregating resistance gene analogue as a candidate for I-3. *Theoretical and Applied Genetics*, **109**: 409-418.
- Hernández Fernández, V., Martín Barbarroja, J., Jiménez Díaz, R.M., Castillo, P. 2005. Reproductive fitness of *Meloidogyne artiellia* populations on chickpea and durum wheat. *Nematology*, **7**: 243-247.
- Hervás, A., Trapero Casas, J.L., Jiménez Díaz, R.M. 1995. Induced resistance against *Fusarium* wilt of chickpea by nonpathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and nonpathogenic isolates of *F. oxysporum*. *Plant Disease*, **79**: 1110-1116.
- Hervás, A., Landa, B., Jiménez Díaz, R.M. 1997. Influence of chickpea genotype and *Bacillus* sp. on protection from *Fusarium* wilt by seed treatment with nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Plant Pathology*, **103**: 631-642.
- Hervás, A., Landa, B., Datnoff, L., Jiménez Díaz, R.M. 1998. Effects of commercial and indigenous microorganisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. *Biological Control*, **13**: 166-176.
- Hillocks, R.J. 1985. The effect of root-knot nematode on vascular resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in the stems of cotton plants. *Annals of Applied Biology*, **107**: 213-218.
- Hillocks, R.J. 1986. Cross protection between strains of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and its effect on vascular resistance mechanisms. *Journal of Phytopathology*, **117**: 216-225.
- Hoagland, D.R., Arnon, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*, **37**: 1-32.
- Hofius, D., Tsitsigiannis, D.I., Jones, J.D.G., Mundy, J. 2007. Inducible cell death in plant immunity. *Seminars in Cancer Biology*, **17**: 166-187.
- Hong, J.K., Hwang, B.K. 2002. Induction by pathogen, salt and drought of a basic class II chitinase mRNA and its in situ localization in pepper (*Capsicum annuum*). *Physiologia Plantarum*, **114**: 549-558.
- Houterman, P.M., Speijer, D., Dekker, H.L., De Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C., Rep, M. 2007. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. *Molecular Plant Pathology*, **8**: 215-221.
- Hrazdina, G., Jensen, R.A. 1992. Spatial organization of enzymes in plant metabolic pathways. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*, **43**: 241-267.
- Hrazdina, G., Wagner, G.J. 1985. Metabolic pathways as enzyme complexes: evidence for the

synthesis of phenylpropanoids and flavonoids on membrane associated enzyme complexes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **237**: 88-100.

Huang, C.C., Lindhout, P. 1997. Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2. *Euphytica*, **93**: 145-153.

Huang, G., Gao, B., Maier, T., Allen, R., Davis, E.L., Baum, T.J., Hussey, R.S. 2003. A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **16**: 376-381.

Huang, G., Allen, R., Davis, E.L., Baum, T.J., 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. *Proceedings National Academy of Sciences U.S.A.*, **103**: 14302-14306.

Huang, G.Z., Dong, R.H., Allen, R., Davis, E.L., Baum, T.J., Hussey, R.S. 2005. Two chorismate mutase genes from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant Pathology*, **6**: 23-30.

Huertas-Gonzalez, M.D., Ruiz-Roldan, M.C., Garcia Maceira, F.I., Roncero, M.I., Di Pietro, A. 1999. Cloning and characterization of *p17* encoding an in planta-secreted pectate lyase of *Fusarium oxysporum*. *Current Genetics*, **35**: 36-40.

Hussey, R.S., Grundler, F.M.W. 1998. Nematode parasitism of plants. En *Physiology and Biochemistry of Free-Living and Plant-Parasitic Nematodes* (R.N. Perry, D. J. Wright, eds.). CAB International Publishing, Wallingford, U.K., pp 213-236.

Hussey, R.S., Baker, K.R. 1973. *Plant Disease Reports* **57**: 1025-1028.

Hutangura, P., Mathesius, U., Jones, M.G.K., Rolfe, B.G. 1999. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. *Australasian Journal of Plant Physiology*, **26**: 221-231.

ICRISAT 1975. Proceedings of the international workshop in grain legumes. Hyderabad, India. 350 pp.

ICRISAT 1979. Proceedings of the international workshop in grain legumes. Hyderabad, India. 350 pp.

ICRISAT 1980. Proceedings of the international workshop in grain legumes. Hyderabad, India. 350 pp.

Ingham, D.J., Beer, S., Money, S., Hansen, G. 2001. Quantitative real-time PCR assay for determining transgene copy number in transformed plants. *BioTechniques*, **31**: 132, 134, 136-140.

Ingham, J.L. 1982. Phytoalexins from the Leguminosae. En *Phytoalexins* (J.A. Bailey, J.W. Mansfield, eds.). Blackie, Glasgow, U.K., pp. 21-80.

- Iseli, B., Boller, T., Neuhaus, J.M.** 1993. The N-terminal cysteine-rich domain of tobacco class I chitinase is essential for chitin binding but not for catalytic or antifungal activity. *Plant Physiology*, **103**: 221-223.
- Ithal, N., Recknor, J., Nettleton, D., Maier, T., Baum, T.J., Mitchum, M.G.** 2007. Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **20**: 510–525.
- Itoh, R., Fujiwara, M., Nagata, N., Yoshida, S.** 2001. A chloroplast protein homologous to the eubacterial topological specificity factor MinE plays a role in chloroplast division. *Plant Physiology*, **127**: 1644–1655.
- Ivashikina, N., Deeken, R., Ache, P., Kranz, E., Pommerrenig, B., Sauer, N., Hedrich, R.** 2003. Isolation of AtSUC2 promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp studies and expression profiling. *The Plant Journal*, **36**: 931-945.
- Jackson, C.R., Minton, N. A.** 1968. Pod invasion by fungi in the presence of lesion nematodes in Georgia. *Oleaginoux*, **23**: 531-534.
- Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R. A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., Fincher, G.B.** 2003. An *Arabidopsis* callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation. *The plant Cell*, **15**: 2503–2513.
- Jacobs, M., Rubery, P.H.** 1988. Naturally occurring auxin transport regulators. *Science*, **241**: 346-349.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Carbajosa, J.V., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F.** 2002. bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science*, **7**: 106-111.
- Jalali, B.L., Chand, H.** 1992. Chickpea wilt. En *Plant Diseases of International Importance. Vol. I Diseases of Cereals and Pulses* (U.S. Singh, A.N. Mukhopadhyay, J. Kumar, H.S. Chaube, eds.). Prentice Hall, Englewood Cliffs, New York, U.S.A., pp. 429-444.
- Jalali, B.L., Bhargava, S., Kamble, A.** 2006. Signal Transduction and Transcriptional Regulation of Plant Defence Responses. *Journal of Phytopathology*, **154**: 65-74.
- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G., Pont-Lezica, R.F.** 2006. Cell wall proteins: a new insight through proteomics. *Trends in Plant Science*, **11**: 33-39.
- Jammes, F., Lecomte, P., de Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M.L., Renou, J.P., Abad, P., Favery, B.** 2005. Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, **44**: 447-458.
- Jaubert, S., Ledger, T.N., Laffaire, J.B., Piotte, C., Abad, P., Rosso, M.N.** 2002. Direct identification

- of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **121**: 205-211.
- Jiménez Díaz, R.M., Trapero Casas, A.** 1985. Use of fungicide treatments and host resistance to control the wilt and root complex of chickpea. *Plant Disease*, **69**: 591-595.
- Jiménez Díaz, R.M., Basallote Ureba, M. J., Rapoport, H.** 1989a. Colonization and pathogenesis in chickpeas infected by races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. En *Vascular wilt diseases in plants* (E.C. Tjamos, C.H. Beckman, eds.). NATO ASI Series, Vol. H28, Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, pp. 113-121.
- Jiménez Díaz, R.M., Trapero Casas, A., Cabrera de la Colina, J.** 1989b. Races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpeas in southern Spain. En *Vascular wilt diseases in plants* (E.C. Tjamos, C.H. Beckman, eds.). NATO ASI Series, Vol. H28, Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, pp. 515-520.
- Jiménez Díaz, R.M., Trapero Casas, A., Cubero, J.I.** 1989c. Importance of chickpea soilborne diseases in the Mediterranean basin. En *Proceedings of the consultancy Meeting on Breeding for Disease Resistance in Kabuli Chickpeas* (ICARDA, ed.). Aleppo, Syria, pp. 196.
- Jiménez Díaz, R.M., Crino, P., Halila, M.H., Mosconi, C., Trapero Casas, A.T.** 1993a. Screening for resistance to fusarium wilt and ascochyta blight in chickpea. En *Breeding for stress tolerance on cool-season food legumes* (K.B. Singh, M.C. Saxena, eds.). ICARDA, John Wiley & Sons, Chichester, U.K., pp 77-95.
- Jiménez Díaz, R.M., Alcalá Jiménez, A., Hervás, A., Trapero Casas, J.L.** 1993b. Pathogenic variability and host resistance in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/Cicer *arietinum* pathosystem. En *Proc. 3rd. European Seminar: Fusarium-mycotoxins, taxonomy, pathogenicity and host resistance*. Hodowla Róślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo (Special Edition), Poland, pp. 87-94.
- Jiménez Díaz, R.M.** 1994. La Fusariosis Vascular del garbanzo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Quince años de investigación en España. *Investigación Agraria, Fuera de serie n°2*: 285-294.
- Jiménez Gasco, M.M., Pérez Artés, E., Jiménez Díaz, R.M.** 2001. Identification of pathogenic races 0, 1B/C, 5 and 6 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* with random amplified polymorphic DNA (RAPD). *European Journal of Plant Pathology*, **107**: 237-248.
- Jiménez Gasco, M.M., Jiménez Díaz, R.M.** 2003. Development of a specific polymerase chain reaction-

- based assay for the identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and its pathogenic races 0, 1A, 5 y 6. *Phytopathology*, **93**: 200-209.
- Jiménez-Díaz, R.M.** 1992. Conceptos actuales sobre la resistencia a las enfermedades de las plantas. *Phytoma*, **38**: 51-55.
- Jones, J.D., Dangl, J.L.** 2006. The plant immune system. *Nature*, **444**: 323-329.
- Jones, J.T., Perry, R.N., Johnston, M.R.L.** 1994. Changes in the ultrastructure of the amphids of the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* during development and infection. *Fundamental and Applied Nematology*, **17**: 369-382.
- Jones, J.T., Furlanetto, C., Bakker, E., Banks, B., Block, V.** 2003. Characterization of a chorismate mutase from the potato cyst nematode *Globodera pallida*. *Molecular Plant Pathology*, **4**: 43-50.
- Jones, M.G.K., Northcote, D.H.** 1972. Nematode-Induced Syncytium--A Multinucleate Transfer Cell *Journal Cell Science*, **10**: 789-809.
- Jones, M.G.K., Payne, H.L.** 1978. Early stages of nematode-induced giant cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. *Journal of Nematology*, **10**: 70-84.
- Jorge, I.** 2003. Enzimas degradativos de la pared celular vegetal como factores de patogenicidad asociados al sistema garbanzo / *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Fusariosis Vascular del Garbanzo). Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 191 pp.
- Jorge, I., de la Rosa, O., Navas-Cortés, J.A., Jimenez-Díaz, R.M., Tena, M.** 2005. Extracellular xylanases from two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*: enzyme production in culture and purification and characterization of a major isoform as an alkaline endo-beta-(1,4)-xylanase of low molecular weight. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, **88**: 48-59.
- Jorge, I., Navas-Cortés, J.A., Jimenez-Díaz, R.M., Tena, M.** 2006. Cell wall degrading enzymes in fusarium wilt of chickpea: correlation between pectinase and xylanase activities and disease development in plants infected with two pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique*, **84**: 1395-1404.
- Jorgenson, E.C.** 1970. Antagonistic interaction of *Heterodera schachtii* Schmidt and *Fusarium oxysporum* (Woll) on sugarbeets. *Journal of Nematology*, **2**: 393-398.
- Jorrín, J.V., Maldonado, A.M., Castillejo, M.A.** 2007. Plant proteome analysis: A 2006 update. *Proteomics*, **7**: 2947-2962.
- Junghans, H., Dalkin, K., Dixon, R.A.** 1993. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 15.

Characterization and expression patterns of members of a subset of the chalcone synthase multigene family. *Plant Molecular Biology*, **22**: 239-253.

Kaiser, W.J., Alcalá Jiménez, A. R., Hervás, A., Trapero Casas, J.L., Jiménez Díaz, R.M. 1994. Screening of wild *Cicer* species for resistance to races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Disease*, **79**: 962-967.

Kalyanasundaram, R., Venkata Ram, C.S. 1956. Production and systemic translocation of fusaric acid in *Fusarium* infected cotton plants. *Journal of the Indian Botanical Society*, **35**: 7-10.

Kannaiyan, J. 1981. Diseases of chickpea in Malawi. *International Chickpea Newsletter*, **4**: 16.

Kaplan, D.T., Keen, N.T., Thomason, I.J. 1980. Studies on the mode of action of glyceollin in soybean. Incompatibility to the root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **16**: 319-325.

Karczmarek, A., Overmars, H., Helder, J., Goverse, A. 2004. Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and transient activation of a specific auxin-inducible promoter element. *Molecular Plant Pathology*, **5**: 343-346.

Karsen, G., Moens, M. 2006. Root-knot nematodes. En *Plant Nematology* (R.N. Perry, M. Moens, eds.). *Plant Nematology*. CABI publishing, Wallingford, U.K., pp. 59-90.

Kathiresan, T., Mehta, U.K. 2005. Effect of *Pratylenchus zae* infection on the expression of isozyme activities in resistant and susceptible sugarcane clones. *Nematology*, **7**: 677-688.

Kawalleck, P., Plesch, G., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. 1992. Induction by fungal elicitor of S-adenosyl-L-methionine synthetase and S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase mRNAs in cultured cells and leaves of *Petroselinum crispum*. *Proceedings National Academy of Sciences*, **89**: 4713-4717.

Kelly, A.G., Alcalá Jiménez, A.R., Bainbridge, B.W., Heale, J. B., Pérez Artés, E., Jiménez Díaz, R.M. 1994. Use of genetic fingerprinting and random amplified polymorphic DNA to characterize pathotypes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* infecting chickpea. *Phytopathology*, **84**: 1293-1298.

Kelly, A.G., Bainbridge, B.W., Heale, J.B., Pérez Artés, E., Jiménez Díaz, R.M. 1998. In planta-polymerase-chain-reaction detection of the wilt-inducing pathotype of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **52**: 397-409.

Keppler, L.D., Novacky, A. 1986. Involvement of membrane lipid peroxidation in the development of a bacterial induced hypersensitive reaction. *Phytopathology*, **76**: 104-108.

- Kerk, N.M., Ceserani, T., Tausta, S.L., Sussex, I.M., Nelson, T.M.** 2003. Laser capture microdissection of cells from plant tissues. *Plant Physiology*, **132**: 27-35.
- Keßman, H., Barz, W.** 1987. Accumulation of isoflavones and pterocarpan phytoalexins in cell suspension cultures of different cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cell Reports*, **6**: 55-59.
- Kessmann, H., Barz, W.** 1987. Accumulation of isoflavones and pterocarpans phytoalexins in cell suspension cultures of different cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Plant Cellular Reports*, **6**: 55-59.
- Khan, F.Z., Milton, J.M.** 1979. Some factors affecting the production of medicarpin and sativan by lucerne leaflets in response to *Verticillium alboatrum*. *Physiological Plant Pathology*, **14**: 11-17.
- Khan, I.A., Jabbar, A., Alam, S.S.** 2004. Purification of phytotoxin from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* f.sp *ciceris* and its biological effects on chickpea. *Pakistan Journal of Botany*, **36**: 871-880.
- Khan, I.A., Alam, S.S., Haq, A., Jabbar, A.** 2005. Biochemistry of resistance in chickpea against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp *ciceris*. *Pakistan Journal of Botany*, **37**: 97-104.
- Khan, M.W.** 1993. *Nematode interactions*, London and New York: Chapman y Hall., 377 pp.
- Kim, M.C., Panstruga, R., Elliot, C., Muller, J., Devoto, A., Yoon, H.W., Park, H.C., Cho, M J., Schulze-Lefert, P.** 2002. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature*, **416**: 447-451.
- Klink, V.P., Overall, C.C., Alkharouf, N.W., MacDonald, M., Matthews, B.F.** 2007. Laser capture microdissection (LCM) and comparative microarray expression analysis of syncytial cells isolated from incompatible and compatible soybean (*Glycine max*) roots infected by the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Planta*, **226**: 1389–1409.
- Kochba, J., Samish, R.M.** 1971. Effect of kinetin and 1-naphthylacetic acid on root-knot nematodes in resistant and susceptible peach rootstocks. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **96**: 458-461.
- Kochba, J., Samish, R.M.** 1972. Level of endogenous cytokinins and auxin in roots of nematode-resistant and susceptible peach rootstocks. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **97**: 115-119.
- Kyrou, N.C.** 1969. First record of occurrence of *Meloidogyne artiellia* on wheat in Greece. *Nematologica*, **3**: 432-433.

- Laemmlí, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lairini, K., Pérez-Espinosa, A., Pineda, M., Ruiz-Rubio, M.** 1996. Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Applied Environmental Microbiology*, **62**: 1604-1609.
- Lamb, C., Dixon, R.A.** 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**: 251-275.
- Lambert, K.N., Williamson, V.M.** 1993. cDNA library construction from small amounts of RNA using paramagnetic beads and PCR. *Nucleic Acid Research*, **21**: 775-776.
- Lambert, K.N., Allen K.D., Sussex, I.M.** 1999. Characterization of an esophageal-gland-specific chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **12**: 328-336.
- Lamberti, F., Roca, F.** 1987. Present status of nematodes as vectors of plant viruses. En *Vistas on Nematology* (J.A. Veech, D.W. Dickson, eds.). Society of Nematologist, Hyaattsville, Maryland, U.S.A., pp. 321-328.
- Landa, B.** 1999. Control Biológico de la Fusariosis Vascular del Garbanzo Mediante Antagonistas Microbianos. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 527 pp.
- Landa, B., Navas Cortés, J.A., Hervás, A., Jiménez Díaz, R.M.** 2001. Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology*, **91**: 807-816.
- Landa, B.B., Navas Cortés, J.A., Jiménez Díaz, R.M.** 2004. Integrated management of fusarium wilt of chickpea with showing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology*, **94**: 946-960.
- Larson, R.L., Hill, A.L., Nuñez, A.** 2007. Characterization of protein changes associated with sugar beet (*Beta vulgaris*) resistance and susceptibility to *Fusarium oxysporum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 7905–7915.
- Laureys, F., Dewitte, W., Witters, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Onckelen, H.** 1998. Zeatin is indispensable for the G2-M transition in tobacco BY-2 cells. *FEBS letters*, **426**: 29-32.
- Ledger, T.N., Jaubert, S., Bosselut, N., Abad, P., Rosso, M.N.** 2006. Characterization of a new beta-1,4-endoglucanase gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and evolutionary scheme for phytonematode family 5 glycosyl hydrolases. *Gene*, **382**: 121-128.
- Leister, R.T., Dahlbeck, D., Day, B., Li, Y., Chesnokova, O., Staskawicz, B.J.** 2005. Molecular

- genetic evidence for the role of SGT1 in the intramolecular complementation of Bs2 protein activity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, **17**: 1268-1278.
- Lengeler, K.B., Davidson, R.C., D'Souza, C., Harashima, T., Shen, W.C., Wang, P., Pan, X., Waugh, M., Heitman, J.** 2000. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**: 746-785.
- Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R., Lamb, C.** 1996. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Current Biology*, **6**: 427-437.
- Li, K., Härtig, E., Klug, G.** 2003. Thioredoxin 2 is involved in oxidative stress defence and redox-dependent expression of photosynthesis genes in *Rhodobacter capsulatus*. *Microbiology*, **149**: 419-430.
- Lim, G.T.T., Wang, G.P., Hemming, M.N., Basuki, S., McGrath, D.J., Carroll, B.C., Jones, D.A.** 2006. Mapping the *I-3* gene for resistance to *Fusarium* wilt in tomato: application of an *I-3* marker in tomato improvement and progress towards the cloning of *I-3*. *Australasian Plant Pathology*, **35**: 671-680.
- Lindeberg, M., Cartinhour, S., Myers, C.R., Schechter, L.M., Schneider, D.J., Collmer, A.** 2006. Closing the circle on the discovery of genes encoding Hrp regulon members and type III secretion system effectors in the genomes of three model *Pseudomonas syringae* strains. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **19**: 1151-1158.
- Lindsay, W.P., McAlister, F.M., Zhu, Q., He, X., Dröge-Laser, W., Hedrick, S., Doerner, P., Lamb, C., Dixon, A.** 2002. KAP-2, a protein that binds to the H-box in a bean chalcone synthase promoter, is a novel plant transcription factor with sequence identity to the large subunit of human Ku autoantigen. *Plant Molecular Biology*, **49**: 503-514.
- Liu, C.J., Dixon, R.A.** 2001. Elicitor-induced association of isoflavone O-methyltransferase with endomembranes prevents formation and 7-O-methylation of daidzein during isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. *Plant Cell*, **13**: 2643-2658.
- López-Meyer, M., Paiva, N.L.** 2002. Immunolocalization of vestitone reductase and isoflavone reductase, two enzymes involved in the biosynthesis of the phytoalexin medicarpin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **61**: 15-30.
- Lottspeich, F.** 1999. Proteome analysis: A pathway to the functional analysis of proteins. *Angewandte Chemie-International Edition*, **38**: 2477-2492.
- Ma, W., Guttman, D.S.** 2008. Evolution of prokaryotic and eukaryotic virulence effectors. *Current*

Opinion in Plant Biology, **11**: 412-419.

- Mace, M.E., Veech, J A., Beckman, C.H.** 1972. Fusarium wilt of susceptible and resistant isolines: histochemistry of vascular browning. *Phytopathology*, **62**: 651-654.
- Mackenbrock, U., Vogelsang, R., Barz, W.** 1992. Isoflavone and pterocarpan malonylglucosides and B-1,3-glucan- and chitin-hydrolases are vacuolar constituents in chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Zeitschrift für Naturforschung*, **47**: 815-822.
- Mackey, D., MacFall, A.J.** 2006. MAMPs and MIMPS: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology*, **61**: 1365-1371.
- Madrid, M.P., Di Pietro, A., Roncero, M.I.G.** 2003. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defense compounds. *Molecular Microbiology*, **47**: 257-266.
- Mai, W.F., Abawi, G.S.** 1987. Interactions among root-knot nematodes and *Fusarium* wilt fungi on host plants *Annual Review of Phytopathology*, **25**: 317-338.
- Mamluk, O.F., Augustin, B., Bellar, M.** 1983. New records of cyst and root-knot nematode on legume crops in the dry areas of Syria. *Phytopathologia Mediterranea*, **22**: 80.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., Toussoun, T.A.** 1984. *Toxigenic Fusarium species, identity and mycotoxicology*. Pennsylvania State University Press, University Park., PA, U.S.A., 328 pp.
- Marley, P.S., Hillocks, R.J.** 1993. The role of phytoalexins in resistance to Fusarium wilt in pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Plant Pathology*, **42**: 212-218.
- Marley, P.S., Hillocks, R.J.** 1994. Effect of root-knot nematodes on cajanol accumulation in the vascular tissues of pigeonpea after stem inoculation with *Fusarium udum*. *Plant Pathology*, **43**: 172-176.
- Marley, P.S., Hillocks, R.J.** 1996. Effect of Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on Fusarium wilt in Pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Field Crops Research*, **46**: 15-20.
- Matern, U., Kneusel, R.E.** 1988. Phenolic compounds in plant disease resistance. *Phytoparasitica*, **16**: 153-170.
- Mathesius, U., Schlaman, H.R.M., Spaink, H.P., Sautter, C.R., Rolfe, B.G., Djordjevic, M.A.** 1998. Auxin transport inhibition proceeds root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *The Plant Journal*, **14**: 23-24.
- Mathesius, U., Keijzers, G., Natera, S.H.A., Weinman, J.J., Michael, A.D.** 2001. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass finger-printing. *Proteomics*, **1**: 1424-1440.

- Mathesius, U.** 2001b. Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 419-426.
- Mathesius, U., Mulders, S., Gao, M.S., Teplitski, M., Caetano-Anolles, G., Rolfe, B.G., Bauer, W.D.** 2003. From the Cover: Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals *Proceedings National Academy of Sciences*, **100**: 1444-1449.
- Matta, A.** 1989. Induced resistance to Fusarium wilt diseases. En *Vascular wilt diseases in plants* (E.C. Tjamos, C.H. Beckman, eds.). NATO ASI Series, Vol. H28, Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, pp. 157-196.
- Mauch, F., Staehelin, L.A.** 1989. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *The plant Cell*, **1**: 447-457.
- Mayer, A., Staples, R.C., Gil-ad, M.L.** 2001. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in host expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry*, **58**: 33-41.
- Mayer, Z., Bagnara, A., Färber, P., Geisen, R.** 2003. Quantification of the copy number *nor-1*, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, **82**: 143-151.
- McCartney, H.A., Foster, S.J., Fraaije, B.A., Ward, E.** 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*, **59**: 129-142.
- McDowell, J.M., Woffenden, B.J.** 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology*, **21**: 178-183.
- Melakeberhan, H., Brooke, R.C., Webster, J.M.** 1986. Relationship between physiological response of French beans of different age to *Meloidogyne incognita* and subsequent yield loss. *Plant Pathology*, **35**: 203-213.
- Melchers, L.S., Tigelaar, H., Sela-Burlage, M.B., Ponstein, A.S., van Roekel, J.S.C., Bres-Vloemans, S.A., Cornelissen, B.J.C., Logemann, J., Jongedijk, E.** 1993. Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances *Fusarium* resistance in transgenic tomato plants. Abstract No. 83. *Molecular genetics of plant-microbe interactions conference*, Rutgers, NJ, U.S.A.
- Melendez, P.L., Powell, N.T.** 1967. Histological aspects of Fusarium wilt-root-knot complex in flue-cured tobacco. *Phytopathology*, **57**: 286-292.
- Melillo, M.T., Leonetti, P., Bongiovanni, M., Castagnone-Sereno, P., Bleve-Zacheo, T.** 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. *New Phytologist*, **170**: 501-512.

- Mercer, C.F., Greenwood, D.R., Grant, J.L.** 1992. Effects of plant and microbial chitinases on the eggs and juveniles of *Meloidogyne hapla* Chitwood. *Nematologica*, **8**: 227-236.
- Mes, J.J., van Doorn, A.A., Wijbrandi, J., Simons, G., Cornelissen, B.J.C., Haring, M. A.** 2000. Expression of the Fusarium resistance gene *I-2* colocalizes with the site of fungal containment. *Plant Journal*, **23**: 183-194.
- Metcalf, R.L.** 1987. Plant volatiles as insect attractants CRC Critical Review. *Plant Science*, **5**: 251-301.
- Metha, A., Brasileiro, A.C.M., Souza, D.S.L., Romano, E., Campos, M.A., Grossi-de-Sá, M.F., Franco, O.L., Fragoso, R.R., Bevitori, R., Rocha, T.L.** 2008a. Plant–pathogen interactions: what is proteomics telling us? *The FEBS Journal*, **275**: 3731-3746.
- Metha, A., Magalhães, B.S., Souza, D.S.L., Vasconcelos, E.A.R., Silva, L.P., Grossi-de-Sa, M.F., Franco, O.L., da Costa, P.H.A., Rocha, T.L.** 2008b. Rootomics: the challenge of discovering plant defense-related proteins in roots. *Current Protein and Peptide Science*, **9**: 108-116.
- Meyers, B.C., Galbraith, D.W., Nelson, T., Agrawal, V.** 2004. Methods for transcriptional profiling in plants: be fruitful and replicate. *Plant Physiology*, **135**: 637-652.
- Miché, L., Battistoni, F., Gemmer, S., Belghazi, M., Reinhold-Hurek, B.** 2006. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **19**.
- Milosevic, N., Slusarenko, A.J.** 1996. Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **49**: 143-158.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Golley, M., Van Breusegem, F.** 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, **9**: 490-498.
- Moerschbacher, B.M., Noll, U., Gorrichon, L., Reisener, H.J.** 1990. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Plant Physiology*, **93**: 465-470.
- Moerschbacher, B.M.** 1992. Plant peroxidases: involvement in response to pathogens. En *Plant Peroxidases 1980-1990: Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects* (C. Penel, T. Gaspar, eds.). University of Geneva, Suiza, pp. 91-99.
- Mohamed, M.A., Adb-Elgawad, M.M.** 2003. Differential induction of peroxidases in tomato roots in response to *Meloidogyne incognita* invasion. *International Journal of Nematology*, **13**: 20-26.
- Molinari, S., Miicola, C.** 1997. Interactions between resistant tomato cvs and *Meloidogyne* spp. *in vitro*. *Nematologia Mediterranea*, **25**: 63-71.
- Mooney, B.P., Miernyka, J.A., Greenlief, C.M., Thelen, J.J.** 2006. Using quantitative proteomics of

- Arabidopsis* roots and leaves to predict metabolic activity. *Physiologia Plantarum*, **128**: 237-250.
- Morales, G.J.A.** 1986. Chickpea breeding program in southern Mexico. *International Chickpea Newsletter*, **15**: 11-12.
- Moreno, J.I., Martín, R., Castresana, C.** 2005. Arabidopsis SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *The Plant Journal*, **41**: 451-463.
- Morkunas, I., Marczak, Ł., Stachwiak, J., Stobiecki, M.** 2005. Sucrose-induced lupine defense against *Fusarium oxysporum*. Sucrose-stimulated accumulation of isoflavonoids as a defense response of lupine to *Fusarium oxysporum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **43**: 363-373.
- Morris, A.C., Djordjevic, M.A.** 2001. Proteome analysis of cultivar-specific interactions between *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii and subterranean clover cultivar Woogenellup. *Electrophoresis*, **22**: 586-598.
- Mysore, K.S., Ryu, C.M.** 2004. Non-host resistance: how much do we know?. *Trends in Plant Science*, **9**: 97-104.
- Nakazono, M., Qiu, F., Borsuk, L.A., Schnable, P.S.** 2003. Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *Plant Cell*, **15**: 583-596.
- Naoumkina, M., Farag, M.A., Sumner, L.W., Tang, Y., Liu, C.J., Dixon, R.A.** 2007. Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proceedings National Academy of Sciences U.S.A.*, **104**: 17909-17915.
- Narasimhan, R.** 1929. A preliminary note on a *Fusarium* parasitic on Bengal gram (*Cicer arietinum* L.). *Madras Agriculture Department, Year Book 1928*: 5-11.
- Nath, R.P., Banerjee, A.K., Haidar, M.G., Sinha, B.K.** 1979. Studies on the nematodes of pulse crops in India. I. Pathogenicity of *Meloidogyne incognita* on gram. *Indian Journal of Phytopathology*, **32**: 28-31.
- Navas, A., López, J.A., Espárrago, G., Camafeita, E., Albar, J.P.** 2002. Protein variability in *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) revealed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *The Journal of Proteome Research*, **1**: 421-427.
- Navas-cortés, J.A., Hau, B., Jiménez Díaz, R.M.** 1998a. Effect of sowing date, host cultivar and race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of Fusarium wilt of chickpea. *Phytopathology*, **88**: 1338-1346.

- Navas-Cortés, J.A., Rodríguez-Jurado, D., Jiménez-Díaz, R.M.** 1998b. Combined resistance against *Didymella rabiei* and races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in kabuli chickpea. In *3rd European Conference on Grain Legumes, Opportunities for High Quality, Healthy and Added-Value Crops to Meet European Demand*. Association for Grain Legumes, Valladolid, España, pp. 124-125.
- Navas Cortés, J.A., Alcalá Jiménez, A.R., Hau, B., Jiménez Díaz, R.M.** 2000. Influence of inoculum density of races 0 and 5 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, **106**: 135-146.
- Navas-Cortés, J.A., Landa, B.B., Rodríguez-López, J., Jiménez-Díaz, R.M., Castillo, P.** 2008. Infection by *Meloidogyne artiellia* does not break down resistance to races 0, 1A, and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in chickpea genotypes. *Phytopathology*, **98**: 709-718.
- Nelson, T., Tausta, S.L., Gandotra, N., Liu, T.** 2006. Laser microdissection of plant tissue: What you see is what you get. *Annual Review of Plant Biology*, **57**: 181-201.
- Nene, Y.L.** 1980. Diseases of chickpea. En *Proceedings of The International Workshop on Chickpea Improvements* (ICRISAT, ed.). Hyderabad, India, pp. 171-187.
- Nene, Y.L., Haware, M.P.** 1980. Screening chickpea for resistance to wilt. *Plant Disease*, **64**: 379-380.
- Nene, Y.L., Sheila, V.K., Sharma, S.B.** 1984. A world list of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) pathogens *ICRISAT Pulse Pathology Progress Report*, **8**: 19.
- Nene, Y.L., Reddy, M.V.** 1987. Chickpea diseases and their control. En *The Chickpea* (M.C. Saxena, K.B., Singh, eds.) C.A.B. International, Oxford, U.K., pp. 223-270.
- Neuhoff, V., Stamm, R., Eibl, H.** 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis*, **6**: 427-448.
- Ni, W., Fahrendorf, T., Ballance, M., Lamb, C.J., Dixon, R.A.** 1996. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XX. Transcriptional activation of phenylpropanoid pathway genes in elicitor-induced cell suspension cultures. *Plant Molecular Biology*, **30**: 427-438.
- Nicholson, R.L., Hammerschmidt, R.** 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, **30**: 369-389.
- Niebel, A., Heungens, K., Barthels, N., Inzé, D., Van Montagu, M., Gheysen, G.** 1995. Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **8**: 371-378.

- Nimbalkar, S.B., Harsulkar, A.M., Giri, A.P., Sainani, M.N., Franceschi, V., Gupta, V.S.** 2006. Differentially expressed gene transcripts in roots of resistant and susceptible chickpea (*Cicer arietinum* L.) upon *Fusarium oxysporum* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **68**: 176-188.
- Noguera, R.** 1982. Alteraciones en la producción de rishitina en raíces y tilosas en tallos en la interacción *Meloidogyne-Fusarium* en plantas de tomate. *Agronomía Tropical*, **32**: 303-308.
- Nürnbergger, T.** 1999. Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular and Molecular Life Science*, **55**: 167-182.
- Nürnbergger, T., Lipka, V.** 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology*, **6**: 335-345.
- Nyvall, R.F., Haglund, W.A.** 1972. Sites of infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* race 5 on peas. *Phytopathology*, **62**: 1419-1424.
- Opperman, C.H., Bird, D.M., Williamson, V.M., Rokhsar, D.S., Burke, M., Cohn, J., Cromer, J., Diener, S., Gajan, J., Graham, S., Houfek, T.D., Liu, Q., Mitros, T., Schaff, J., Schaffer, R., Scholl, E., Sosinski, B.R., Thomas, V.P., Windham, E.** 2008. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. *Proceedings National Academy of Sciences U.S.A.*, **105**: 14802–14807.
- Ori, N., Eshed, Y., Paran, I., Presting, G., Aviv, D., Tanksley, S., Zamir, D., Fluhr, R.** 1997. The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell*, **9**: 521-532.
- Orion, D., Hoestra, H.** 1974. The effect of root-knot nematode and ethrel on *Fusarium* wilt of tomatoes. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, **80**: 28-36.
- Oslon, P.D., Varner, J.E.** 1993. Hydrogen peroxide and lignification. *The Plant Journal*, **4**: 887-892.
- Otte, O., Barz, W.** 2000. Characterization and oxidative in vitro cross-linking of an extensin-like protein and proline-rich protein purified from chickpea cell walls. *Phytochemistry*, **53**: 1-5.
- Otte, O., Pachten, A., Hein, F., Barz, W.** 2001. Early elicitor-induced events in chickpea cells: Functional links between oxidative burst, sequential occurrence of extracellular alkalization and acidification, K^+/H^+ exchange and defence-related gene activation. *Zeitschrift für Naturforschung*, **56**: 65-76.
- Overkamp, S., Hein, F., Barz, W.** 2000. Cloning and characterization of eight cytochrome P450 cDNAs from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *Plant Science*, **155**: 101-108.

- Padwick, G.W., Bhagwagar, P.K.** 1943. Wilt of gram in relation to date of sowing. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, **13**: 289.
- Pande, S., Krishna Kishore, G., Upadhayaya, H.D., Narayana Rao, J.** 2006. Identification of sources of multiple diseases resistance in mini-core collection of chickpea. *Plant Disease*, **90**: 1214-1218.
- Pandey, A., Choudhary, M.K., Bhushan, D., Chattopadhyay, A., Chakraborty, S., Datta, A., Chakraborty, N.** 2006. The nuclear proteome of chickpea (*Cicer arietinum* L.) reveals predicted and unexpected proteins. *Journal of Proteome Research*, **5**: 3301-3311.
- Pandey, A., Chakraborty, S., Datta, A., Chakraborty, N.** 2008. Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular and cellular proteomics*, **7**: 88-107.
- Panina, Y., Fravel, D. R., Baker, C.J., Shcherbakova, L.A.** 2007. Biocontrol and plant pathogenic *Fusarium oxysporum*-induced changes in phenolic compounds in tomato leaves and roots. *Journal of Phytopathology*, **155**: 475-481.
- Panina, Y., Fravel, D.R., Baker, C.J., Shcherbakova, L.A.** 2007. Biocontrol and plant pathogenic *Fusarium oxysporum*-induced changes in phenolic compounds in tomato leaves and roots. *Journal of Phytopathology*, **155**: 475-481.
- Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J., Osbourn, A.E.** 1999. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings National Academy of Sciences U.S.A.*, **22**: 12923-12928.
- Pareja-Jaime, Y., Roncero, M.G., Ruiz-Roldán, M.C.** 2008. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is required for full virulence on tomato plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**: 728-736.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C.** 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, **24**: 255-265.
- Pate, J.S., Gunning, B.E.S.** 1972. Transfer Cells. *Annual Review of Plant Physiology*, **23**: 173-196.
- Patterson, S.D., Abersold, R.H.** 2003. Proteomics: the first decade and beyond. *Nature Genetic Supplement*, **33**: 311-323.
- Paxton, J.D.** 1981. Phytoalexins-a working redefinition. *Phytopathologische Zeitschrift-Journal of Phytopathology*, **101**: 106-109.
- Peñalva, M.A., Arst Jr., H.N.** 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**: 426-446.

- Pérez Artés, E., Tena, M.** 1990. Purification and characterization of pectic enzymes from two races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* differing in virulence to chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **37**: 107-124.
- Pérez-Artés, E., Jorge-Cerrudo, I., Jiménez-Díaz, R. M., Tena-Aldave, M.** 2004. Pectic enzyme production as a possible marker of pathogenicity and virulence in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*/chickpea pathosystem. *Recent Research Developments in Biochemistry*, **5**: 255-265.
- Perry, R.N.** 2001. Analysis of the sensory responses of parasitic nematodes using electrophysiology. *International Journal for Parasitology*, **31**: 909-918.
- Pfaff, T., Kahl, G.** 2003. Mapping of gene-specific markers on the genetic map of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, **269**: 243-251.
- Phillips, J.C.** 1988. A distinct race of chickpea wilt in California. *International Chickpea Newsletter*, **18**: 19-21.
- Pontier, D., Miao, Z.H., Lam, E.** 2001. Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *Plant Journal*, **27**: 529-538.
- Porter, D.M., Powell, N.T.** 1967. Influence of certain *Meloidogyne* species on *Fusarium* wilt development in flue-cured tobacco. *Phytopathology*, **57**: 282-285.
- Potenza, C., Thomas, S.H., Sengupta-Gopalan, C.** 2001. Genes induced during early response to *Meloidogyne incognita* in roots of resistant and susceptible cultivar alfalfa cultivars. *Plant Science*, **161**: 289-299.
- Powell, N.T.** 1971. Interactions between nematodes and fungi in disease complexes. *Annual Review of Phytopathology*, **9**: 253-274.
- Presting, G.G., Malysheva, L., Fuchs, J., Schubert, I.** 1998. A TY3/GYPSY retrotransposon-like sequence localizes to the centromeric regions of cereal chromosomes *The Plant Journal*, **16**: 721-728.
- Prior, A., Jones, J.T., Blok, V.C., Beauchamp, J., McDermott, L., Cooper, A., Kennedy, M.W.** 2001. A surface-associated retinol- and fatty acid binding protein (Gp-FAR-1) from the potato cyst nematode *Globodera pallida*: lipid binding activities, structural analysis and expression pattern. *Biochemical Journal*, **356**: 387-394.
- Qadri, A.N., Saleh, H.M.** 1990. Fungi associated with *Heterodera schachtii* (Nematoda) in Jordan. II. Effect on *H. schachtii* and *Meloidogyne javanica*. *Nematologica*, **36**: 104-113.
- Qin, Q., Bergmann, C.W., Rose, J.K.C., Saladie, M., Kumar Kolli, V.S., Albersheim, P., Darvill, A.G.,**

- York, W.S.** 2003. Characterization of a tomato protein that inhibits a xyloglucan-specific endoglucanase. *Plant Journal*, **34**: 327-338.
- Qiu, J., Hallmann, J., Kokalis-Burelle, N., Weaver, D.B., Rodríguez-Kábana, R., Tuzun, S.** 1997. Activity and differential induction of chitinase isozymes in soybean cultivars resistant or susceptible to root-knot nematodes. *Journal of Nematology*, **29**: 523-530.
- Raheja, P.C., Das, G. P.** 1957. Development studies in crops plants II. Effect of cultural treatments on the incidence of gram wilt. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, **27**: 237-250.
- Ralston, L., Subramanian, S., Matsuno, M., Yu, O.** 2005. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases. *Plant Physiology*, **137**: 1375-1388.
- Ramsay, K., Wang, Z., Jones, M.G.K.** 2004. Using laser capture microdissection to study gene expression in early stages of giant cells induced by root-knot nematodes. *Molecular Plant Pathology*, **5**: 587-592.
- Ramsay, K., Jones, M.G.K., Wang, Z.** 2006. Laser capture microdissection: a novel approach to microanalysis of plant-microbe interactions. *Molecular Plant Pathology*, **7**: 429-435.
- Rasmussen, S., Dixon, R.A.** 1999. Transgene-mediated and elicitor-induced perturbation of metabolic channeling at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Cell*, **11**: 1537-1551.
- Ratnaparkhe, M.P., Santra, D.K., Tullu, A., Muehlbauer, F.J.** 1998. Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with *Fusarium* wilt resistance gene in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**: 348-353.
- Ravanel, S., Gakière, B., Job, D., Douce, R.** 1998. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings National Academy of Sciences U.S.A.*, **95**: 7805-7812.
- Rep, M., Dekker, H.L., Vossen, J.H., de Boer, A.D., Houterman, P.M., Speijer, D., Back, J.W., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C.** 2002. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiology*, **130**: 904-917.
- Rep, M., Dekker, H.L., Vossen, J.H., de Boer, A.D., Houterman, P.M., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C.** 2003. A tomato xylem sap protein represents a new family of small cysteine-rich proteins with structural similarity to lipid transfer proteins. *FEBS letters*, **534**: 82-86.
- Rep, M., Van der Does, H.C., Meijer, M., van Wijk, R., Houterman, P.M., Dekker, H.L., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J.C.** 2004. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular*

- Microbiology*, **53**: 1373-1383.
- Rep, M., Meijer, M., Houterman, P.M., van der Does, H.C., Cornelissen, B.J.C.** 2005. *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the matching avirulence gene. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **18**: 15-23.
- Requejo, R., Tena, M.** 2005. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. *Phytochemistry*, **66**: 1519-1528.
- Ribas, J.C., Wickner, R.B.** 1998. The Gag domain of the Gag-Pol fusion protein directs incorporation into the L-A double-stranded RNA viral particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **273**: 9306–9311.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqard, A., Murray, J.A.H.** 1999. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science*, **283**: 1541-1544.
- Ritz, D., Beckwith, J.** 2001. Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **55**: 21-48.
- Rivas, S., Rougon-Cardoso, A., Smoker, M., Schauser, L., Toshioka, H., Jones, J.D.G.** 2004. CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *The EMBO Journal*, **23**: 2156–2165.
- Roberts, C.A., Marek, S.M., Niblack T.L., Karr A.L.** 1992. Parasitic *Meloidogyne* and mutualistic *Acremonium* increase chitinase in tall fescue. *Journal of Chemical Ecology*, **18**: 1107-1116.
- Robertson, L., Robertson, W.M., Sobczak, M., Helder, J., Tetaud, E., Ariyanayagam, M.R., Ferguson, M.A.J., Fairlamb, A., Jones, J.T.** 2000. Cloning, expression and functional characterisation of a peroxiredoxin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **111**: 41-49.
- Rodrigues, F.A., McNally, D.J., Datnoff, L.E., Jones, J.B., Labbé, C., Benhamou, N., Menzies, J.G., Bélanger, R.R.** 2004. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology*, **94**: 177-183.
- Rodríguez Tello, A.** 1994. La muerte de plántulas de garbanzo causada por *Pythium* spp. y *Phytophthora megasperma* en Andalucía: Etiología y control. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 375 pp.
- Roncero, M.I.G., Hera, C., Ruiz-Rubio, M., García Maceira, F.I., Madrid, M.P., Caracuel, Z., Calero, F., Delgado-Jarana, J., Roldán-Rodríguez, R., Matínez-Rocha, A.L., Velasco, C., Roa, J., Martín-Urdiroz, M., Córdoba, D., Di Pietro, A.** 2003. *Fusarium* as a model for studying virulence

- in soilborne plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **62**: 87-98.
- Rossignol, M., Peltier, J.B., Mock, H.P., Matros, A., Maldonado, A.M., Jorrín, J.V.** 2006. Plant proteome analysis: A 2004-2006 update. *Proteomics*, **6**: 5529-5548.
- Roy, K.W., Lawrence, G.W., Hodges, H.H., McLean, K.S., Killbrew, J.F.** 1989. Sudden death syndrome of soybean: *Fusarium solani* as incitant and relation of *Heterodera glycines* to disease severity. *Phytopathology*, **79**: 191-197.
- Roze, E., Hanse, B., Mitreva, M., Vanholme, B., Bakker, J., Smant, G.** 2008. Mining the secretome of the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi* for candidate parasitism genes. *Molecular Plant Pathology*, **9**: 1-10.
- Roze, E., Hanse, B., Mitreva, M., Vanholme, B., Bakker, J., Smant, G.** 2008. Mining the secretome of the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi* for candidate parasitism genes. *Molecular Plant Pathology*, **9**: 1-10.
- Rozen, S., Skaletsky, H.J.** 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (S. Krawetz, S. Misener, eds.). Humana Press, Totowa, NJ, U.S.A., pp. 365-386.
- Saikia, R., Singh, B.P., Kumar, R., Arora, D.K.** 2005. Detection of pathogenesis-related proteins-chitinase and B-1,3-glucanase in induced chickpea. *Current Science*, **89**: 659-663.
- Satoh, S., Sturm, A., Fujii, T., Chrispeels, M.J.** 1992. cDNA cloning of an extracellular dermal glycoprotein of carrot and its expression in response to wounding. *Planta*, **188**: 432-438.
- Saunders, J.A., O'Neill, R.** 2004. The characterization of defense responses to fungal infection in alfalfa. *Biocontrol*, **49**: 715-728.
- Savitsky, P.A., Gazaryan, I.G., Tishkov, V.I., Lagrimini, L.M., Ruzgas, T., Gorton, L.** 1999. Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *Biochemical Journal*, **340**: 579-583.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A.** 2002. Identification and detection of *Rosellinia necatrix* by conventional and real-time Scorpion-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, **108**: 355-366.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Manners, J.M., Anderson, J.P., Simpson, R.S., Wilson, I.W., Somerville, S.C., Maclean, D.J.** 2003. Systemic gene expression in *Arabidopsis* during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology*, **132**: 999-1010.
- Schlieper, D., Tiemann, K., Barz, W.** 1990. Stereospecificity of hydrogen transfer by fungal and plant NADPH:isoflavone oxidoreductases. *Phytochemistry*, **29**: 1519-1524.

- Schnerr, H., Niessen, L., Vogel, R.F.** 2001. Real time detection of the *tri5* gene in *Fusarium* species by LightCycler™-PCR using SYBR®-Green for continuous fluorescence monitoring *International Journal of Food Microbiology*, **71**: 53-61.
- Scholl, E.H., Bird, D.M.** 2005. Resolving tylenchid evolutionary relationships through multiple gene analysis derived from EST data. *Molecular and Phylogenetic Evolution*, **36**: 536-545.
- Schraudner, M., Ernst, D., Langebartels, C., Sandermann, H.J.** 1992. Biochemical plant responses to ozone III. Activation of the defense-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, **99**: 1321-1328.
- Schwessinger, B., Zipfel, C.** 2008. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **11**: 389-395.
- Sela-Buurlage, M.B., Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Melchers, L.S., van den Elzen, P.J.M., Cornelissen, B.J.C.** 1993. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology*, **101**: 857-863.
- Sela-Buurlage, M.B., Budai-Hadrian, O., Pan, Q., Carmel-Goren, L., Vunsch, R., Fluhr, R.** 2001. Genome-wide dissection of *Fusarium* resistance in tomato reveals multiple complex loci. *Molecular Genetics and Genomics*, **265**: 1104-1111.
- Semlat, J.P., Rosso, M.N., Hussey, R.S., Abad, P., Castagnone-Sereno, P.** 2001. Molecular cloning of a cDNA encoding an amphid-secreted putative avirulence protein from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **14**: 72-79.
- Setter, T.L., Flannigan, B.A.** 2001. Water deficit inhibits cell division and expression of transcripts involved in cell proliferation and endoreduplication in maize endosperm. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 1401-1408.
- Shang, C., Shibahara, T., Hanada, K., Iwafune, Y., Hirano, H.** 2004. Mass spectrometric analysis of posttranslational modifications of a carrot extracellular glycoprotein. *Biochemistry*, **43**: 6281-6292.
- Sharma, K.D., Winter, P., Kalh, G., Muehlbauer, F.J.** 2004. Molecular mapping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* race 3 resistance gene in chickpea. *Theoretical and Applied Genetics*, **108**: 1243-1248.
- Sharma, K.D., Chen, W., Muehlbauer, F.J.** 2005. Genetics of chickpea resistance to five races of *Fusarium* wilt and a concise set of race differentials for *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Plant Disease*, **89**: 385-390.
- Sharma, K.D., Muehlbauer, F.J.** 2007. *Fusarium* wilt of chickpea: physiological specialization, genetics

- of resistance and resistance gene tagging. *Euphytica*, **157**: 1-14.
- Sharma, S.B., Smith, D.H., McDonald, D.** 1992. Nematode constraints of chickpea and pigeonpea production in the semiarid tropics. *Plant Disease*, **76**: 868-874.
- Sharov, A.A., Dudekula, D.B., Ko, M.S.H.** 2005. A web-based tool for principal component and significance analysis of microarray data. *Bioinformatics*, **21**: 2548–2549.
- Shibuya, N., Minami, E.** 2001. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **59**: 223-233.
- Showalter, A.M., Bell, J.N., Bailey, C.L., Varner, J.E., Lamb, C.J.** 1985. Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.*, **82**: 6551-6555.
- Showalter, A.M.** 1993. Structure and function of plant cell wall proteins. *The plant Cell*, **5**: 9-23.
- Siddiqui, Z.A., Husain, S.I.** 1992. Interaction between *Meloidogyne incognita* race 3, *Macrophomina phaseolina* and *Bradyrhizobium* sp. in the root-rot disease complex of chickpea, *Cicer arietinum*. *Fundamental and Applied Nematology*, **15**: 491-494.
- Sidhu, G.S., Webster, J.M.** 1977. Predisposition of the tomato wilt fungus (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) by the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Nematologica*, **23**: 436-442.
- Sikora, R.A., Greco, N., Veloso Silva, J.F.** 2005. Nematode parasites of food legumes. En *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (M. Luc, R.A. Sikora, J. Bridge, eds.). CAB International, Wallingford, U.K., pp. 259-318.
- Simon, C.J., Muehlbauer, F.J.** 1997. Construction of a chickpea linkage map and its comparison with maps of pea and lentil. *Journal of Heredity*, **88**: 115-119.
- Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M.G.J., Diergaarde, P., van der Lee, T., Bleeker, M., Onstenk, J., De Both, M., Haring, M., Mes, J., Cornelissen, B., Zabeau, M., Vos, P.** 1998. Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell*, **10**: 1055-1068.
- Singh, D.B., Dahiya, B.S.** 1973. Breeding for wilt resistance in chickpea. En *Symposium on wilt problem and breeding for wilt resistance in Bengal gram*. Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India, pp. 13-14.
- Singh, K.B., Virmani, S.M.** 1996. Modelling growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Field Crops Research*, **46**: 41-49.
- Singh, K.B., Jiménez-Díaz, R.M.** 1996. Registration of six *Fusarium* wilt-resistant chickpea germplasm

- lines. *Crop Science*, **36**: 817.
- Singh, K.B., Saxena, M.C.** 1996. Winter chickpea in Mediterranean-type environments. A technical bulletin. ICARDA, Aleppo. Siria, 39 pp.
- Smith, C.A., MacHardy, W.E.** 1982. The significance of tomatine in the host response of susceptible and resistant tomato isolines infected with two races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology*, **72**: 415-419.
- Smith, C.A., MacHardy, W.E.** 1982. The significance of tomatine in the host response of susceptible and resistant tomato isolines infected with two races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology*, **72**: 415-419.
- Smith, C.J.** 1996. Accumulation of phytoalexins: Defense mechanism and stimulus response system. *New Phytology*, **132**: 1-45.
- Snowden, K.C., Simkin, A.J., Janssen, B.J., Templeton, K.R., Loucas, H.M., Simons, J.L., Karunairetnam, S., Gleave, A.P., Clark, D.G., Kleeb, H.J.** 2005. The decreased apical dominance¹/*Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE⁸ gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *The plant Cell*, **17**: 746-759.
- Soriano, I.R., Asenstorfer, R.E., Schmidt, O., Riley, I.T.** 2004. Inducible flavone in oats (*Avena sativa*) is a novel defense against plant-parasitic nematodes. *Phytopathology*, **94**: 1207-1214.
- Srivastava, A.S., Upadhyay, K.D., Singh, G.** 1974. Effect of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* on gram crop. *Indian Journal of Nematology*, **4**: 248-251.
- Stadnik, M.J., Buchenauer, H.** 1999. Accumulation of autofluorogenic compounds at the penetration site of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* is associated with both benzothiadiazole-induced and quantitative resistance of wheat. *Journal of Phytopathology*, **10**: 615-622.
- Starr, J.L., Jeger, M.J., Martyn, R.D., Schilling, K.** 1989. Effects of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* on plant mortality and yield of cotton. *Phytopathology*, **79**: 640-646.
- Stein, L.D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M.R., Chen, N., Chinwalla, A., Clarke, L., Clee, C., Coghlan, A., Coulson, A., D'Estachio, P., Fitch, D.H.A., Fulton, L.A., Fulton, R.E., Griffiths-Jones, S., Harris, T.W., Hillier, L.W., Kamath, R., Kuwabara, P.E., Mardis, E.R., Marra, M.A., Miner, T.L., Minx, P., Mullikin, J.C., Plumb, R.W., Rogers, J., Schein, J.E., Sohrmann, M., Spieth, J., Stajich, J., Wei, C., Willey, D., Wilson, R.K., Durbin, R., Waterston,**

- R.H. 2003. The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: A platform for comparative genomics. *PLoS Biology*, **1**: 166-192.
- Stepanova, M.Y.** 1971. Spread of *Fusarium oxysporum* in legumes. *Trudy Vesnik. Instituta. Zash. Rastonia.*, **29**: 100.
- Stevenson, P.C., Turner, H. C., Haware, M.P.** 1995. Phytoalexin accumulation in the roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings associated with resistance to fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **50**: 167-178.
- Stevenson, P.C., Turner, H.C., Haware, M.P.** 1997. Phytoalexin accumulation in the roots of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings associated with resistance to fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **50**: 167-178.
- Stulemeijer, I.J.E., Joosten, M.J.A.** 2008. Challenges for molecular plant pathology over the next ten years. Post-translational modification of host proteins in pathogen-triggered defence signalling in plants. *Molecular Plant Pathology*, **9**: 545-560.
- Sugha, S.K., Kapoor, S.K., Singh, B.M.** 1995. Management of Chickpea Wilt with fungicides. *Indian Phytopathology*, **48**: 27-31.
- Takken, F.L., Albrecht, M., Tameling, W.I.** 2006. Resistance proteins: molecular switches of plant defense. *Current Opinion in Plant Biology*, **9**: 383-390.
- Talavera, M., Tobar Jiménez, A.** 1997. Plant parasitic nematodes from unirrigated fields in Alhama, southeastern Spain. *Nematologia Mediterranea*, **25**: 73-81.
- Tameling, W.I.L., Takken, F.L.W.** 2007. Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system. *European Journal of Plant Pathology*, **121**: 243-255.
- Tang, W., Coughlan, S., Crane, E., Beatty, M., Duvick, J.** 2006. The application of laser microdissection to in planta gene expression profiling of the maize anthracnose stalk rot fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **19**: 1240–1250.
- Tateishi, Y., Umemura, Y., Esaka, M.** 2001. A basic class I chitinase expression in winged bean is up-regulated by osmotic stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **65**: 1663-1668.
- Tatum, J.H., Baker, R.A., Berry, R.E.** 1985. Naphthoquinones produced by *Fusarium oxysporum* isolated from citrus. *Phytochemistry*, **24**: 457-459.
- Tatum, J.H., Baker, R.A., Berry, R.E.** 1987. Naphthofurans produced by *Fusarium oxysporum* isolated from citrus. *Phytochemistry*, **26**: 2499-2500.
- Taylor, C.E.** 1990. Nematode interactions with other pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **116**:

- 405-416.
- Tekeoglu, M., Tullu, A., Kaiser, W.J., Muehlbauer, F.J.** 2000. Inheritance and linkage of two genes that confer resistance to Fusarium wilt in chickpea *Crop Science*, **40**: 1247-1251.
- Theis, T., Stahl, U.** 2004. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell Molecular Life Science*, **61**: 437-455.
- Thiel, J., Weier, D., Sreenivasulu, N., Strickert, M., Weichert, N., Melzer, M., Czauderna, T., Wobus, U., Weber, H., Weschke, W.** 2008. Different hormonal regulation of cellular differentiation and function in nucellar projection and endosperm transfer cells – a microdissection-based transcriptome study of young barley grains *Plant Physiology*, **148**: 1436-1452.
- Thrane, U.** 1989. *Fusarium* species on their specific profiles of secondary metabolites. En *Fusarium. Mycotoxins, taxonomy and pathogenicity* (J. Chelkowski, ed.). Elsevier, NY, U.S.A., pp. 199-225.
- Tiyagi, S.A., Alam, M.M.** 1986. Root-knot development and plant growth of chickpea in relation to inoculum density of *Meloidogyne incognita*. *International Chickpea Newsletter*, **14**: 31-32.
- Tobar Jiménez, A.** 1973. Nematodos de los "secanos" de la comarca de Alhama. I. Niveles de población y cultivos hospedadores. *Revista Ibérica de Parasitología*, **33**: 525-556.
- Towson, A.J., Apt, W.J.** 1983. Effect of soil water potential and survival of *Meloidogyne javanica* in fallow soil. *Journal of Nematology*, **15**: 110-115.
- Trapero Casas, A.** 1983. La Marchitez y Podredumbre de Raíz del garbanzo en el Valle del Guadalquivir: Importancia, distribución, etiología, epidemiología y medios de lucha. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba. 295 pp.
- Trapero Casas, A., Jiménez Díaz, R.M.** 1985a. Fungal wilt and root rot diseases of chickpea in Southern Spain. *Phytopathology*, **75**: 1146-1151.
- Trapero Casas, A., Jiménez Díaz, R.M.** 1985b. Etiología, importancia y distribución de la seca del garbanzo en el Valle del Guadalquivir. *Boletín del Servicio de Defensa de Plagas*, **11**: 69-145.
- Trapero Casas, A., Jiménez Díaz, R.M.** 1986. La "Seca" del garbanzo en Andalucía. *Comunicaciones Agrarias. Serie Protección Vegetal*, **4**: 66.
- Triantaphyllou, A.C., Hirschmann, H.** 1960. Post-infection development of *Meloidogyne incognita* Chitwood 1949 (Nematoda: Heteroderidae). *Annals of the Benaki Phytopathological Institute*, **3**: 3-11.
- Tullu, A., Kaiser, W.J., Kraft, J.M., Muehlbauer, F.J.** 1999. A second gene for resistance to race 4 of Fusarium wilt in chickpea and linkage with a RAPD marker *Euphytica*, **109**: 43-50.

- Udvardi, M.K., Czechowski, T., Scheible, W.** 2008. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The plant Cell*, **20**: 1736-1737.
- Upadhyaya, H.D., Haware, M.P., Kumar, J., Smithson, J.B.** 1983. Resistance to wilt in chickpea I. Inheritance of late- Wilting in response to race 1. *Euphytica*, **32**: 447-452.
- Urfer, W., Crzegorzcyk, M., Junk, K.** 2006. Statistics for proteomics: A review of tools for analyzing experimental data. *Practical Proteomics*, **1-2**: 48-55.
- Vadesompele, J., De Peter, K., Pattyp, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Poepe, A., Speleman, F.** 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by genomic averaging of multiple internal control genes *Genome Biology*, **3**: research0034-0034.0011.
- Vařtilingom, M., Pijenburg, H., Gendre, F., Brignon, P.** 1999. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified Maximizer maize and RoundUp Ready soybean in some representative foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 5261–5266.
- Valente, P., Tao, W., Verbelen, J.P.** 1998. Auxins and cytokinins control DNA endoreduplication and deduplication in single cells of tobacco. *Plant Science*, **134**: 207-215.
- Van der Biezen, E.A., Jones, J.D.** 1998. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biocheical Science*, **23**: 454-456.
- Van der Eycken, W., De Almeida Engler, J., Inzė, D., Van Montagu, M., Gheysen, G.** 1996. A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites *Plant Journal*, **9**: 45-54.
- Van der Maesen, L.J.G.** 1972. *Cicer L.*, a monography of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum L.*) its ecology and cultivation. *Comunication Agricultural University of Wageningen*, **72**: 342.
- Van Etten, H.D., Matthews, D.E., Matthews, P.S.** 1989. Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications. *Annual Review of Phytopathology*, **27**: 143-164.
- Van Etten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., Farmer, E.F.** 1994. Two classes of plant antibiotics: Phytoalexins versus "phytoanticipins". *The plant Cell*, **6**: 1191-1192.
- Van Gelder, R.N., von Zastrow, M.E., Yool, A., Dement, W.C., Barchas, J.D., Everwine, J.H.** 1990. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proceedings of National Academy of Science U.S.A.*, **87**: 1663-1667.
- Van Loon, L.C.** 1990. The nomenclature of pathogenesis-related proteins. *Physiology Molecular Plant Pathology*, **37**: 229-230.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J.** 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere

- bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **36**: 453-483.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.** 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, **44**: 135-162.
- Van Loon, L.C.** 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, **119**: 243-254.
- Van Noorden, G.E., Kerim, T., Goffard, N., Wiblin, R., Pellerone, F.I., Rolfe, B.G., Mathesius, U.** 2007. Overlap of proteome changes in *Medicago truncatula* in response to auxin and *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Physiology*, **144**: 1115-1131.
- Vanacker, H., Foyer, C.H., Carver, T.L.W.,** 1998. Changes in apoplastic antioxidants induced by powdery mildew attack in oat genotypes with race non-specific resistance. *Planta*, **208**: 444-452.
- Vanholme, B., De Meutter, J., Tytgat, T., Van Montagu, M., Coomans, A., Gheysen, G.** 2004. Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. *Gene*, **332**: 13-27.
- Varo Alcalá, J., Tobar Jiménez, A., Muñoz Medina, J.M.** 1970. Lesiones causadas y reacciones provocadas por algunos nematodos en las raíces de ciertas plantas. *Revista Ibérica de Parasitología*, **30**: 547-566.
- Vercauteren, I., Van Der Schueren, E., Van Montagu, M., Gheysen, G.** 2001. *Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematodes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**: 288-299.
- Veronese, P., Ruiz, M.T., Coca, M.A., Hernandez-Lopez, A., Lee, H., Ibeas, J.I., Damsz, B., Pardo, J. M., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Narasimhan, M.L.** 2003. In defense against pathogens. Both plant sentinels and foot soldiers need to know the enemy. *Plant Physiology*, **131**: 1580-1590.
- Ververidis, F., Trantas, E., Douglas, C., Vollmer, G., Kretschmar, G., Panopoulos, N.** 2007a. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnology Journal*, **2**: 1214-1234.
- Ververidis, F., Trantas, E., Douglas, C., Vollmer, G., Kretschmar, G., Panopoulos, N.** 2007b. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part II: Reconstruction of multienzyme pathways in plants and microbes. *Biotechnology Journal*, **2**: 1235-1249.
- Virgin, W.J., Walker, J.C.** 1940. Relation of the near-wilt fungus to the pea plant. *Journal of Agricultural Research*, **60**: 241-248.
- Vlot, A.C., Klessig, D.F., Park, S.W.** 2008. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current*

Opinion in Plant Biology, **11**: 436-442.

- Vogelsang, R., Barz, W.** 1993a. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Planta*, **189**: 60-69.
- Vogelsang, R., Barz, W.** 1993b. Cloning of a class III acidic chitinase from chickpea. *Plant Physiology*, **103**: 297-298.
- Vovlas, N., Rapoport, H.F., Jiménez Díaz, R.M., Castillo, P.** 2005. Differences in feeding sites induced by root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., in chickpea. *Phytopathology*, **95**: 368-375.
- Walia, K.K., Gupta, D.C.** 1986. Antagonism between *Heterodera cajani* and *Rhizoctonia solani* on Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Indian Journal of Nematology*, **16**: 41-43.
- Wang, E.L.H., Bergeson, G.B.** 1974. Biochemical changes in root exudate and xylem sap of tomato plants infected with *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, **6**: 194-202.
- Wang, Z., Robert, H., Potter, G.K.I., Jones, M.G.K.** 2003. Differential display analysis of gene expression in the cytoplasm of giant cells induced in tomato roots by *Meloidogyne javanica*. *Molecular Plant Pathology*, **4**: 361-371.
- Watson, B.S., Asirvatham, V.S., Wang, L., Sumner, L.W.** 2003. Mapping the proteome of barrel medic (*Medicago truncatula*). *Plant Physiology*, **131**: 1104-1123.
- Webster, J.M.** 1985. Interaction of *Meloidogyne* with fungi on crop plants. En *An Advanced Treatise on Meloidogyne. Vol. 1* (J.N. Sasser, C.C. Carter, eds.). North Carolina State University Graphics, Raleigh, U.S.A., pp. 183-192.
- Weidemann, C., Tenhaken, R., Höhl, U., Barz, W.** 1991. Medicago and maackiain 3-O-glucoside-6'-O-malonate conjugates are constitutive compounds in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell cultures. *Plant Cell Reports*, **10**: 371-374.
- Weigand, F., Köster, J., Weltzien, H.C., Barz, W.** 1986. Accumulation of phytoalexins and isoflavone glucosides in a resistant and a susceptible cultivar of *Cicer arietinum* during infection with *Ascochyta rabiei*. *Journal of Phytopathology*, **115**: 214-221.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N., Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 2853-2858.
- Wienkoop, G., Saalbach, S.** 2003. Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Physiology*, **131**: 1080-1090.
- Wiermann, R.** 1981. Secondary plant products and cell and tissue differentiation. En *The Biochemistry*

- of Plants* (P.K. Stumpf, E.E. Conn, eds.). Academic Press, New York, NY, U.S.A., pp. 85-116.
- 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**: 1391-1395.
- Wildermuth, M.C., Dewney J., Wu, G., Ausubel, F.M.** 2001. Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**: 562-565.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L.** 1996. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, **13**: 19-50.
- Williams, J.S., Hall, S.A., Hawkesford, M.J., Beale, M.H., Cooper, R.M.** 2002. Elemental sulphur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiology*, **128**: 150-159.
- Williams, M.** 1994. 2D electrophoresis: from protein maps to genomes. *First Siena conference*.
- Williams, R.J., Spencer, J.P., Rice-Evans, C.** 2004. Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules?. *Free Radical Biology & Medicine*, **36**: 838-849.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A., Rasmussen, A.P.** 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, **22**: 130-138.
- Wojtaszek, P.** 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, **322**: 681-692.
- Wuyts, N., Lognay, G., Swennen, R., De Waele, D.** 2006. Nematode infection and reproduction in transgenic and mutant Arabidopsis and tobacco with an altered phenylpropanoid metabolism. *Journal of Experimental Botany*, **57**: 2825-2835.
- Wyss, U., Robertson, W.M., Trudgill, D.L.** 1988. Oesophageal bulb function of *Xiphinema index* and associated root cell responses, assessed by video-enhanced contrast light microscopy. *Revue de Nématologie*, **11**: 253-261.
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Osanai, T., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., Yokoyama, S.** 2004. Solution structure of the B3 DNA binding domain on the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1. *Plant Cell*, **16**: 3448-3459.
- Yao, C., Jasmer, D.P.** 2001. *Trichinella spiralis*-infected muscle cells: abundant RNA polymerase II in nuclear speckle domains colocalizes with nuclear antigens. *Infection and Immunity*, **69**: 4065-4071.

- Ye, X.Y., Ng, T.B., Rao, P.F.** 2002. Cicerin and arietin, novel chickpea peptides with different antifungal potencies *Peptides*, **23**: 817-822.
- Yi, S.Y., Choi, D., Ryu, M.** 2007. Implication of a pepper *h*-type thioredoxin in type I- and II-nonhost resistance to *Xanthomonas axonopodis*. *Plant Biotechnology Reports*, **1**: 117–123.
- Yokoyama, R., Nishitani, K.** 2001. A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of Arabidopsis. *Plant and Cell Biology*, **42**: 1025–1033.
- Yu, J., Wang, L., Walzem, R.L., Miller, E.G., Pike, L.M., Patil, B.S.** 2005. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 2009-2014.
- Zabala, G., Zou, J., Tuteja, J., Gonzalez, O.D., Clough, S.J., Vodkin, L.O.** 2006. Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of Glycine max in response to Pseudomonas syringae infection. *BMC Plant Biology*, **6**: 26-44.
- Zhang, K., Letham, D.S., John, P.C.L.** 1996. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta*, **200**: 2-12.
- Zinov'eva, S.V., Vasyukova, N.I., Ozeretskovskaya, O.L.** 2004. Biochemical Aspects of Plant Interactions with Phytoparasitic Nematodes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, **40**: 111-119.
- Zipfel, C.** 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, **20**: 10-16.
- Zuker, M.** 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acid Research*, **31**: 3406-3415.