



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

**DIVISIÓN DE POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR**

**Caracterización molecular de genes  
de frijol inducidos en la interacción  
con *Rhizoctonia solani***

Tesis que presenta

**Maria de la Luz Guerrero González**

Para obtener el grado de:

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

Directores de Tesis:

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**

**Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler**

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2009.



### **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio 7 de Genómica Molecular de Plantas del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont y la codirección de la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 234965) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



### Constancia de aprobación de la tesis

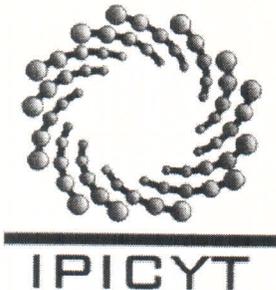
La tesis "Caracterización molecular de genes de frijol inducidos en la interacción con *Rhizoctonia solani*" presentada para obtener el Grado de Maestría en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por María de la Luz Guerrero González y aprobada el 4 de Agosto de 2009 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bromont  
(Codirector de la tesis)

Dr. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler  
(Codirector de la tesis)

Dr. J. Sergio Casas Flores  
(Asesor de la tesis)

Dr. Federico Esteban Sánchez Rodríguez  
(Asesor de la tesis)



# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 068 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de agosto del año 2009, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

|   |                        |               |
|---|------------------------|---------------|
| <b>Dr. Federico Esteban Sánchez Rodríguez</b>       | <b>Presidente</b>      | <b>UNAM</b>   |
| <b>Dr. J. Sergio Casas Flores</b>                   | <b>Secretario</b>      | <b>IPICYT</b> |
| <b>Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont</b>           | <b>Sinodal</b>         | <b>IPICYT</b> |
| <b>Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler</b> | <b>Sinodal externo</b> | <b>UNAM</b>   |

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**María de la Luz Guerrero González**

sobre la Tesis intitulada:

*Caracterización molecular de genes de frijol inducidos en la interacción con Rhizoctonia solani*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**  
**Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler (UNAM)**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 18:00 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de agosto de 2009.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



## *Dedicatorias*

*A mi madre Sofía por todo su apoyo, y cariño*

*A mis hermanas Ely y Rocío*

*A mi familia*

## *Agradecimientos*

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por la asesoría de mi trabajo de tesis y por permitirme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler, por la asesoría de mi trabajo de tesis, por sus consejos y amistad.

Al Dr. Federico Sánchez Rodríguez, por permitirme desarrollar parte de mi trabajo experimental en su laboratorio y por sus atinadas sugerencias.

Al Dr. Raúl Rodríguez Guerra, por facilitarme parte del material biológico empleado en este trabajo.

Al Dr. Sergio Casas Flores, por formar parte de mi comité, por la revisión del escrito y sus sugerencias.

Al Dr. Ángel Alpuche Solís y Dr. Carlos Barajas, por su tiempo y sus valiosas aportaciones en los ensayos preliminares de mi presentación.

A los integrantes del Laboratorio del Dr. Federico Sánchez, muy en especial a la M. B. Georgina Estrada Navarrete y al M. C. Gabriel Guillen Solís.

A los compañeros del Laboratorio 7 de Genómica Molecular de Plantas.

A la M.C. Alicia Becerra Flora, por el apoyo técnico brindado para el desarrollo de esta tesis.

Al M. C. Pablo Delgado Sánchez, por su apoyo y paciencia.

## CONTENIDO

|   | Página    |
|---|-----------|
| <b>Resumen</b>  |           |
| <b>Abstract</b>   |           |
| <b>Introducción.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Materiales y Métodos.....</b>  | <b>12</b> |
| Material vegetal y condiciones de cultivo.....                          | 12        |
| Microorganismos empleados y condiciones de crecimiento.....             | 13        |
| <i>Rhizoctonia solani</i> .....   | 13        |
| <i>Escherichia coli</i> .....   | 13        |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....                                  | 14        |
| Plásmidos empleados.....  | 14        |
| pCR4-TOPO.....  | 14        |
| pENTR/D-TOPO.....   | 15        |
| pEarleyGate 103.....  | 15        |
| Interacción <i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>Rhizoctonia solani</i> ..... | 16        |
| Construcción de la genoteca substractiva de frijol.....                 | 17        |
| Extracción de RNA total.....  | 17        |
| Síntesis y purificación de la población de cDNA.....                    | 17        |
| Construcción de la genoteca substractiva (SSH).....                     | 17        |
| Secuenciación y análisis bioinformático de los ESTs aislados.....       | 18        |
| Análisis de expresión diferencial.....                                  | 19        |
| RT-PCR.....   | 19        |
| Obtención de cDNA.....  | 19        |

|   |    |
|---|----|
| Amplificación por PCR.....  | 19 |
| RT-PCR Cuantitativo (RT-qPCR).....  | 20 |
| Generación de un vector para sobre-expresar el receptor PvRK20-1...   | 20 |
| Sobre-expresión el receptor PvRK20-1 de frijol en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....   | 21 |
| Tipificación molecular de líneas mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....  | 22 |
| <b>Resultados</b> .....   | 23 |
| Identificación de genes inducidos en frijol durante su interacción incompatible con <i>Rhizoctonia solani</i> .....   | 23 |
| Clasificación funcional de los uni-genes aislados en la SSH de raíces de frijol en interacción con el hongo fitopatógeno <i>R. solani</i> .....                           | 24 |
| Análisis de expresión diferencial de genes de frijol inducidos por <i>R. solani</i> .....   | 26 |
| Caracterización funcional del receptor PvRK20-1.....  | 27 |
| Sobre-expresión del receptor PvRK20-1 en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....  | 29 |
| Caracterización funcional de los receptores CRK27 y CRK26 de <i>Arabidopsis thaliana</i> , potenciales ortólogos del receptor PvRK20-1 de <i>Phaseolus vulgaris</i> ..... | 29 |
| <b>Discusión</b> .....  | 32 |
| <b>Perspectivas</b> .....   | 42 |
| <b>Bibliografía</b> .....   | 57 |

## INDICE DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| <p>Figura 1. Esquema de la organización del T-DNA del vector pEarleyGate 103. El T-DNA incluye la secuencia del borde izquierdo (LB) y derecho (RB) para la transferencia del T-DNA mediada por <i>Agrobacterium</i>. BAR, gen de resistencia al herbicida Basta para la selección de plantas transgénicas. 35S, promotor 35S del virus del mosaico de la Coliflor y su enhancer rio arriba. attR1 y attR2, bordes para la recombinación. CmR, gen de resistencia a cloramfenicol. ccdB, gen letal que codifica a una toxina que tiene como blanco la DNA girasa en <i>E. coli</i>. GFP, proteína verde fluorescente. 6xHis, secuencia de poli-histidinas para la purificación de la proteína recombinante. OCS, secuencia 3' UTR del gen de la octopina sintasa, incluyendo la secuencia de poliadenilación y el terminador de la transcripción.....</p> | 43     |
| <p>Figura 2. Clasificación funcional de genes aislados de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. en interacción con <i>Rhizoctonia solani</i> con base en el programa Gene Ontology (GO, <a href="http://www.geneontology.org">www.geneontology.org</a>).....</p>   | 44     |
| <p>Figura 3. Análisis de expresión diferencial por RT-qPCR de genes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. en interacción con <i>Rhizoctonia solani</i>. A) PvCRK24 (Receptor tipo cinasa); B) <math>\alpha</math>-DOX (<math>\alpha</math>-dioxigenasa); C) ERF (Factor de transcripción de respuesta a etileno); D) PA (Fosfatasa ácida asociada a defensa); E) PGIP (Proteína inhibidora de poligalacturonasa) y F) PR1 (Proteína relacionada a patogénesis 1). Plantas control a las 8 y 16 h (C8 y C16) y plantas infectadas con <i>Rhizoctonia solani</i> a las 8 y 16 h (P8 y P16).....</p>   | 45     |
| <p>Figura 4. Análisis filogenético de receptores del tipo CRK de <i>Arabidopsis thaliana</i> y el receptor PvCRK24 de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. CRK26 (NP195594), CRK27 (NP193855), PvCRK24 (AAD21872), CRK41 (NP567204), CRK28 (NP193871) y CRK29 (NP193872). El método de alineamiento empleado fue Clustal W (MEGA 4). Los números en los nodos principales representan la frecuencia en que los nodos se conservan con un análisis bootstrap para 1000 iteraciones.....</p>  | 46     |

- Figura 5. Cajas regulatorias W identificadas con el programa PLACE presentes en la región promotora de los genes de los receptores CRK26 y CRK27 de *Arabidopsis thaliana*..... 47
- Figura 6. Tipificación molecular de la línea Salk\_21591 de *Arabidopsis thaliana*. A) Sitio de inserción del T-DNA en el locus CRK27 (At4g21230) y B) Caracterización genotípica de la línea homocigota Salk\_21591 mediante PCR. Las plantas homocigotas fueron identificadas empleando DNA genómico como templado y los oligonucleótidos CRK27-RP y CRK27-LP que se alinean a la secuencia genómica del receptor CRK27..... 48
- Figura 7. Tipificación molecular de las líneas WISCDSLOX466F3 y Sail\_805\_E01 de *Arabidopsis thaliana*. A) Sitios de inserción del T-DNA en el locus CRK26 (At4g38830); B y C) Caracterización genotípica de líneas homocigotas WISCDSLOX466F3 y Sail\_805\_E01. Las líneas homocigotas se caracterizaron mediante PCR utilizando DNA genómico como templado y los oligonucleótidos CRK26-RP y CRK26-LP. La presencia del T-DNA se determinó empleando los oligonucleótidos CRK26-RP y LB1, los cuales se alinean a la secuencia genómica del receptor CRK26 y al borde izquierdo (LBT-DNA) del T-DNA respectivamente..... 49

**INDICE DE TABLAS**

|  | <b>Página</b> |
|--|---------------|
| Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos empleados para los análisis de expresión génica por RT-PCR y RT-qPCR durante la interacción frijol- <i>Rhizoctonia solani</i> ..... | 50            |
| Tabla 2. Clasificación de las secuencias de ESTs aislados en la SSH.....   | 51            |

**ABREVIATURAS**

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <b>AS</b>                 | Ácido salicílico   |
| <b>cDNA</b>               | Ácido desoxirribonucleico complementario                     |
| <b>CmR</b>                | Cloranfenicol  |
| <b>DNA</b>                | Ácido desoxirribonucleico                                    |
| <b>ESTs</b>               | Expressed Sequence Tag's                                     |
| <b>GFP</b>                | Proteína verde fluorescente                                  |
| <b>HR</b>                 | Respuesta hipersensible                                      |
| <b>LB</b>                 | Medio de cultivo Luria-Bertani                               |
| <b>LB<sub>T-DNA</sub></b> | Borde izquierdo  |
| <b>LRR</b>                | Repetidos ricos en leucina                                   |
| <b>LTP</b>                | Proteína transportadora de lípidos                           |
| <b>MS</b>                 | Medio nutritivo Murashine y Skood                            |
| <b>NCBI</b>               | Centro Nacional para la Información Biotecnológica           |
| <b>ORF</b>                | Marco de lectura abierto                                     |
| <b>PAMPs</b>              | Patrones moleculares asociados a patógenos                   |
| <b>PCR</b>                | Reacción en cadena de la polimerasa                          |
| <b>PDA</b>                | Medio nutritivo Papa Dextrosa Agar                           |
| <b>PR</b>                 | Proteínas relacionadas a patogénesis                         |
| <b>pv.</b>                | Patovar  |
| <b>RB<sub>T-DNA</sub></b> | Borde derecho  |
| <b>RLK</b>                | Receptor tipo cinasa   |
| <b>RNA</b>                | Ácido ribonucleico   |
| <b>ROS</b>                | Especies reactivas de oxígeno                                |
| <b>rpm</b>                | Revoluciones por minuto                                      |
| <b>RT-PCR</b>             | Transcripción reversa de reacción en cadena de la polimerasa |
| <b>RT-qPCR</b>            | PCR transcriptasa inversa cuantitativa                       |
| <b>SAR</b>                | Respuesta sistémica adquirida                                |
| <b>SSH</b>                | Hibridación sustractiva por supresión                        |
| <b>T-DNA</b>              | Ácido desoxirribonucleico transferido                        |
| <b>Tm</b>                 | Toneladas métricas   |
| <b>UTR</b>                | Región no traducible   |

## **Caracterización molecular de genes de frijol inducidos en la interacción con *Rhizoctonia solani***

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) es una de las leguminosas de mayor consumo en el mundo. Sin embargo, su producción es afectada tanto por factores bióticos como abióticos. La pudrición de raíz del frijol, es una de las enfermedades más importantes que afectan la productividad y desarrollo de este cultivo, además se encuentra ampliamente distribuida en México y en diversas regiones del mundo. Entre los principales agentes causales de la enfermedad destacan *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp.

*Rhizoctonia solani*, es un hongo de distribución cosmopolita nativo del suelo y se ha estimado que puede reducir hasta en un 50% la producción de frijol. Este hongo fitopatógeno puede permanecer por varios años en el suelo en forma de esclerocios (masas compactas de micelio) por lo que es difícil erradicarlo. Para aislar genes de frijol que son diferencialmente expresados durante la interacción incompatible con *Rhizoctonia solani*, desarrollamos una genoteca sustractiva por medio de la técnica de hibridación sustractiva por supresión (SSH). La SSH se realizó empleando el cDNA de raíces de frijol inoculadas con *Rhizoctonia solani* como la condición problema y el cDNA de raíces no inoculadas así como de una proporción de micelio de *Rhizoctonia solani* crecido por separado como condición control, todos colectados a las 8 y 16 h de interacción.

En total se obtuvieron 179 agrupamientos (contigs) que equivalen a 136 genes únicos (uni-genes) de 300 clonas secuenciadas. Estos uni-genes se clasificaron en 12 categorías funcionales, metabolismo primario (10%), metabolismo secundario (12%), defensa (8%), respuesta a estrés (11%), transporte (8%), síntesis de proteínas (6%), componente celular (5%), degradación de proteínas (2%), factores de transcripción (2%), transducción de señales (2%), proteínas de función desconocida (10%) y secuencias sin identidad (24%).

Se seleccionaron seis uni-genes para analizar la expresión transcripcional, los cuales codifican: un receptor tipo cinasa (PvRK20-1; potencial parálogo del uni-gen 24), una fosfatasa acida asociada a defensa

(PA; uni-gen 64), una proteína relacionada a patogénesis (PR1; uni-gen 3) un factor de transcripción de respuesta a etileno (ERF; uni-gen 68), un inhibidor de poligalacturonasa (PGIP; uni-gen 44) y una  $\alpha$ -dioxigenasa ( $\alpha$ -DOX; uni-gen 39). La expresión diferencial de estos genes fue evaluada mediante RT-qPCR en los dos tiempos del tratamiento (8 y 16 h). Este análisis mostró que los genes analizados fueron diferencialmente expresados en raíces de frijol durante su interacción con *Rhizoctonia solani*.

Posteriormente, nos enfocamos a estudiar el receptor PvRK20-1 el cual es el potencial parálogo del uni-gen 24 obtenido en la SSH de frijol. Para analizar la función de este gen en el mecanismo de defensa de frijol contra el ataque de *Rhizoctonia solani*, se están desarrollando experimentos de pérdida y ganancia de función en *Arabidopsis thaliana*.

Para los experimentos de pérdida de función adquirimos dos líneas mutantes insercionales de T-DNA para los receptores CRK26 y CRK27 de *Arabidopsis* los cuales son los potenciales ortólogos del receptor PvRK20-1 de frijol. Plantas de ambas líneas fueron caracterizadas como homocigotas, estas plantas serán analizadas mediante RT-PCR para verificar la ausencia del transcrito (líneas knock-out) para cada uno de los receptores, las cuales serán empleadas para realizar estudios de interacción con *Rhizoctonia solani* y otros microorganismos patógenos de plantas.

Para los experimentos de ganancia de función generamos una construcción para sobre-expresar el receptor PvRK20-1 de frijol bajo el promotor 35S con la finalidad de obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Plantas de *Arabidopsis* fueron transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 con el vector pPvRK20-1. Plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresen el receptor PvRK20-1 de serán empleadas para realizar estudios de interacción con microorganismos fitopatógenos.

El estudio de los eventos moleculares que tienen lugar en frijol durante su interacción con *Rhizoctonia solani* permitirá elucidar los mecanismos de defensa al patógeno. En esta investigación nosotros reportamos la primera SSH de frijol obtenida durante su interacción incompatible con el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Las secuencias obtenidas en este trabajo

enriquecerán la colección de ESTs de frijol disponibles hasta ahora. Además, la caracterización funcional de algunos de los uni-genes identificados en este trabajo podría contribuir a la generación de cultivares de frijol más resistentes a la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: *Arabidopsis thaliana*, receptor-CRK, *Phaseolus vulgaris* L, pudrición de raíz, *Rhizoctonia solani*, hibridación substractiva por supresión.

## **Molecular characterization of common bean genes induced in the interaction with *Rhizoctonia solani***

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L) is one of the legumes of greater consumption in the world. However, its production is affected by biotic and abiotic stresses. Common bean root rot, is one of the most important diseases affecting the growth and productivity of this crop, having a wide distribution in Mexico and diverse regions of the world. Among the main causal agents are *Rhizoctonia solani* and *Fusarium spp.*

*Rhizoctonia solani*, is a fungus of cosmopolitan distribution native of the soils and it has been estimated that it can reduced up to 50% the production of common bean. This phytopathogenic fungus is able to remain several years in soil in the form of sclerotia (compact masses of hypha) being difficult to eradicate. In order to isolated common bean genes differentially expressed during the incompatible interaction with *Rhizoctonia solani*, we constructed a Suppressive Subtractive Hybridization Library (SSH). The SSH was generated using the cDNA of common bean roots inoculated with *Rhizoctonia solani* as tester and the cDNA of non-inoculated common bean roots plus a proportion of *Rhizoctonia solani* micelia as the driver or control condition. All this samples were collected after 8 and 16 h of interaction.

From 300 sequenced clones, we obtained a total of 179 contigs equivalent to 136 unigenes. These unigenes were classified in 12 functional categories, primary metabolism (10%), secondary metabolism (12%), defense (8%), response to stress (11%), transport (8%), protein synthesis (6%), cellular component (5%), protein degradation (2%), transcription factors (2%), signal transduction (2%), proteins of unknown function (10%), and sequences with no identity (24%).

Six uni-genes were selected for transcriptional assays, including a receptor-like kinase (PvRK20-1; potential paralogous of uni-gene 24), an acid phosphatase associated to defense (PA; uni-gene 64), a pathogenesis related protein (PR1; unigen 3), an ethylene responsive factor (ERF; uni-gene 68), a polygalacturonase inhibitor (PGIP; uni-gene 44) and a  $\alpha$ -dioxigenase ( $\alpha$ -DOX; uni-gene 39). The differential expression pattern of these genes was evaluated

by RT-qPCR during both sampling times (8 and 16 h). This analysis showed that the analyzed genes were differentially expressed in common bean roots during the interaction with *Rhizoctonia solani*.

Subsequently, we focused on studying the PvRK20-1 receptor, which is the potential paralogous of uni-gene 24 isolated from the bean SSH library. To analyze the function of this gene in the bean defense mechanism against attack by *Rhizoctonia solani*, experiments of loss- and gain-of-function in *Arabidopsis thaliana* are being performed.

For the experiments of loss-of function were requested to the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) insertional mutant lines, which have the T-DNA insertion in the receptors CRK26 and CRK27 of Arabidopsis (potential orthologous of bean receptor gene PvRK20-1). Plants of both lines were characterized as homozygous; these plants will be analyze by RT-PCR to verify the absence of the transcript (knock-out lines) for each of these receptors, which will be used for studies of interaction with *Rhizoctonia solani* and other phytopathogens. For the experiments of gain-of function we generated a construction for over-expressing the bean receptor PvRK20-1 under the 35S promoter in order to obtain Arabidopsis transgenic plants. Arabidopsis plants were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 with pPvRK20-1 vector. Arabidopsis transgenic plants that overexpress the receptor PvRK20-1 will be used for studies of interaction with phytopathogenic microorganisms.

The study of the molecular events occurring during the common bean-*Rhizoctonia solani* interaction will help to the understanding of the defense mechanisms operating against the pathogen. Here, we report the first SSH library of common bean obtained during the incompatible interaction with the *Rhizoctonia solani* phytopathogenic fungi. The EST sequences obtained in this work will enrich the actual common bean EST collections. In addition, the functional characterization of the uni-genes identified in this work will contribute to the generation of common bean cultivars resistant to the root rot disease.

KEY WORDS: *Arabidopsis thaliana*, CRK-receptor, *Phaseolus vulgaris* L, root rot, *Rhizoctonia solani*, Suppressive Subtractive Hybridization.

## INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L) representa la mitad del consumo mundial de leguminosas de grano y es el más importante para consumo humano directo (Broughton, *et al.*, 2003; Ramírez, *et al.*, 2005). Se cultiva ampliamente en todo el mundo, particularmente en países de Latinoamérica y Asia en donde su aporte proteínico proporciona el 83 % en la dieta promedio del consumidor (Mahe *et al.*, 1994). Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la producción mundial de frijol para el 2007 fue de 19,289,231 Tm, siendo los principales países productores: Brasil, India, China, Myanmar, México y Estados Unidos.

En México, el frijol como cultivo básico, ocupa el segundo lugar de importancia después del maíz. Es un alimento fundamental en la dieta de la población mexicana, sobre todo para las clases más desprotegidas del país, ya que constituye la fuente principal de proteínas para este sector, siendo un alimento que no puede sustituirse con el consumo de algún otro. Adicionalmente, la importancia ancestral de su cultivo en el campo mexicano radica también en que forma parte de la cultura gastronómica de México. Durante el año 2007 se registró una producción de 1,390,000 Tm. Los principales estados productores son Zacatecas, Sinaloa, Chiapas, Chihuahua y Durango, pero en general en la mayoría de los estados de la república Mexicana se produce frijol. Sin embargo, la producción de frijol es afectada por diversos factores, tanto bióticos como abióticos. Entre los factores abióticos destacan la sequia y suelos con baja fertilidad, particularmente deficientes en nitrógeno, fosforo y zinc (Singh, 2001).

Entre los factores bióticos, las plagas, malezas y enfermedades destacan por los daños causados al cultivo anualmente. Según el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, 1987) más de la mitad de las principales enfermedades del frijol pueden ser transmitidas por la semilla; estas incluyen la antracnosis, las pudriciones de raíz y de los tallos, los marchitamientos, los añublos por bacterias y varios virus.

La pudrición de raíz del frijol, es una enfermedad que ocasiona pérdidas considerables en la producción, se encuentra ampliamente distribuida en México y en diversas regiones del mundo; entre los principales agentes causales de la enfermedad destacan los hongos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp (Navarrete *et al.*, 2000).

*R. solani* es un hongo basidiomiceto necrotrófico que ataca numerosas especies de plantas (Ogoshi, 1996). Su estado infectivo es como micelio y está conformado por hifas septadas, que se ramifican en ángulo recto. Sus células son multinucleadas, presentando más de tres núcleos por célula, lo que las distingue de las especies binucleadas que poseen uno o dos núcleos por célula (González *et al.*, 2006). *R. solani*, puede permanecer por varios años en el suelo en forma de esclerocios (masas compactas de micelio), hasta que se den las condiciones climáticas propicias para su germinación, es por ello que una vez que se ha establecido en el campo es difícil erradicarlo (Gvozdeva *et al.*, 2006). Este hongo fitopatógeno, ha sido identificado en la mayoría de suelos cultivados y no cultivados, causa la muerte pre y post-emergente de las plántulas de frijol, reduce la eficiencia de las raíces para la absorción de agua y nutrientes, y se ha estimado que puede reducir hasta en un 50% la producción

de frijol (Park y Tu, 1994). Durante la patogénesis por *R. solani*, las hifas del hongo penetran la raíz de la planta inter e intracelularmente. Además, el patógeno también produce enzimas que degradan la pared celular de la planta (Gvozdeva *et al.*, 2006; Poromarto *et al.*, 1998). Van Eetten et al (1967), reportaron que durante la patogénesis por *R. solani* en frijol, una de las principales enzimas líticas sintetizadas por el hongo es la endopoligalacturonasa, la cual degrada las paredes celulares de la planta.

Para contrarrestar el ataque de los patógenos, las plantas han desarrollado sofisticados mecanismo de defensa, cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección (Holt III *et al.*, 2000). Estos mecanismos, pueden ser constitutivos, como las barreras estructurales preformadas que impiden o retardan la entrada del patógeno y la posterior colonización de la planta (Dangl y Jones, 2001; Park e Ikeda, 2008) En plantas de frijol infectadas con *R. solani*, se han descrito cambios fisiológicos, estos incluyen cambios en la composición química de la pared celular, por ejemplo, la formación de enlaces entre los polímeros de la pared celular que contribuyen a un incremento en la rigidez de la misma y por ende una mayor resistencia contra las enzimas del hongo, también se ha observado un incremento en la formación de pectato de calcio que ayuda a delimitar la lesión (Stockwell y Hanchey, 1982). Además, se ha reportado una rápida inducción de fitoalexinas tal como la faseolina en hipocotilos jóvenes de frijol que inhibe el crecimiento del patógeno (Pierre y Bateman, 1967).

Otro mecanismo de defensa es el inducible que involucra una red compleja de percepción, amplificación y transducción de señales que incluyen el reconocimiento del patógeno por una señal inicial y la activación de una serie de respuestas de defensa a nivel local y sistémico (Scheel, 1998). Estas respuestas incluyen hipersensibilidad en el sitio de la infección, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno, que participa tanto en la muerte del patógeno como en el refuerzo de la pared celular a través de cambios químicos (Hückelhoven, 2007; Park e Ikeda, 2008). Dicha molécula, al igual que el óxido nítrico que también es sintetizado durante la respuesta hipersensible, participa de igual forma en la señalización hacia otras células (Hückelhoven, 2007; Heath, 2000).

Asimismo, ocurre una rápida acumulación de fitoalexinas, síntesis de diversas proteínas involucradas en la defensa antimicrobiana, conocidas como proteínas relacionadas a patogénesis (PR), éstas incluyen enzimas tales como quitinasas y glucanasas, las cuales son capaces de degradar la pared celular de los microorganismos. Además, se presenta un reforzamiento de la pared celular en el sitio de entrada del patógeno, el cual ocurre gracias a la producción de callosa y lignina (Montesinos, 2000; Gachomo *et al.*, 2003; Desender *et al.*, 2007)

Además de las respuestas de defensa localizadas en el sitio de infección, el reconocimiento de un patógeno también provoca la activación de respuestas sistémicas de defensa en tejidos distantes del sitio de infección primaria. Esta resistencia inducida en tejidos sistémicos se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) (Beckers y Spoel, 2006). En la SAR el

ácido salicílico (AS) actúa como molécula de señalización y se ha asociado con una acumulación de proteínas PR tanto en tejidos locales como en sistémicos (Gaffney *et al.*, 1993; Durrant y Dong, 2004).

Sin embargo, una etapa crucial para la activación de dichos mecanismos de defensa es el reconocimiento del patógeno. En general, las plantas reconocen a los patógenos a través de inductores específicos de raza o inductores generales conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Jones y Dangl, 2006). La percepción de estos inductores está mediada por receptores tipo cinasa (RLK) localizados en la superficie celular (Shiu y Bleeker, 2001).

Los RLKs son estructuralmente diversos y constituyen una gran familia de genes en muchas plantas con más de 600 miembros en *Arabidopsis thaliana* y aproximadamente 1,130 en arroz (*Oryza sativa*) (Shiu *et al.*, 2004). La mayoría de estos genes codifican receptores cinasa anclados a la membrana, con un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal cinasa intracelular (Torii, 2000; Tichtinsky *et al.*, 2003). Estos receptores regulan respuestas tempranas a señales internas y externas, y juegan papeles críticos: en defensa (por ejemplo Xa21 y FLS2) (Song *et al.*, 1995; Gomez-Gomez y Boller, 2000), en simbiosis (NORK, SYMRK) (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002), en percepción de hormonas (BRI1) (Li y Chory, 1997); y en diferenciación del meristemo (CLV1) (Clark *et al.*, 1997) entre otros.

Con base a los motivos presentes en el dominio extracelular del receptor, los RLKs de plantas se han agrupado en 44 subfamilias, entre las que se encuentran: lectina tipo-C, tipo CRINKLY4, tipo CrRLK1, DUF26, extensina,

lectina de leguminosa (L-lectina), tipo LRK10, repetidos ricos en leucina (LRR), LysM, URK1, tipo PERK, tipo PKF3, dominio S, taumatina, y tipo WAK (Hardie, 1999; Shiu y Bleecker, 2001).

Una de las clases de RLKs más grande y mejor estudiada se caracteriza por la presencia de dominios repetidos ricos en leucina (LRR), que se sabe están involucrados en la interacción proteína-proteína (Kobe y Deisenhofer, 1994). Algunos miembros de esta familia han sido implicados en la respuesta de defensa de la planta, tal es el caso del receptor Xa21 de arroz el cual confiere resistencia contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Song *et al.*, 1995).

RLKs con dominios LysM, lectina-L o lectinas tipo-C, representan la segunda clase más abundante de receptores en plantas (Shiu y Bleecker, 2001). Algunos receptores como LYK3 y NRK5 con dominios LysM están involucrados en el proceso de simbiosis y formación de nódulos en leguminosas (Limpens *et al.*, 2003, Madsen *et al.*, 2003).

LECRK1 y LRK1b de *Arabidopsis* representan otra clase de receptores con un dominio extracelular tipo lectina que puede unir oligosacáridos, tal como los inductores derivados de la ruptura de la pared celular de microorganismos. Estos receptores pueden participar en el reconocimiento de un patógeno y en la activación de mecanismos de defensa en la planta (Hervé *et al.*, 1999)

Otro receptor con un papel potencial en la respuesta de defensa es el receptor PR5K de *Arabidopsis* el cual presenta un dominio extracelular taumatina que está relacionado a las proteínas PR5, las cuales se acumulan en el espacio extracelular en respuesta al ataque de patógenos y poseen actividad antifúngica (Wang *et al.*, 1996).

Hay otra clase de receptores del tipo RLK, los CRKs con más de 40 miembros en *A. thaliana*, estos contienen en la porción extracelular dominios de función desconocida ricos en cisteínas, clasificado como dominio DUF26 ([www.pfam.sanger.ac.uk](http://www.pfam.sanger.ac.uk)). Estos receptores contienen 2 copias del dominio DUF26, el cual está integrado por el motivo C-X8-C-X2-C, este es un nuevo motivo estructuralmente distinto de los dominios ricos en cisteína descritos para otros RLKs (Chen, 2001; Shiu y Bleecker, 2001). Los residuos de cisteína presentes en el dominio extracelular de estos receptores pueden participar en la formación de la estructura tridimensional de la proteína mediante la formación de puentes disulfuro o bien estas cisteínas pueden formar motivos del tipo dedos de zinc. Tanto los puentes disulfuro como los dedos de zinc se conoce que median interacciones proteína-proteína, un paso crítico para la activación de muchos receptores (Chen, 2001).

Se ha reportado, que algunos miembros de esta familia de genes CRKs son inducidos por patógenos, por ROS y AS (Czernic *et al.*, 1999; Du y Chen, 2000; Ohtake *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2004).

La interacción directa o indirecta de un receptor derivado de la planta y su inductor provoca una cascada de señalización y acciones de defensa que culminan en una respuesta hipersensible (HR) y de resistencia a razas específicas del patógeno. Este mecanismo se basa en el concepto de gen por gen, donde el producto (inductor) de un gen de avirulencia derivado del patógeno y el producto (receptor) de un gen de resistencia de la planta interactúan resultando en una interacción planta-patógeno incompatible. Por el contrario, en las interacciones compatibles debido a la pérdida o alteración del

receptor o el inductor, el reconocimiento no se lleva a cabo, y la respuesta de defensa no es activada estableciéndose la enfermedad (Flor, 1971). En *A. thaliana*, el receptor LRR-RLK FLS2 está involucrado en la percepción de la flagelina, un inductor de origen bacteriano, cuya interacción directa o indirecta con el receptor induce una cascada de señalización que conlleva a la activación de genes de defensa de la planta (Gomez-Gomez y Boller, 2000).

Otros RLKs han sido implicados en la respuesta de defensa de la planta, tal es el caso del LRR-RLK Xa21 de arroz el cual confiere resistencia raza específica contra la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Song *et al.*, 1995). Chen *et al.* (2003), reportaron que en plantas de *A. thaliana* tratadas con el patógeno *Pseudomonas syringae* se induce la expresión del receptor CRK5 (un receptor de la clase CRK-RLK) y que esta inducción activa las respuestas de defensa en *Arabidopsis* lo que la hace más resistente al patógeno.

Así, la identificación y el estudio continuo de los genes implicados en la respuesta de defensa de la planta permitirán elucidar los mecanismos de resistencia a enfermedades en las plantas así como la generación de cultivares de importancia económica más resistentes a enfermedades (Xiong *et al.*, 2001). El empleo de técnicas moleculares permite identificar genes involucrados en la respuesta de defensa de la planta, en este sentido una aproximación para lograr el aislamiento masivo de genes diferencialmente expresados en la planta durante su interacción con un patógeno, es mediante la generación de genotecas sustractivas por supresión (SSH) (Asai *et al.*, 2000; Xiong *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2005; Borrás-Hidalgo *et al.*, 2006; Hosp *et al.*, 2007).

Borrás-Hidalgo et al (2006), mediante la construcción de una SSH y análisis de expresión con macroarreglos de 258 clonas de cDNA , encontraron que 182 cDNAs fueron diferencialmente expresados en tabaco (*Nicotiana megalosiphon*) durante su interacción incompatible con el moho azul (*Peronospora hyoscyami f. sp. tabacina*). Estos cDNAs mostraron homología a genes reportados, algunos de los cuales ya han sido implicados en resistencia a enfermedades. Dentro de este grupo se encuentran genes como LTP (proteína transportadora de lípidos), GSHS (glutación sintetasa), EIL2 (factor de transcripción de respuesta a etileno) y GD (Glutation descarboxilasa).

Degenhardt et al (2005), reportaron la construcción de dos SSHs, una generada a partir de de hojas de manzana de una variedad resistente al hongo *Venturia inaequalis* y la otra de hojas de manzana de una variedad susceptible al patógeno. De este estudio se obtuvieron 480 ESTs de los cuales, 262 son transcritos preferencialmente expresados en la variedad resistente al hongo, muchos de estos codifican proteínas relacionadas con defensa, como proteínas PR que pueden brindar protección a la variedad resistente a la infección de *V. inaequalis*.

Asai et al (2000), generaron una SSH para identificar los genes que son inducidos en protoplastos de Arabidopsis durante su interacción con el inductor flg22 (péptido de 22 aminoácidos presente en el amino terminal de la flagelina) a diferentes tiempos. Entre los genes que identificaron se encuentran genes de defensa tales como PAL1 (fenilalanina amonio-liasa 1), GST1 (glutación S-transferasa 1), PR1 y PR5, los cuales son inducidos por una variedad de

patógenos e inductores en diferentes etapas de la respuesta de defensa en muchas especies de plantas.

Una vez que se han obtenido los cDNAs de las genotecas sustractivas, la siguiente estrategia es la transformación genética de plantas, la cual es una herramienta útil para hacer experimentos de ganancia o pérdida de función, y así poder elucidar los mecanismos de defensa de la planta durante su interacción con el patógeno.

Recientemente, Estrada-Navarrete et al (2006), desarrollaron un método de transformación genética de frijol. En el cual, la transformación es mediada por *Agrobacterium rhizogenes*. Ésta, al insertar su T-DNA en el genoma de la planta induce el desarrollo de raíces peludas (hairy roots) en el sitio de la inoculación. Este método de transformación ha permitido oportunamente hacer estudios de genómica funcional en interacciones simbióticas (frijol-Rhizobium). También representa una herramienta útil para realizar estudios en interacciones planta-patógeno, y determinar así el papel de algunos genes de interés en la respuesta de defensa de la planta.

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar genes de frijol que son diferencialmente expresados durante su interacción incompatible con *R. solani*. Con la construcción y análisis de la genoteca sustractiva (SSH) se identificaron 136 genes únicos (uni-genes). Dentro de los genes identificados se encuentran genes involucrados en defensa, muchos de los cuales codifican proteínas PR. También se identificaron genes implicados en rutas de señalización y genes de respuesta a estrés, algunos de estos ya han sido reportados en otras plantas como genes que juegan un papel importante en las respuestas de la planta

bajo condiciones de estrés biótico y abiótico. También se analizó el perfil de expresión de 6 genes de frijol obtenidos de la genoteca sustractiva. De estos, nos enfocamos en estudiar el receptor PvRK20-1 (descrito por Lange et al, 1999) potencial parálogo del uni-gen 24 obtenido en la SSH de frijol), ya que este pudiera estar participando en la inducción de los mecanismos de defensa en frijol. Para analizar la función de este gen en el mecanismo de defensa de las plantas contra el ataque de *R. solani*, generamos una construcción para sobre-expresar el receptor PvRK20-1 en *A. thaliana*. Además, seleccionamos los receptores CRK26 y CRK27 de Arabidopsis los cuales son los potenciales ortólogos del receptor PvRK20-1 de frijol, para ser estudiados en mutantes insercionales de T-DNA. De los 40 receptores del tipo CRK de *A. thaliana*, los receptores CRK27 y CRK26 fueron seleccionados por su mayor identidad (aproximadamente 50%) con el receptor PvRK20-1 de frijol. De manera similar al receptor PvRK20-1, estos receptores de Arabidopsis se expresan preferencialmente en raíz y son inducidos por patógenos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal y condiciones de cultivo**

En el presente estudio se emplearon semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L) criollo colecta 2094 (proporcionado por el Dr. Raúl Rodríguez Guerra, INIFAP-Campo Experimental General Terán, Nuevo León, México). La colecta 2094 se selecciono debido a que mostró resistencia a la pudrición de raíz causada por *Rhizoctonia solani*. También, se emplearon semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) y de las líneas Salk\_021591, Sail\_805\_E01 y WISCDSLOX466F3 las cuales son mutantes insercionales por T-DNA para los genes CRK27 (At4g21230) y CRK26 (At4g38830), respectivamente.

Las semillas de frijol fueron esterilizadas superficialmente con una solución comercial de hipoclorito de sodio al 1% y enjuagadas con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas, fueron germinadas en cajas de Petri con medio nutritivo MS al 0.5X (Murashine and Skoog, 1962) y mantenidas por tres semanas en una cámara de crecimiento a  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Las semillas de *Arabidopsis* empleadas en este estudio fueron esterilizadas superficialmente con etanol al 100 y 70% durante 5 min en cada solución. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril. Estas semillas fueron germinadas en cajas de Petri con medio nutritivo MS al 0.5X y se mantuvieron por dos semanas en una cámara de crecimiento a  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

## **Microorganismos empleados y condiciones de crecimiento**

### ***Rhizoctonia solani***

Se empleo la cepa DGO1956A de *R. solani*, que fue aislada de campos de frijol del estado de Durango, México. Esta cepa fue proporcionada por el Dr. Raúl Rodríguez Guerra del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP-Campo Experimental General Terán, Nuevo León, México. La cepa se creció en medio papa-dextrosa-agar (PDA), posteriormente fragmentos de colonia del hongo se conservaron en viales con glicerol al 50% y se almacenaron a -80°C. *R. solani* fue propagado en medio nutritivo PDA a partir de un fragmento de micelio. Las cajas inoculadas se mantuvieron a 28°C por tres días. Posteriormente, fragmentos de micelio fueron empleados como inóculo para la interacción planta-patógeno. Además, como control para la construcción de la genoteca, se empleo un cultivo de *R. solani* de 3 días de edad crecido en cajas de Petri con PDA cubiertas con papel celofán.

### ***Escherichia coli***

Se emplearon las cepas XL1-Blue y One Shot TOP10F de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) para la transformación y amplificación del ADN recombinante. Las cepas se crecieron de rutina en medio LB (Luria-Bertani) y se agregó agar al 1.5% o antibiótico (kanamicina 50 mg/mL) cuando fue necesario. Estas cepas se conservaron a -80 °C en viales con medio nutritivo LB y glicerol al 50%.

Las células One Shot TOP10 y XL1-Blue de *E. coli* que fueron transformadas con los plásmidos pCR4-TOPO y pENTR/D-TOPO respectivamente, se sembraron en cajas de Petri que contenían LB con kanamicina (50 mg/mL) y se incubaron por 16 h a 37°C. Las colonias de *E. coli* transformadas se tomaron con un aza de platino y se estriaron en cajas con medio de cultivo LB con kanamicina, además estas colonias también se crecieron en medio LB líquido con kanamicina y se mantuvieron por 12 h a 37°C y en agitación constante a 200 rpm.

### ***Agrobacterium tumefaciens***

Para la transformación de *A. thaliana* se empleo la cepa GV2260 de *A. tumefaciens* proporcionada por el Dr. Plinio Guzmán Villate del CINVESTAV, Unidad Irapuato, Guanajuato, México.

Células de *A. tumefaciens* GV2260 fueron transformadas con el plásmido pPvRK20-1 se sembraron en medio LB con kanamicina (50 mg/mL) y se incubaron por 24 h a 30°C. Posteriormente, las colonias obtenidas se estriaron en medio LB con kanamicina y se crecieron a 30°C.

### **Plásmidos empleados**

#### **pCR4-TOPO**

Se empleo el plásmido pCR4-TOPO (Invitrogen™) para clonar los fragmentos aislados de la SSH. Contiene los genes de resistencia a kanamicina y ampicilina, el gen letal *ccdB* de *E. coli* fusionado al fragmento C-terminal del gen de la  $\beta$ -galactosidasa (*LacZ $\alpha$* ) y un sitio de clonación múltiple. La ligación

de un producto de PCR interrumpe la expresión de la fusión *ccdB-LacZα* permitiendo así el crecimiento exclusivo de las clonas recombinantes mientras que las bacterias con plásmido sin inserto mueren debido a la transcripción del gen letal *ccdB* (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### **pENTR/D-TOPO**

Para clonar el marco de lectura abierto (ORF) del gen PvRK20-1 se empleo el plásmido pENTR/D-TOPO, el cual permite la clonación direccional de productos de PCR con extremos romos. Para la clonación direccional es necesario adicionar las bases CACC al oligonucleótido sentido. El vector contiene el gen de resistencia a kanamicina, también consta de los bordes *attL1* y *attL2* del bacteriófago  $\lambda$ , estos bordes flanquean el gen de interés, lo que permite mediante recombinación sitio específica transferirlo a un vector destino. El análisis de las transformantes se puede realizar mediante PCR, empleando una combinación del oligonucleótido M13 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y un oligonucleótido que se ancle al gen de interés.

### **pEarleyGate 103**

Este es un plásmido empleado para expresar genes en plantas. Este vector binario puede replicarse en *E. coli* y en *Agrobacterium* y posee el borde izquierdo ( $LB_{T-DNA}$ ) y derecho ( $RB_{T-DNA}$ ) para la transferencia del T-DNA mediada por *Agrobacterium*. La organización del T-DNA se muestra en la Figura 1. El T-DNA incluye el borde *attR1*, el gen de resistencia a cloranfenicol (*CmR*), el gen letal *ccdB* y el borde *attR2*. Los bordes *attR1* y *attR2* permiten la

recombinación sitio específica con los bordes *attL1* y *attL2* presentes en un vector de entrada. Además, contiene el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor, la secuencia 3' del gen de la octopina sintasa (OCS), que incluye la secuencia de poliadenilación y de la terminación de la transcripción. Como marcador de selección en planta tiene el gen BAR, el cual le confiere resistencia al herbicida Basta, también contiene el gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) más una secuencia de poli-histidinas para la purificación de la proteína recombinante (Earley *et al.*, 2006).

### **Interacción *Phaseolus vulgaris*-*Rhizoctonia solani***

La interacción planta-patógeno se estableció empleando plántulas de frijol criollo colecta 2094 de tres semanas de edad crecidas en medio MS 0.5X. Las raíces de estas plantas fueron inoculadas con fragmentos de una colonia de *R. solani* (previamente crecido en medio PDA por tres días a 28°C). Estas plantas, se incubaron en una cámara de crecimiento a 25°C y un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad.

A las 8 y 16 h de interacción (tiempos en los que se observan los primeros síntomas de la enfermedad, como pequeños puntos de necrosis) fueron colectadas las raíces de frijol, congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta la extracción de RNA total. Además a los mismos tiempos también se congelaron raíces de frijol sin inocular para ser empleadas como control.

## **Construcción de la genoteca substractiva de frijol**

### **Extracción de RNA total**

El RNA total fue extraído de las raíces de frijol criollo colecta 2094 inoculadas con *R. solani* (condición problema) y de las raíces de frijol sin inocular y del micelio del hongo (condición control) de ambos tiempos de interacción (8 y 16 h), de acuerdo al protocolo del manual RNeasy kit (QIAGEN). Para verificar la integridad del RNA se hizo una electroforesis en gel desnaturizante de agarosa al 1%, se tiñó con bromuro de etidio y se fotodocumentó.

### **Síntesis y purificación de la población de cDNAs**

Para sintetizar el cDNA, se empleó como molde 1 µg de RNA total de cada condición (mezclando ambos tiempos de interacción, 8 y 16 h) y el kit SuperSMART™PCR cDNA síntesis Kit (Clontech). Para purificar la población de cDNAs de primera cadena se empleó el Nucleo Spin Extraction II Kit (Macherey-Nigel) y las columnas CHROMA-SPIN 1000 después de la síntesis de la segunda cadena.

### **Construcción de la genoteca substractiva (SSH)**

La SSH forward se realizó de acuerdo al protocolo PCR-Select™ cDNA subtraction kit (Clontech). El cDNA obtenido de las raíces de frijol cv. 2094 inoculadas con *R. solani* se empleó como condición problema “Tester”; mientras que el cDNA obtenido tanto de las raíces de frijol no-inoculadas y como de micelio de *R. solani* se utilizó como condición control “Driver”. Ambos cDNAs fueron digeridos con la enzima *RsaI* y solo al cDNA de la condición

problema se le ligaron los adaptadores 1 y 2R (Diatchenko *et al.*, 1996). Para normalizar y enriquecer los cDNAs expresados diferencialmente en la condición problema se realizaron dos rondas sucesivas de hibridación y amplificación por PCR.

Los productos del segundo PCR fueron clonados en el vector pCR4-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA) y los productos de la ligación fueron utilizados para transformar células electrocompetentes de *E. coli* One Shot® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células transformadas fueron crecidas en cajas de Petri que contenían LB con kanamicina (50 mg/mL) y se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias transformantes fueron cultivadas individualmente en medio líquido LB con kanamicina (50 mg/mL) y se incubaron toda la noche a 37°C y en agitación constante a 200 rpm. Posteriormente se extrajo el DNA plasmídico de las colonias transformantes mediante el método de Birnboim modificado (Kotchoni *et al.*, 2003). La presencia de insertos y tamaño de los mismos fue determinada mediante análisis de restricción con la enzima *EcoRI*. Las clonas fueron almacenadas en medio LB y glicerol al 50% (v/v) a -80°C.

### **Secuenciación y análisis bioinformático de los ESTs aislados**

Los productos clonados fueron secuenciados siguiendo la técnica descrita por Sanger *et al.* (1977). Como DNA molde se utilizó cada plásmido y como oligonucleótido se empleó el iniciador universal de M13. La secuenciación se realizó en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO-CINVESTAV, Unidad Irapuato, Guanajuato, México). Las muestras fueron procesadas en un secuenciador automático ABI PRISM 310

Genetic analyzer (Perkin Elmer). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa Seqman del DNASTar (Lasergene) para obtener el número de agrupamientos (contigs) y uni-genes. La homología de los uni-genes fue analizada con el programa Blast (BLASTX y BLASTN) provisto por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.org>).

## **Análisis de expresión diferencial**

### **RT-PCR**

#### **Obtención de cDNA**

Para obtener el perfil de expresión de algunos de los genes aislados en la genoteca de frijol-*R. solani*, se sintetizó el cDNA de doble cadena para la condición control y la condición problema (en ambos tiempos de interacción) empleando el kit SuperSmart (Clontech) de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

#### **Amplificación por PCR**

Se seleccionaron seis genes obtenidos en la genoteca para determinar su perfil de expresión. Los oligonucleótidos para cada uno de estos genes se diseñaron a partir de las secuencias ESTs obtenidas en la SSH. En la Tabla 1 se muestra la secuencia de dichos oligonucleótidos, así como el tamaño del amplicón obtenido. Como control de carga se empleó el gen de *actina-2* (EU369189) de frijol. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 50  $\mu$ L, empleando 1  $\mu$ L de cDNA como molde. Los ciclos de PCR fueron de 26 a 30 dependiendo de cada transcrito. Cada producto de PCR fue separado electroforéticamente en

un gel de agarosa al 0.8% (w/v). La intensidad (píxeles) de cada banda fue cuantificada con el programa Doc-it (UVP, Inc.). La señal de cada transcrito fue normalizada con la señal de la *actina-2* de frijol.

### **RT-PCR Cuantitativo (RT-qPCR)**

Los genes que resultaron diferenciales en el análisis RT-PCR semi-cuantitativo mostraron ser diferenciales fueron analizados por RT-qPCR. Plantas de la condición control y la condición problema en ambos tiempos de interacción (8 y 16 h) fueron empleadas para extraer RNA total empleando el método de Concert™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este RNA fue tratado con la DNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA). El análisis RT-qPCR se realizó con el iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green (Bio-Rad, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para este análisis se empleo el gen EF-1 $\alpha$  (CV530481) de frijol como gen de referencia.

### **Generación de un vector para sobre-expresar el receptor PvRK20-1**

El ORF que codifica para el receptor PvRK20-1 (parólogo potencial del uni-gen 24 aislado en la SSH de frijol) fue amplificado por PCR con la enzima *Pfu* DNA Polimerasa (Fermentas, USA) de alta fidelidad a partir del cDNA de la condición problema con los oligonucleótidos PvRLK5'(5'-caccatggctgccatttcttgcatc-3', las cuatro bases adicionales para la clonación direccional están subrayadas) y PvRLK3'(5'- ctagcgaggatacggctcagtg-3'), amplificando un fragmento de 1998 pb. Este producto de PCR fue clonado en el vector pENTR/D-TOPO entre los bordes *attI1* y *attI2*. Posteriormente, esta

construcción fue empleada para transformar células de *E. coli* XL1-Blue que fueron crecidas en medio LB con kanamicina. El análisis de las transformantes se hizo mediante PCR empleando los oligonucleótidos M13 Forward y PvRLK3', además se mandaron secuenciar algunas clonas para determinar la orientación correcta del gen.

Posteriormente, el ORF del receptor PvRK20-1 se subclono en el vector binario pEarleyGate 103. Para ello, mediante PCR y empleando los oligonucleótidos M13 Forward y reverso a partir del vector pENTR/D-TOPO se amplificó un fragmento que contiene el ORF del receptor PvRK20-1 flanqueado por los bordes de recombinación *attI1* y *attI2*, posteriormente este producto de PCR fue recombinado al vector pEarleyGate 103 empleando la enzima LR clonasa® II y siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). Con este plásmido se transformaron células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260, estas se sembraron en placas de Petri con LB con kanamicina y se incubaron 24 h a 30°C. Para determinar la presencia del gen, las clonas transformantes fueron analizadas por PCR empleando los oligonucleótidos PvRLK5' y PvRLK3'.

### **Sobre-expresión del receptor PvRK20-1 de frijol en *Arabidopsis thaliana***

Células electrocompetentes de *A. tumefaciens* GV2260 fueron transformadas con el vector pPvRK20-1. De estas, se seleccionó una colonia resistente a kanamicina para transformar plantas Col-0 de *A. thaliana* de tres semanas de edad mediante el método de infiltración modificado descrito por Clough y Bent, (1998). Este método consiste en infiltrar primordios florales de *A. thaliana* con

una suspensión celular de *A. tumefaciens* que porta el gen de interés que será transferido. El medio de infiltración empleado contiene sales de MS al 0.22%, sacarosa al 5% y el surfactante Silwet L-77 al 0.005%.

### **Tipificación molecular de líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana***

Semillas de líneas mutantes insercionales de *A. thaliana* fueron germinadas en medio de cultivo MS al 0.5X y se mantuvieron por tres semanas en una cámara de crecimiento a 24°C y un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Posteriormente, de estas plantas se extrajo el DNA empleando el método descrito por Edwards et al (1991). Este fue empleado como templado para la tipificación de las líneas entre homocigotas y heterocigotas mediante PCR utilizando la *Taq* DNA polimerasa recombinante (Vivantis®, CA, USA) y empleando los oligonucleótidos: CRK27- RP 5'-TTTCAGCATTTCCTTCAGGG-3' y CRK27-LP 5'-TCACTTATGCTCAGCAAAACG-3' para la línea insercional Salk\_021591 (receptor CRK27) y los oligonucleótidos CRK26-LP 5'-CATTGTCATACCAAATAATCGCCTC-3' y CRK26-RP 5'-TTTGGGTTTGATCATCCAATG-3' para las líneas insercionales WISCDSLOX466F3 y Sail\_805\_E01 (receptor CRK26). En estas líneas, la presencia del T-DNA se confirmó por PCR empleando los oligonucleótidos LB1 del borde izquierdo del T-DNA y el CRK27-RB de CRK27 y el CRK26-RB para las inserciones en el receptor CRK26.

## RESULTADOS

### Identificación de genes inducidos en frijol durante su interacción incompatible con *Rhizoctonia solani*

Para aislar e identificar genes de frijol que son inducidos en raíz durante su interacción con *Rhizoctonia solani*, se construyó una genoteca sustractiva (SSH). Plantas de frijol (cv 2094) de tres semanas de edad crecidas en un sistema *in vitro* consistente de placas Petri con medio MS 0.5X fueron inoculadas con *R. solani*. A las 8 y 16 h de interacción se colectaron las raíces, las cuales fueron empleadas para extraer RNA. Este RNA fue empleado como condición problema. Para la condición control se emplearon 2/3 partes de RNA extraído de raíces de frijol sin inocular y se le sumo una proporción (1/3 parte) de RNA obtenido de micelio del hongo (con el fin de eliminar los genes del hongo presentes en la condición problema) crecido por separado en medio PDA, ambos extraídos a las 8 y 16 h. Para cada condición se hizo una mezcla del RNA extraído en ambos tiempos. Esto con la finalidad de aislar genes tempranos y tardíos inducidos en frijol durante su interacción con el patógeno. El RNA obtenido en ambas condiciones se empleo como molde para la síntesis de cDNA, el cual se empleó para la construcción de la SSH.

Los productos de la hibridación sustractiva obtenidos por PCR se clonaron en el vector pCR4-TOPO y se transformaron en células de *Escherichia coli*. Se seleccionaron 350 clonas y se digirieron con la enzima *EcoRI*. Los productos de la digestión se analizaron en geles de agarosa para descartar los fragmentos menores a 100 pb. En total, 300 plásmidos con insertos de rango entre 300 a 1,000 pb se enviaron a secuenciar con el primer universal.

En total obtuvimos 300 ESTs, los cuales se procesaron *in silico* con el programa Edit Seq II de DNASTar (Lasergene) para eliminar el vector y los oligonucleótidos. Posteriormente, las secuencias obtenidas se ensamblaron con el programa Seqman II de DNASTar (Lasergene) y conformaron un total de 179 agrupamientos “contigs” con un tamaño promedio de 500 pb. Estos, se analizaron con el programa Blast (BLASTX y BLASTN) provisto por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.org>). Como resultado se obtuvo un total de 136 uni-genes, los cuales están conformados por uno o varios contigs, estos a su vez están constituidos por varias secuencias y por último secuencias únicas (Tabla 1).

### **Clasificación funcional de los uni-genes aislados en la SSH de raíces de frijol en interacción con el hongo fitopatógeno *R. solani***

Los 136 uni-genes se clasificaron en categorías funcionales de acuerdo a su posible función biológica reportada en la base de datos programa “Gene Ontology” ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)), esta clasificación se muestra en la Figura 2. Las 12 categorías principales en las que se agruparon los 136 uni-genes son: metabolismo primario (10%), metabolismo secundario (12%), defensa (8%), respuesta a estrés (11%), transporte (8%), síntesis de proteínas (6%), componente celular (5%), degradación de proteínas (2%), factores de transcripción (2%), transducción de señales (2%), proteínas de función desconocida (10%) y secuencias sin identidad (no hits) (24%).

Muchos de los genes pertenecientes a la categoría de metabolismo secundario, mostraron una alta homología a enzimas involucradas en la ruta metabólica del

Shikimato y en pasos subsecuentes para la síntesis de los fenilpropanoides. Otro grupo importante de genes fue asignado a la defensa, la mayoría codifica proteínas relacionadas a patogénesis (PR). También se identificaron varios componentes de rutas de señalización, como el receptor PvRK20-1 y proteínas cinasas como la Pti1. En la categoría de genes relacionados a estrés, la mayoría ya han sido reportados en otras plantas como genes que juegan un papel muy importante en la respuesta al estrés biótico y abiótico, tal es el caso del uni-gen 65 que mostró homología al gen ERD15, este codifica una proteína de respuesta temprana a deshidratación. En *Arabidopsis*, este gen es inducido por deshidratación, infección por *Erwinia carotovora*, tal como por AS y heridas. Además, la sobre-expresión de dicho gen incrementó la resistencia al patógeno y ésta se correlaciono con una mayor expresión de genes marcadores de SAR como PR2 (Kariola *et al.*, 2006). Otro de los genes que han sido implicados en respuesta a estrés y que también fue identificado en este estudio es el gen de la peroxidasa (EC 1.11.1.7), esta enzima cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno. Participa en la lignificación de las paredes celulares de la planta y en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Yoshida, *et al.*, 2003). La inducción de esta enzima se ha reportado en muchas condiciones de estrés, tal como radiación por UV, metales pesados, senescencia y por estrés hídrico (Smeets, *et al.*, 2005).

La categoría de proteínas de función desconocida, incluye genes cuya función no ha sido descrita en plantas y en otros organismos. Respecto a las secuencias de los ESTs que no mostraron identidad en la base de datos, por

un lado, podrían tratarse de secuencias correspondientes a regiones no traducibles (UTRs), o bien debido a que algunos fragmentos de ESTs son muy pequeños, la homología en estos sea muy baja con respecto a la secuencia de otros organismos.

### **Análisis de expresión diferencial de genes de frijol inducidos por *R. solani***

Para confirmar y analizar la expresión diferencial de los genes de frijol aislados en la genoteca, se analizó un grupo de genes mediante RT-PCR semi-cuantitativo. Como molde se empleó cDNA de la condición control y la condición problema de ambos tiempos de interacción (8 y 16 h). De los 136 uni-genes seleccionamos 6, los cuales están involucrados en la respuesta de defensa de la planta, estos codifican para: un receptor tipo cinasa (PvRK20-1; prólogo potencial del uni-gen 24), una fosfatasa ácida asociada a defensa (PA; uni-gen 64), una proteína relacionada a patogénesis (PR1; uni-gen 3), un factor de transcripción de respuesta a etileno (ERF; uni-gen 68), un inhibidor de poligalacturonasa (PGIP; uni-gen 44) y una  $\alpha$ -dioxigenasa ( $\alpha$ -DOX; uni-gen 39). Los oligonucleótidos específicos para cada gen se muestran en la Tabla 2. Para los 6 genes analizados, las intensidades de las señales fueron cuantificadas y los valores obtenidos se estandarizaron con la expresión del gen de la *actina-2* de frijol. El análisis RT-PCR mostro que los 6 genes analizados fueron inducidos en raíces de frijol durante su interacción con *R. solani* (datos no mostrados). Posteriormente, la expresión de estos genes fue analizada por RT-PCR cuantitativo (RT-qPCR), las intensidades de las señales fueron cuantificadas y los valores obtenidos se estandarizaron con la expresión

del gen del factor de elongación 1 (EF-1 $\alpha$ ) de frijol. El nivel de expresión del tratamiento control se normalizo al valor de 1.

El análisis RT-qPCR mostró que los genes analizados fueron diferencialmente expresados en raíces de frijol durante su interacción con *R. solani* (Figura 3). Genes como el receptor tipo cinasa (PvRK20-1), el factor de transcripción de respuesta a etileno (ERF) y la fosfatasa ácida asociada a defensa (PA) parecen ser genes de respuesta temprana ya que aunque son inducidos en ambos tiempos de interacción (8 y 16 h), se observa la mayor expresión a las 8 h de interacción (Figura 3 A, C, D, respectivamente).

Un caso contrario al perfil de expresión del ERF y la PA, fue la expresión de la  $\alpha$ -dioxigenasa ( $\alpha$ -DOX), la proteína de inhibidora de poligalacturonasa (PGIP) y la proteína relacionada a patogénesis (PR1), los cuales mostraron una mayor inducción del transcrito en raíz a las 16 h de interacción con el hongo fitopatógeno (Figura 3 B, E, F, respectivamente). Para la  $\alpha$ -DOX, a las 16 h de interacción se observó una inducción de la expresión de 80 veces más con respecto al control (Figura 3 B).

### **Caracterización funcional del receptor PvRK20-1**

En las interacciones planta-microorganismo un paso crucial para la activación de los mecanismos de defensa es el reconocimiento del patógeno. En el presente trabajo nos enfocamos a estudiar el receptor PvRK20-1, el cual es el potencial parálogo del uni-gen 24 obtenido en la SSH de frijol. Este receptor pudiera ejercer un papel primordial en el reconocimiento del patógeno y la posterior activación de la respuesta de defensa de la planta.

En la SSH de frijol-*R. solani* el uni-gen 24 corresponde a un EST de 461 pb que mostró un 84% de identidad con el cDNA del receptor PvRK20-1 (AAD21872) de frijol. Debido a que en la SSH de frijol no obtuvimos el ORF completo del uni-gen 24, seleccionamos a su parálogo de frijol, el receptor PvRK20-1, para poder realizar estudios funcionales durante la respuesta de defensa de la planta. Lange et al (1998), aislaron el cDNA completo de este receptor y reportaron que este contiene un marco de lectura abierta (ORF) de 1998 pb, bordeado por una región no traducible 5'(UTR5') de 12 pb y una región no traducible 3'(UTR3') de 159 pb. El ORF codifica un polipéptido de 666 aminoácidos con una masa molecular de 75 KDa y se subdivide en 4 dominios: un péptido señal en el amino terminal, un dominio extracelular hidrofílico constituido de 256 aminoácidos en el cual hay 2 copias del dominio DUF26, una integrada por el motivo CRGDVKPDECRRRC y la segunda por el motivo CTPDLSETDCNRC, un dominio transmembranal y en el extremo carboxi terminal un dominio Ser/Thr cinasa citoplasmático.

Para estudiar la función del receptor PvRK20-1 en frijol durante su interacción con *R. solani* se generó una construcción para sobre-expresar dicho gen. A partir de la secuencia de cDNA reportada en la base de datos, diseñamos un par de oligonucleótidos para amplificar el ORF completo del receptor, como molde empleamos el cDNA de frijol criollo (colecta 2094) de la condición problema. En el vector pENTR/D-TOPO clonamos el ORF del gen, esta construcción fue secuenciada para verificar la orientación del ORF. Posteriormente, para lograr la sobre-expresión en plantas, del vector pENTR/D-TOPO subclonamos el receptor PvRK20-1 en el vector binario pEarleyGate

103, el cual tiene el promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor. Con esta construcción se transformaron células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 y una clona transformante fue seleccionada para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana*.

### **Sobre-expresión del receptor PvRK20-1 en *Arabidopsis thaliana***

Con el objetivo de determinar si el receptor PvRK20-1 de frijol está involucrado en el mecanismo de defensa de la planta, decidimos sobre-expresarlo en *A. thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) la cual es susceptible a la cepa DGO1956A de *R. solani*. Para ello, plantas de 3 semanas de edad se transformaron con *A. tumefaciens* GV2260 con pPvRK20-1, dicho vector tiene como marcador de selección en planta el casete BAR el cual confiere resistencia al herbicida Basta. Actualmente, las plantas transformantes se mantienen en una cámara de crecimiento a 24°C ± 2°C y un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad en espera de obtener semillas. Plantas transformantes serán seleccionadas por su resistencia al herbicida Basta. Éstas serán empleadas para el análisis de fenotipo durante la interacción con *R. solani* y *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000.

### **Caracterización funcional de los receptores CRK27 y CRK26 de *Arabidopsis thaliana*, potenciales ortólogos del receptor PvRK20-1 de *Phaseolus vulgaris*.**

Para estudiar la pérdida de función de receptores tipo CRK de *A. thaliana* ortólogos al gen PvRK20-1 de frijol, se realizó un análisis bioinformático en el

genoma de *Arabidopsis* para identificar los potenciales ortólogos. Mediante este análisis identificamos los receptores CRK27 (At4g21230) y CRK26 (At4g38830) los cuales mostraron una identidad del 50% aproximadamente con el receptor PvRK20-1 de frijol. Con este análisis, también pudimos identificar otros receptores como el CRK28 (At4g21400), CRK29 (At4g21410) y CRK41 (At4g00970) los cuales también exhiben homología al receptor de frijol. La secuencia de aminoácidos de estos receptores y el de frijol se alinearon con el programa Clustal W y el árbol filogenético se muestra en la Figura 4. Según este análisis el receptor PvRK20-1 de frijol se agrupa principalmente con los receptores CRK27 y CRK26 de *A. thaliana*. La función exacta de estos receptores no ha sido determinada aún, sin embargo en referencia a datos de microarreglos (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) se observó que los receptores CRK27 y CRK2 son expresados principalmente en raíz y que su expresión es inducida en respuesta a patógenos y moléculas inductoras del sistema de defensa.

Conjuntamente, mediante un análisis de la región promotora de los genes CRK26 y CRK27 de *A. thaliana* empleando la base de datos PLACE ([www.dna.affrc.go.jp/PLACE](http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE), Higo *et al.*, 1999), se identificaron en la región promotora de ambos receptores cajas W [(T)TGAC(C/T)], estas son reconocidas por factores de transcripción del tipo WRKY, los cuales son inducidos por patógenos y AS, regulando así respuestas de defensa en las plantas (Dong *et al.*, 2003). La presencia de cajas W en la región promotora de los receptores CRK26 y CRK27 (Figura 5) sugiere que son activados por estos factores de transcripción WRKY. Experimentos para analizar si estos dos

receptores son inducidos por AS están siendo llevados a cabo por nuestro grupo de investigación.

Por todo lo anterior, nosotros seleccionamos el receptor CRK27 y su parólogo potencial el CRK26 de *A. thaliana* para su caracterización funcional, utilizando mutantes insercionales de T-DNA. Para el gen CRK27 seleccionamos la línea insercional Salk\_21591. En esta línea, el T-DNA se inserto en el exón 1, a 397 nt rio abajo del ATG y a 427 nt del posible sitio de inicio de la transcripción (Figura 6 A). Plantas de Arabidopsis de la línea Salk\_021591 fueron tipificadas como homocigotas para dicho gen mediante PCR y empleando los oligonucleótidos CRK27-RP y CRK27-LP (Figura 6 A, B).

Para el análisis del receptor CRK26 se seleccionaron las líneas WISCDSLOX466F3 y Sail\_805\_E01. En la primera el T-DNA se inserto 68 nt rio arriba del ATG (Figura 7 A) y en la línea Sail\_805\_E01 el T-DNA esta a 33 nt rio abajo del ATG (Figura 7 A). Plantas de ambas líneas fueron tipificadas como homocigotas mediante PCR empleando los oligonucleótidos CRK26-RP y CRK26-LP (Figura 7 A, B , C). Además, la presencia del T-DNA se confirmó por PCR empleando los oligonucleótidos LB1 del borde izquierdo del T-DNA y el CRK26-RB (Figura 7 B, C).

## DISCUSIÓN

La pudrición de raíz del frijol, es una de las enfermedades más importantes que afectan la productividad y desarrollo de este cultivo, además se encuentra ampliamente distribuida en México y en diversas regiones del mundo, uno de los principales agentes causales de la enfermedad es el hongo necrotrófico *Rhizoctonia solani*. En esta investigación se desarrollo una genoteca substractiva para aislar genes de frijol criollo (colecta 2094) que potencialmente se induzcan durante su interacción incompatible con *R. solani*. Muchos de los genes identificados en este estudio mostraron homología a genes ya reportados, incluyendo a genes que ya han sido implicados previamente en la defensa de la planta contra el ataque de patógenos. Tal es el caso de varios uni-genes (23%) que mostraron homología a proteínas relacionadas a patogénesis (PR) como PR-2 ( $\beta$ -1,3-glucanasas) (Kauffmann *et al.*, 1987), PR-4 (tipo heveina) (Potter, *et al.*, 1993), PR-10 (tipo ribonucleasa) (Walter *et al.*, 1996), PR-1 y PR-14 (proteína de transporte de lípidos) (van Loon *et al.*, 2006). La inducción de algunas de estas proteínas ya ha sido reportada en frijol durante su interacción con *R. solani*, tal es el caso de las proteínas PR10a y PR10c las cuales se acumulan en raíces de frijol infectadas con el patógeno (Marra *et al.* 2006). En la interacción frijol-*R. solani*, estas proteínas pudieran estar actuando sinérgicamente para inhibir el crecimiento del patógeno, puesto que la expresión de proteínas PR se ha correlacionado con el desarrollo de la resistencia sistémica adquirida (Ryals *et al.*, 1996; Verhagen *et al.*, 2006), al aislar transcritos de proteínas PR en nuestra genoteca con este sistema de

interacción sugiere que la planta activo este mecanismo de defensa contra el hongo.

Otro grupo importante de uni-genes (12%) mostraron homología a enzimas involucradas en el metabolismo secundario tal como fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato 4-hidroxilasa (Ca4H) y chalcona sintasa (CHS). Estas enzimas participan en la biosíntesis de compuestos fenólicos como los fenilpropanoides y flavonoides los cuales tienen actividad antimicrobiana (Montesinos, 2000). En frijol, ya se ha reportado que un incremento en la producción de flavonoides como la faseolina esta correlacionado con la resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum*, el agente causal de la antracnosis (Durango *et al.*, 2002). Es posible que durante la interacción de frijol con *R. solani* estas enzimas también estén participando en el mecanismo de resistencia a la enfermedad mediante la síntesis de compuestos antimicrobianos, así como en la formación de precursores para la síntesis de lignina para fortalecer las barreras estructurales y retardar la entrada del patógeno.

Una de las categorías en donde se agruparon un porcentaje importante de uni-genes fue la de estrés biótico y abiótico en la planta. Incluido en este grupo está el uni-gen 8 que mostro similitud al gen que codifica la enzima glutatión S-transferasa. Se ha propuesto que esta enzima está involucrada en procesos de detoxificación celular y en interacciones planta-microorganismo, así como en la inducción de genes relacionados a defensa (Frendo *et al.*, 2005). En la interacción planta-patógeno, esta enzima pudiera estar ayudando a prevenir un daño excesivo en la planta causado por ROS que se producen y acumulan

durante la HR que se ha asociado generalmente con interacciones incompatibles (Heath, 2000).

Otro grupo de genes identificados en este trabajo y que también pudieran estar participando en la respuesta de defensa del frijol al ataque de *R. solani* son genes implicados en la transducción de señales, entre estos se encuentran un RLK y la proteína cinasa Pti-1. Esta cinasa está implicada en la respuesta hipersensible mediada por el gen de resistencia Pto así como en la activación de genes de defensa (Zhou *et al.*, 1998).

Otros uni-genes mostraron homología a genes implicados en transporte, síntesis de proteínas y factores de transcripción. Por otro lado, algunas de las secuencias aisladas en este trabajo no mostraron identidad en la base de datos por lo que pudieran corresponder a regiones UTR, como lo sugiere la presencia de una secuencia de Poli A en algunos de estos ESTs, o bien debido a que algunos fragmentos son muy pequeños, la homología en estos sea muy baja con respecto a la secuencia de otros organismos.

De los genes identificados en este trabajo seleccionamos 6 para medir mediante RT-qPCR su expresión diferencial en raíces de frijol infectadas con *R. solani*, en otros sistemas vegetales estos genes ya han sido implicados en la respuesta de defensa de la planta contra patógenos.

Entre estos se encuentra una fosfatasa ácida asociada a defensa (PA), esta es una fosfohidrolasa que cataliza la desfosforilación de una amplia variedad de sustratos (Duff *et al.*, 1994). La inducción de este transcrito se ha reportado durante la interacción incompatible de chícharo (*Pisum sativum*) con *Fusarium oxysporum* (Luhová *et al.*, 2006). En nuestro trabajo, observamos que durante

la interacción entre frijol criollo (colecta 2094) y *R. solani* el transcrito de la PA se expresa diferencialmente a las 8 h de interacción con el patógeno, lo que sugiere que este pudiera ser un gen de respuesta temprana. Recientemente, Jakobek y Lindgren (2002), reportaron una acumulación de este transcrito en plantas de frijol a las 2 h de interacción con *Pseudomonas syringae*, en donde observaron que la inducción del transcrito correlaciona con la activación de la HR inducida por *P. syringae*. En nuestro sistema al ser un sistema de interacción incompatible posiblemente esta fosfatasa juegue un papel similar en plantas de frijol infectadas con *R. solani*. Hasta ahora, la función exacta de las fosfatasas ácidas durante el mecanismo de defensa de la planta no ha sido determinada; sin embargo se conoce que enzimas con actividad fosfatasa regulan un gran número de enzimas, una de ellas es la oxidasa dependiente de NADPH la cual es activa en su forma fosforilada (Low y Merida, 1996) y participa en la síntesis de superóxido ( $O_2^-$ ) que por la acción de la enzima superóxido dismutasa forma  $H_2O_2$ , el cual está implicado en la inducción de la HR (Greenberg, 1997).

También analizamos la expresión diferencial de un gen que codifica una proteína inhibidora de poligalacturonasa (PGIP). Las PGIPs son miembros de una clase de proteínas anti-fúngicas que potencialmente inhiben la actividad de enzimas producidas por los hongos que degradan las paredes celulares de la planta. Estas proteínas se han identificado en las paredes celulares de varias especies de plantas y tienen un gran potencial para limitar la colonización del hongo actuando como inhibidores y reguladores de la actividad de poligalacturonasas fúngicas (De Lorenzo *et al.*, 2001). Durante la interacción

entre *C. lindemuthianum* y *P. vulgaris* una rápida acumulación de este transcrito se asocia con la HR en interacciones incompatibles (Nuss *et al.*, 1996). En estas interacciones, hay una mayor acumulación del transcrito en células epidérmicas próximas al sitio de la infección y en algunas capas de células parenquimales (Devoto *et al.*, 1997). Nosotros observamos una expresión diferencial de este transcrito en raíces de frijol inoculadas con *R. solani*. Esta proteína al formar complejos de alta afinidad con endopoligalacturonasas del hongo podría estar modulando la actividad catalítica de estas enzimas, favoreciendo así la acumulación de oligogalacturonidos que induzcan otras respuestas de defensa en la planta.

Durante la respuesta de defensa de la planta al ataque de un patógeno los niveles de expresión de diversos transcritos son regulados por factores de transcripción (Gachomo *et al.*, 2003). En este contexto, entre los mejor caracterizados se encuentran los ERFs (factores de respuesta a etileno), esta es una familia de factores de transcripción exclusiva de plantas (Zhang *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2006) cuya expresión es inducida por etileno (ET) y ácido jasmónico (AJ) (Singh, 2002; Lorenzo *et al.*, 2003). ERF1, un miembro de esta familia, es inducido por *Botritis cinerea* y su expresión constitutiva en plantas transgénicas de *Arabidopsis* es suficiente para conferir resistencia a varios hongos necrotróficos como *B. cinérea* y *Plectosphaerella cucumerina* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). Resultados de nuestro análisis RT-qPCR confirmaron la inducción del ERF en raíces de frijol inoculadas con *R. solani* (Figura 2 C). Se sabe que estos factores de transcripción se unen a cajas regulatorias del tipo GCC presentes en los promotores de genes inducibles por ET/AJ, como los

genes PR. Tal es el caso de la proteína PR-1 la cual es inducida por ambas hormonas (Agrawal *et al.*, 2000). La proteína PR-1 es empleada comúnmente como marcador de un incremento en la respuesta de defensa conferido por la SAR inducida por patógenos (van Loon *et al.*, 1999). Aunque la función biológica de estas proteínas no se conoce en detalle, se ha descrito que presentan actividad antifúngica (Rauscher *et al.*, 1999). Hoege *et al.* (2002), reportaron una acumulación tanto del transcrito como de la proteína PR-1 en hojas de papa en respuesta a la infección con *Phytophthora infestans*. En nuestro sistema de interacción observamos un incremento significativo en la expresión de este transcrito (PvPr1) en raíces de frijol inoculadas con *R. solani* (Figura 2 F). Un resultado similar fue obtenido por van Loon *et al.* (2006) en el que el gen PR-1 (At2g14610) de *A. thaliana* es inducido por patógenos, insectos y compuestos químicos.

Otro de los genes implicados en defensa son las  $\alpha$ -dioxinasas, estas enzimas participan en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados para formar oxilipinas como el ácido jasmónico, el cual induce la expresión de genes implicados en defensa (Hammond-Kosack y Parker, 2003). En tabaco y *Arabidopsis* el gen  $\alpha$ -DOX1 se induce en respuesta a *P. syringae*, y se observa una mayor acumulación tanto del transcrito como de la proteína cuando la infección resulta en una HR (Ponce de Leon *et al.*, 2002; Hamberg *et al.*, 2003). Nosotros observamos que en raíces de frijol infectadas con *R. solani* este gen incrementa su expresión durante la interacción con el patógeno, observándose una mayor expresión a las 16 h de interacción (Figura 2 B). En *Arabidopsis*, este gen es inducido por AS, por  $O_2^-$  y óxido nítrico (NO) y su inducción se ha

correlacionado con la HR (Ponce de Leon *et al.*, 2002). Durante este proceso la enzima protege a los tejidos de la planta de experimentar una necrosis excesiva, además su activación es parte de un mecanismo de defensa para proteger a las células de estrés oxidativo (Hamberg *et al.*, 2005).

Otro de los genes analizados fue el PvRK20-1, el cual es el potencial parólogo del uni-gen 24 obtenido en la SSH de frijol. El gen PvRK20-1 codifica un receptor tipo cinasa constituido por un péptido señal en el amino terminal, un dominio extracelular hidrofílico en el que posee 2 copias del dominio de función desconocida (DUF26), el cual está integrado por el motivo C-X8-C-X2-C, un dominio transmembranal y en el extremo carboxi terminal un dominio Ser/Thr cinasa citoplasmático (Lange *et al.*, 1999). Mediante un análisis RT-qPCR determinamos que este transcrito se induce en respuesta a *R. solani*, observándose una inducción del transcrito de 16 veces con respecto al control a las 8 h de interacción con el patógeno, lo que sugiere que este pueda ser un gen de defensa temprano. Durante las primeras horas de interacción con *R. solani*, este receptor pudiera estar participando en el reconocimiento de moléculas derivadas del patógeno, induciendo así el mecanismo de defensa de la planta.

Lange et al (1999), reportaron la inducción del receptor PvRK20-1 durante la interacción incompatible de frijol con *Fusarium solani* f.sp *pisi* donde se observó una mayor acumulación del transcrito en raíces de frijol en tiempos tempranos (3 h) de interacción con el patógeno, mientras que en la interacción compatible de frijol con *Fusarium solani* f sp. *phaseoli* el transcrito se acumula mayoritariamente 9 h después de la inoculación con el patógeno.

La inducción de estos receptores tipo cinasa ya ha sido reportada en otros sistemas vegetales como *A. thaliana*. Chen et al (2004), reportaron la inducción del receptor CRK5 en respuesta a *P. syringae* y AS. Por otro lado, la sobre-expresión de este receptor llevo a un incremento en la resistencia de Arabidopsis al patógeno, este incremento se asocio principalmente con una inducción más rápida de genes de defensa como PR1.

Debido a que en las interacciones planta-microorganismo, un paso crucial para la activación de los mecanismos de defensa de la planta es el reconocimiento del patógeno, nosotros nos enfocamos a estudiar el posible papel del receptor PvRK20-1 en la respuesta de defensa. Para ello, generamos una construcción para sobre-expresar el receptor PvRK20-1 de frijol en plantas de *A. thaliana*, la cual es susceptible a la cepa DGO1956A de *R. solani*. La transformación de estas plantas fue mediada por *A. tumefaciens* GV2260 siguiendo el método descrito por Clough y Bent, (1998). Hasta ahora estas plantas se mantienen en una cámara de crecimiento en espera de que produzcan semilla, las cuales serán analizadas para identificar las transformantes y éstas serán empleadas para ensayos de interacción planta-patógeno.

Aunado a esto, mediante un análisis BLASTX en el genoma de *A. thaliana* identificamos un grupo de receptores que presentan homología al receptor PvRK20-1 de frijol, de estos seleccionamos los receptores CRK27 y CRK26 para estudiar su función durante el ataque de *R. solani*. Datos de microarreglos muestran que estos receptores se expresan principalmente en raíz, así como el receptor PvRK20-1 de frijol, lo que concuerda con el análisis filogenético, donde el receptor de frijol se agrupa en el mismo clado que los receptores

CRK26 y CRK27 de Arabidopsis. El análisis en la región promotora de estos receptores mostró la presencia de cajas W, lo que sugiere que estos receptores puedan ser activados por factores de transcripción WRKY. Estos factores de transcripción son inducidos por patógenos y AS y regulan la expresión de genes de defensa de la planta (Dong *et al.*, 2003). La regulación de receptores tipo cinasa por factores de transcripción WRKY ya ha sido reportada, tal es el caso de los receptores CRK5, CRK6, CRK10 y CRK11, los cuales poseen cajas W en su región promotora. La mutación de una de las cajas W del receptor CRK10 ocasiona una disminución en la inducción de este transcrito, lo que sugiere que esta pudiera estar actuando como un enhancer para las otras cajas presentes (Du y Chen, 2000).

Para estudiar la función de estos receptores adquirimos tres líneas mutantes insersionales por T-DNA, en donde seleccionamos a las plantas homocigotas para la inserción del T-DNA mediante tipificación molecular. En estas líneas se analizará la expresión de los transcritos CRK27 y CRK26 mediante RT-PCR. Conjuntamente, plantas de estas líneas serán empleadas para evaluar el fenotipo durante su interacción con *R. solani*.

El estudio de los eventos moleculares que tienen lugar en frijol durante su interacción con *R. solani* permitirá elucidar los mecanismos de defensa al patógeno. En esta investigación nosotros reportamos la primera SSH de frijol obtenida durante su interacción incompatible con el hongo fitopatógeno *R. solani*. Las secuencias obtenidas en este trabajo enriquecerán la colección de ESTs de frijol disponibles hasta ahora. Además, la caracterización funcional de algunos de los uni-genes identificados en este trabajo contribuirán a la



generación de conocimiento en el área de interacción planta-microorganismo, así como a la generación de cultivares de frijol más resistentes a la enfermedad.

## PERSPECTIVAS

- Obtener el cDNA completo del uni-gen 24 que codifica para un receptor del tipo CRK mediante RACE 5' y 3'.
- Las semillas de *Arabidopsis thaliana* obtenidas de las plantas transformadas con *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 con el plásmido pPvRK20-1 serán caracterizadas por su resistencia al herbicida Basta. Las líneas transgénicas resistentes al herbicida serán analizadas por RT-PCR para cuantificar la sobre-expresión del receptor PvRK20-1 y éstas serán empleadas para realizar estudios de interacción con *Rhizoctonia solani* y evaluar el fenotipo.
- Analizar mediante RT-PCR plantas homocigotas de las líneas de T-DNA Salk\_21591, WISCDSLOX466F3 y Sail\_805\_E01 de *A. thaliana* para verificar la ausencia de los transcritos y así obtener líneas knock-out para los receptores CRK26 y CRK27. Las líneas knock-out para los receptores CRK26 y CRK27 serán confrontadas con *R. solani* para analizar el fenotipo.
- Realizar estudios de pérdida de función del receptor PvRK20-1 en frijol. Para ello se pretende generar una construcción para silenciar el receptor PvRK20-1 en plantas de frijol criollo colecta 2094. La transformación de frijol será mediada por *A. rhizogenes*. El silenciamiento del receptor PvRK20-1 en las raíces peludas (hairy roots) inducidas por *A. rhizogenes* será confirmado mediante RT-PCR y estas raíces silenciadas serán confrontadas con *R. solani* para evaluar el fenotipo.
- Aislar la región promotora del receptor PvRK20-1 y fusionarla a la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) para determinar donde se expresa este receptor y como cambia su nivel de expresión en tejido y en tiempo bajo la interacción de diferentes microorganismos tanto patógenos como simbioses, y la aplicación de hormonas relacionadas a la respuesta al estrés.

## FIGURAS



Figura 1. Esquema de la organización del T-DNA del vector pEarleyGate 103. El T-DNA incluye la secuencia del borde izquierdo (LB) y derecho (RB) para la transferencia del T-DNA mediada por *Agrobacterium*. BAR, gen de resistencia al herbicida Basta para la selección de plantas transgénicas. 35S, promotor 35S del virus del mosaico de la Coliflor y su enhancer río arriba. *attR1* y *attR2*, bordes para la recombinación. CmR, gen de resistencia a cloramfenicol. *ccdB*, gen letal que codifica a una toxina que tiene como blanco la DNA girasa en *E. coli*. GFP, proteína verde fluorescente. 6xHis, secuencia de poli-histidinas para la purificación de la proteína recombinante. OCS, secuencia 3' UTR del gen de la octopina sintasa, incluyendo la secuencia de poliadenilación y el terminador de la transcripción.

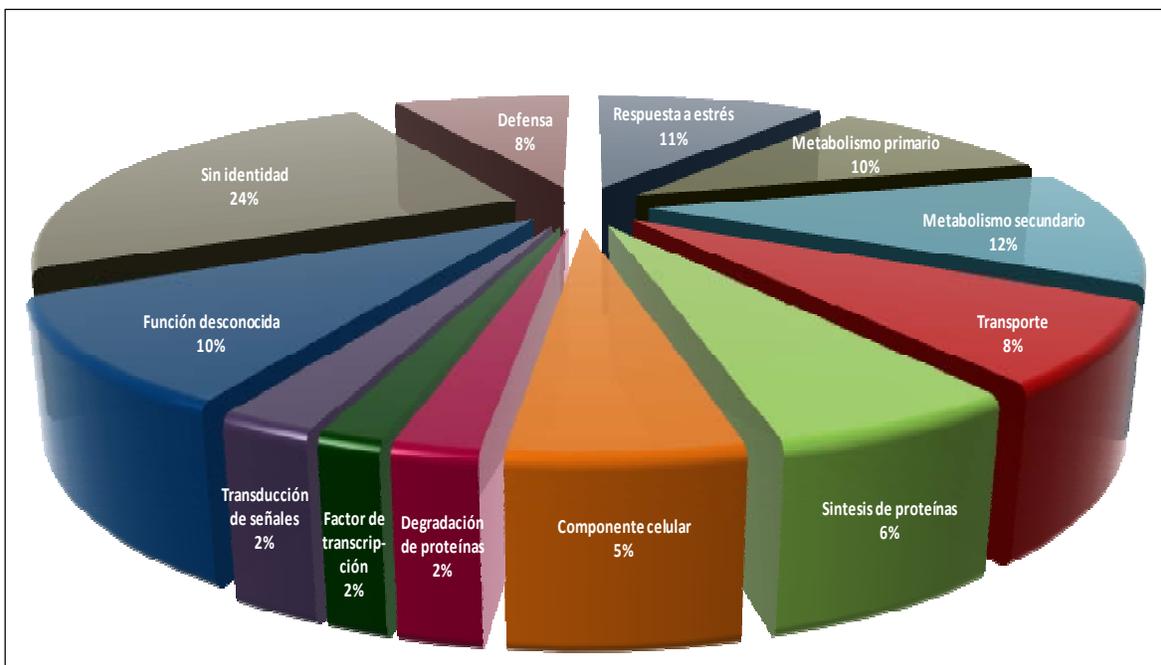


Figura 2. Clasificación funcional de genes aislados de *Phaseolus vulgaris* L. en interacción con *Rhizoctonia solani* con base en el programa Gene Ontology (GO, [www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)).

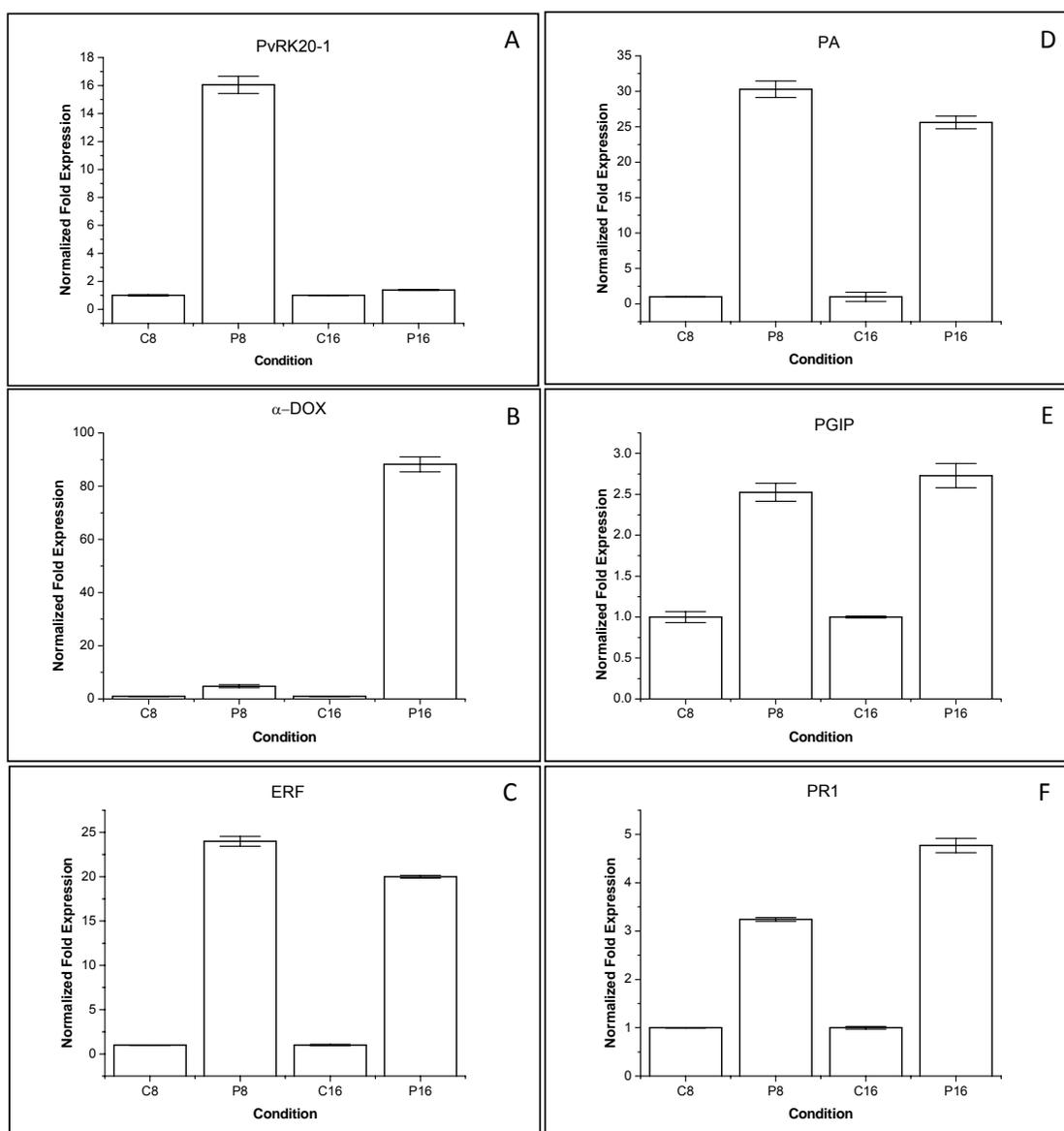


Figura 3. Análisis de expresión diferencial por RT-qPCR de genes de *Phaseolus vulgaris* L. en interacción con *Rhizoctonia solani*. A) PvRK20-1 (Receptor tipo cinasa); B)  $\alpha$ -DOX ( $\alpha$ -dioxigenasa); C) ERF (Factor de transcripción de respuesta a etileno); D) PA (Fosfatasa ácida asociada a defensa); E) PGIP (Proteína inhibidora de poligalacturonasa) y F) PR1 (Proteína relacionada a patogénesis 1). Plantas control a las 8 y 16 h (C8 y C16) y plantas infectadas con *Rhizoctonia solani* a las 8 y 16 h (P8 y P16).

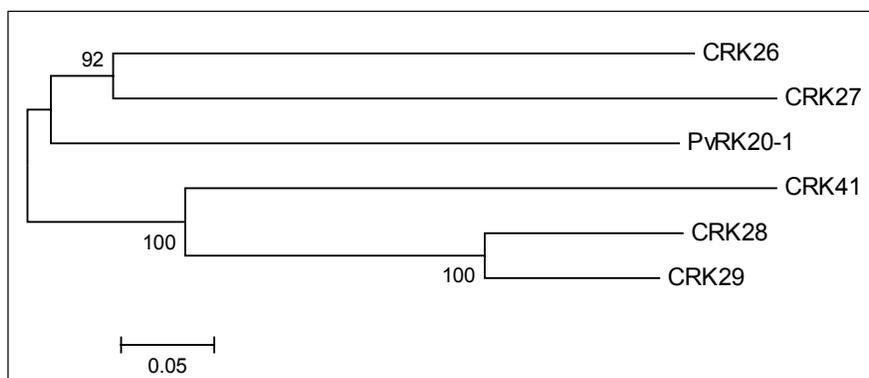


Figura 4. Análisis filogenético de receptores del tipo CRK de *Arabidopsis thaliana* y el receptor PvRK20-1 de *Phaseolus vulgaris* L. CRK26 (NP195594), CRK27 (NP193855), PvRK20-1 (AAD21872), CRK41 (NP567204), CRK28 (NP193871) y CRK29 (NP193872). El método de alineamiento empleado fue Clustal W (MEGA 4). Los números en los nodos principales representan la frecuencia en que los nodos se conservan con un análisis bootstrap para 1000 iteraciones.

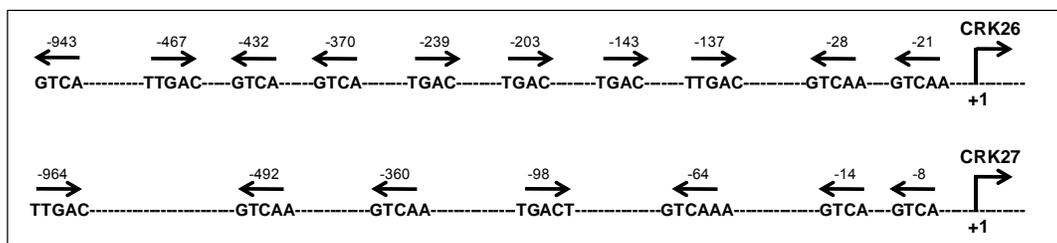


Figura 5. Cajas regulatorias W identificadas con el programa PLACE presentes en la región promotora de los genes de los receptores CRK26 y CRK27 de *Arabidopsis thaliana*.

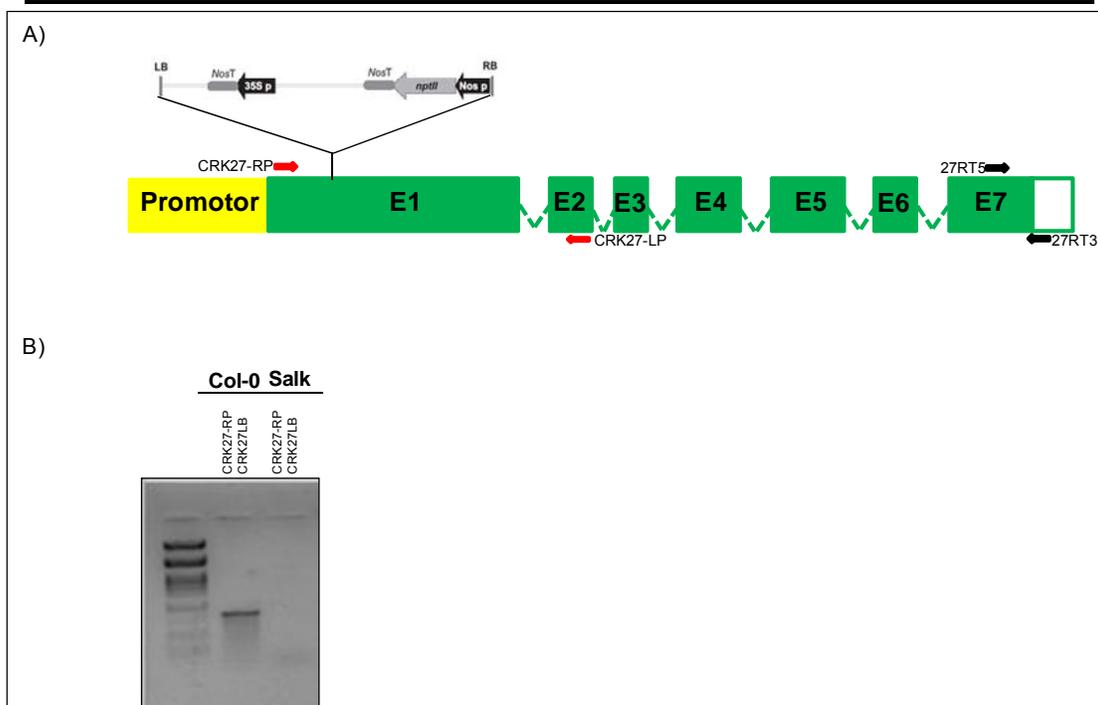


Figura 6. Tipificación molecular de la línea Salk\_21591 de *Arabidopsis thaliana*. A) Sitio de inserción del T-DNA en el locus CRK27 (At4g21230) y B) Caracterización genotípica de la línea homocigota Salk\_21591 mediante PCR. Las plantas homocigotas fueron identificadas empleando DNA genómico como templado y los oligonucleótidos CRK27-RP y CRK27-LP que se alinean a la secuencia genómica del receptor CRK27.

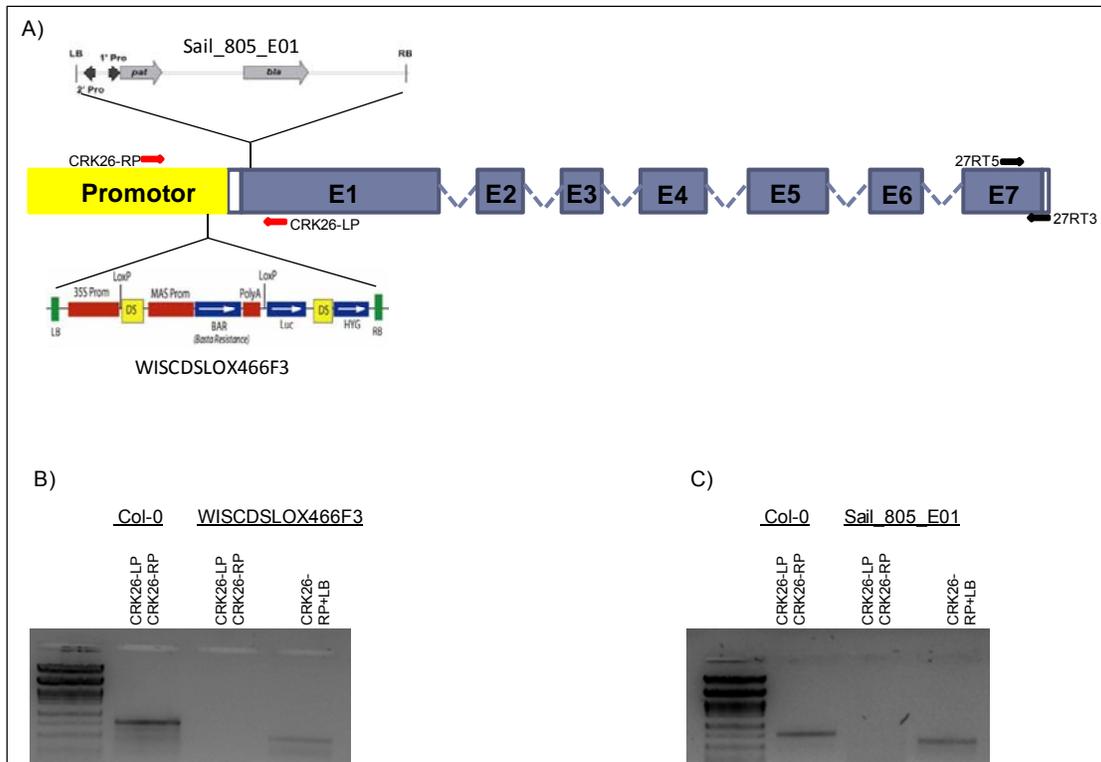


Figura 7. Tipificación molecular de las líneas WISCDLSLOX466F3 y Sail\_805\_E01 de *Arabidopsis thaliana*. A) Sitios de inserción del T-DNA en el locus CRK26 (At4g38830); B y C) Caracterización genotípica de líneas homocigotas WISCDLSLOX466F3 y Sail\_805\_E01. Las líneas homocigotas se caracterizaron mediante PCR utilizando DNA genómico como templado y los oligonucleótidos CRK26-RP y CRK26-LP. La presencia del T-DNA se determinó empleando los oligonucleótidos CRK26-RP y LB1, los cuales se alinean a la secuencia genómica del receptor CRK26 y al borde izquierdo (LB<sub>T-DNA</sub>) del T-DNA respectivamente.

## TABLAS

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos empleados para los análisis de expresión génica por RT-PCR y RT-qPCR durante la interacción frijol-*Rhizoctonia solani*.

| Gen (No. de acceso)  | Oligonucleótidos  |
|--|---|
| Proteína relacionada a patogénesis-1 (PR1) (P25985)                  | Fwd 5'-AAAGCCAAGAGCGATTCTCTTTTCA-3'<br>Rev 5'-AACACTCTGATTTGATAACACTTC-3' |
| Inhibidor de poligalacturonasa (PGIP) (AAZ32892)                     | Fwd 5'- ATCACCTCCCTCCTCATTTATCCT-3'<br>Rev 5'- TTTAGTGAGGTTGGCGATGGTG-3'  |
| $\alpha$ -Dioxigenasa-1 ( $\alpha$ -DOX1) (AJ784963)                 | Fwd 5'- CACAAATCCTCCCAAATGG -3'<br>Rev 5'-AAAGGTTACACCATGATTGG -3'        |
| Fosfatasa ácida asociada a defensa (PA)(AY055218)                    | Fwd 5'-CTGCAAATCCTGCTGTCAGATTATT -3'<br>Rev 5'-AATGAGACGCTGATAGCCAGCAA-3' |
| Factor de transcripción de respuesta a etileno-5 (ERF5) (NM128929.2) | Fwd 5'-TCGGTATAGAGGGATTCCGAGAA-3'<br>Rev 5'-TCATTTGGGAAGTTAAGAATGGCTC-3'  |
| Receptor tipo cinasa (PvRK20-1) (AAD21872)                           | Fwd ' CACCATGGCTGCCATTTCTTGCATC-3'<br>Rev CTAGCGAGGATACGGCTCAGTG-3        |

Tabla 2. Clasificación de las secuencias de los ESTs aislados en la SSH

| Uni-gen                       | No. de contig<br>(Secuencias que lo conforman) | No. de Acceso | Identidad (%) | E-value | Organismo                   | Mayor homología BLASTN/BLASTX  |
|-------------------------------|--|---------------|---------------|---------|-----------------------------|--|
| <b>Defensa</b>                |  |               |               |         |                             |  |
| 1                             | 1(59)  | CAA65727      | 100           | 3e-77   | <i>Phaseolus vulgaris</i>   | Intracellular pathogenesis related protein 2 (PvPR2)                 |
| 2                             | 2(1)   | X96999.1      | 100           | 5e-122  | <i>Phaseolus vulgaris</i>   | Intracellular pathogenesis related protein 10 (PvPR10)               |
| 3                             | 3(2)   | P25985        | 94            | 7e-75   | <i>Phaseolus vulgaris</i>   | Pathogenesis-related protein 1 (PvPR1)                               |
| 1                             | 4(1)   | CAA65727      | 68            | 2e-23   | <i>Phaseolus vulgaris</i>   | Intracellular pathogenesis related protein 2 (PvPR2)                 |
| 2                             | 6(2)   | X96999.1      | 86            | 3e-68   | <i>Phaseolus vulgaris</i>   | Intracellular pathogenesis related protein 10 (PvPR10)               |
| 2                             | 7(1)   | X96999.1      | 75            | 2e-50   | <i>Phaseolus vulgaris</i>   | Intracellular pathogenesis related protein 10 (PvPR10)               |
| 1                             | 16(1)  | X61364        | 69            | 2e-26   | <i>Phaseolus vulgaris</i>   | Intracellular pathogenesis related protein 2 (PvPR2)                 |
| 17                            | 36(1)  | BAB86894      | 88            | 7e-45   | <i>Glycine max</i>          | Syringolide-induced protein B13-1-9                                  |
| 18                            | 38(1)  | NM_113159.3   | 81            | 8e-08   | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) (PR-14) |
| 21                            | 51(1)  | CAB62537      | 72            | 5e-49   | <i>Hevea brasiliensis</i>   | Pseudo-hevein  |
| 18                            | 67(1)  | NP_566712     | 57            | 1e-29   | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)         |
| 44                            | 91(1)  | AAZ32892      | 80            | 3e-26   | <i>Medicago sativa</i>      | Polygalacturonase inhibitor protein                                  |
| 45                            | 93(1)  | NP_187123     | 76            | 8e-54   | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Pathogenesis-related protein 4 (PR4)                                 |
| 2                             | 101(1)   | AY560551.1    | 70            | 1e-06   | <i>Gossypium barbadense</i> | Ribonuclease-like protein (PR10)                                     |
| 59                            | 116(1)   | NM_104598.2   | 75            | 9e-10   | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Disease resistance-responsive protein-related                        |
| 64                            | 128(1)   | AY055218      | 99            | 0       | <i>Phaseolus vulgaris</i>   | Putative defense associated acid phosphatase                         |
| 71                            | 146(1)   | NM_125258     | 87            | 1e-95   | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Rotamase CyP-7 (ROC7)  |
| <b>Metabolismo Secundario</b> |  |               |               |         |                             |  |
| 4                             | 5(3)   | EU737111.1    | 89            | 6e-165  | <i>Vigna unguiculata</i>    | Isoflavone synthase 2 gene   |
| 6                             | 10(1)  | AAK28509      | 86            | 1e-50   | <i>Fragaria x ananassa</i>  | cinnamyl alcohol dehydrogenase                                       |
| 11                            | 18(2)  | CAI56334      | 88            | 2e-36   | <i>Vitis vinifera</i>       | TPA: isoflavone reductase-like protein 5                             |
| 13                            | 22(1)  | EU737110.2    | 93            | 8e-83   | <i>Vigna unguiculata</i>    | Isoflavone synthase 1  |
| 13                            | 23(8)  | EU737110.2    | 88            | 0       | <i>Vigna unguiculata</i>    | Isoflavone synthase 1  |
| 4                             | 24(1)  | EU737111.1    | 97            | 3e-129  | <i>Vigna unguiculata</i>    | Isoflavone synthase 2  |
| 80                            | 27(1)  | AAM65213      | 100           | 6e-10   | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Flower pigmentation protein ATAN11                                   |
| 11                            | 43(2)  | AJ003245.1    | 83            | 0       | <i>Glycine max</i>          | Putative NADPH:isoflavone reductase                                  |

|                             |        |                |     |        |  |   |
|-----------------------------|--------|----------------|-----|--------|--|---|
| 4                           | 47(7)  | EU616500.1     | 92  | 0      | <i>Vigna unguiculata</i>                   | Isoflavone synthase 2   |
| 81                          | 78(1)  | AY315650.1     | 81  | 2e-108 | <i>Pueraria montana</i> var. <i>lobata</i> | Isopentenyl pyrophosphate isomerase                                   |
| 82                          | 87(1)  | AF529300.1     | 89  | 9e-72  | <i>Glycine max</i>                         | Ascorbate oxidase precursor   |
| 47                          | 96(1)  | NM_001124859.1 | 68  | 1e-21  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                | Shikimate kinase family protein (AT2G16790)                           |
| 50                          | 99(1)  | AY701852       | 77  | 2e-89  | <i>Lycopersicon chilense</i>               | Putative 4-coumarate-CoA ligase                                       |
| 70                          | 140(1) | AB269913.1     | 81  | 1e-27  | <i>Solanum melongena</i>                   | Cinnamate 4-hydroxylase   |
| 13                          | 160(1) | EU737110.2     | 68  | 1e-05  | <i>Vigna unguiculata</i>                   | Isoflavone synthase 1   |
| 72                          | 162(1) | ABE67978       | 76  | 9e-12  | <i>Caragana jubata</i>                     | Myc-like anthocyanin regulatory protein                               |
| 78                          | 177(1) | U15777.1       | 77  | 1e-106 | <i>Lupinus albus</i>                       | Farnesyl pyrophosphate synthase ( <i>fps1</i> )                       |
| 51                          | 102(1) | AB0026671      | 79  | 5e-109 | <i>Vigna angularis</i>                     | ACC-oxidase   |
| 54                          | 105(1) | NM_112487.3    | 77  | 2e-23  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                | Acyl-activating enzyme 13 (AAE13) (AT3G16170)                         |
| 79                          | 179(1) | X63521         | 66  | 4e-04  | <i>Phaseolus vulgaris</i>                  | Lipoxygenase  |
| 135                         | 60(2)  | NP_192203      | 40  | 6e-18  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                | Oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein                   |
| 6                           | 49(1)  | EEF52180       | 60  | 8e-05  | <i>Ricinus communis</i>                    | Alcohol dehydrogenase   |
| <b>Transporte</b>           |        |                |     |        |  |   |
| 5                           | 9(1)   | CAA53366       | 88  | 3e-13  | <i>Oryza sativa</i>                        | Cytochrome b5   |
| 15                          | 33(1)  | AJ239051       | 83  | 3e-39  | <i>Cicer arietinum</i>                     | Cytochrome P450   |
| 30                          | 66(1)  | ABE93893       | 55  | 6e-30  | <i>Medicago truncatula</i>                 | Heavy metal transport/detoxification protein                          |
| 37                          | 81(1)  | ABO84810       | 93  | 8e-16  | <i>Medicago truncatula</i>                 | Cytochrome c  |
| 41                          | 86(1)  | NP_851109      | 77  | 1e-40  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                | LHT1 (Lysine histidine transporter 1)                                 |
| 46                          | 95(1)  | BAA31582       | 83  | 2e-59  | <i>Glycine max</i>                         | Mitochondrial phosphate transporter                                   |
| 55                          | 106(1) | NM_114716.3    | 86  | 5e-21  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                | Protein transport SEC61 gamma subunit,                                |
| 57                          | 108(1) | DQ072165.1     | 98  | 2e-156 | <i>Phaseolus coccineus</i>                 | Mitochondrial voltage-dependent anion-selective channel               |
| 61                          | 118(1) | NM_118160.4    | 75  | 5e-49  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                | GSNAP (Gamma-soluble NSF attachment protein)                          |
| 41                          | 126(1) | NP_851109      | 77  | 1e-40  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                | LHT1 (Lysine histidine transporter 1)                                 |
| 46                          | 154(1) | AB257216.1     | 85  | 7e-84  | <i>Lotus japonicus</i>                     | LjPT2 gene for phosphate transporter                                  |
| 30                          | 161(1) | ABE93893       | 55  | 6e-30  | <i>Medicago truncatula</i>                 | Heavy metal transport/detoxification protein                          |
| 74                          | 167(1) | AAP44102       | 87  | 1e-136 | <i>Vicia faba</i>                          | Peptide transporter 1   |
| 133                         | 58(2)  | ABD32693       | 68  | 2e-76  | <i>Medicago truncatula</i>                 | Sugar transporter (O-methyltransferase, family 2; Dimerisation)       |
| <b>Metabolismo primario</b> |        |                |     |        |  |   |
| 7                           | 12(1)  | D10414.1       | 100 | 9e-07  | <i>Oryza sativa</i>                        | Succinate dehydrogenase (K7 gene)                                     |
| 12                          | 21(10) | Z21493.2       | 75  | 1e-93  | <i>Solanum tuberosum</i>                   | Formate dehydrogenase   |
| 12                          | 35(2)  | FM865900.1     | 89  | 3e-69  | <i>Lotus japonicus</i>                     | Formate dehydrogenase ( <i>fdh</i> gene)                              |
| 29                          | 65(1)  | CAA06028       | 70  | 7e-45  | <i>Glycine max</i>                         | 2'-hydroxydihydrodiazin reductase                                     |
| 32                          | 69(1)  | ABG21900       | 86  | 3e-52  | <i>Oryza sativa</i>                        | 2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit, mitochondrial precursor |
| 34                          | 74(1)  | CAA56354       | 99  | 9e-127 | <i>Phaseolus vulgaris</i>                  | NADP dependent malic enzyme   |
| 36                          | 79(1)  | ABO79640       | 63  | 2e-54  | <i>Medicago truncatula</i>                 | AAA ATPase, central region  |



|                           |        |             |     |        |                              |  |
|---------------------------|--------|-------------|-----|--------|------------------------------|--|
| 83                        | 80(1)  | ABO93608    | 68  | 5e-58  | <i>Leymus chinensis</i>      | Cytosolic aldehyde dehydrogenase                 |
| 34                        | 83(1)  | CAA56354    | 86  | 9e-45  | <i>Phaseolus vulgaris</i>    | NADP dependent malic enzyme                      |
| 43                        | 90(1)  | O22552      | 100 | 2e-25  | <i>Glycine max</i>           | Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit |
| 28                        | 112(1) | ABE77454    | 81  | 1e-13  | <i>Medicago truncatula</i>   | Phenazine biosynthesis PhzC/PhzF protein         |
| 60                        | 117(1) | NP_179692   | 35  | 2e-30  | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | pEARL14 Phospholipase-like                       |
| 62                        | 119(1) | AY428532.1  | 75  | 6e-35  | <i>Citrus junos</i>          | Mitochondrial citrate synthase precursor         |
| 62                        | 123(1) | AY428532.1  | 81  | 2e-94  | <i>Citrus junos</i>          | Mitochondrial citrate synthase precursor         |
| 36                        | 124(1) | ABO79640    | 33  | 2e-54  | <i>Medicago truncatula</i>   | AAA ATPase, central region                       |
| 69                        | 139(1) | X60691.1    | 82  | 2e-58  | <i>Lupinus angustifolius</i> | Gene for developing seed L-asparaginase          |
| 29                        | 144(1) | CAA06028    | 91  | 1e-94  | <i>Glycine max</i>           | 2'-hydroxydihydrodiazinone reductase             |
| 32                        | 156(1) | NM_203027.2 | 86  | 3e-52  | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | 2-oxoisovalerate dehydrogenase                   |
| 12                        | 164(1) | FM865900.1  | 87  | 8e-90  | <i>Lotus japonicus</i>       | Formate dehydrogenase (fdh gene)                 |
| 34                        | 88(1)  | CAA56354    | 99  | 1e-126 | <i>Phaseolus vulgaris</i>    | NADP dependent malic enzyme                      |
| 136                       | 56(2)  | NM_106601.3 | 84  | 3e-45  | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | GAPCP-1; glyceraldehyde-3-phosphate              |
| 26                        | 62(2)  | EU165371.1  | 85  | 4e-145 | <i>Glycine max</i>           | Alanine aminotransferase 1 (AlaAT1)              |
| <b>Respuesta a estrés</b> |        |             |     |        |                              |  |
| 8                         | 13(1)  | AAG34812    | 91  | 2e-27  | <i>Glycine max</i>           | Glutathione S-transferase GST 22                 |
| 10                        | 17(16) | X06411.1    | 93  | 0      | <i>Phaseolus vulgaris</i>    | Chalcone synthase                                |
| 16                        | 34(2)  | X16470.1    | 93  | 0      | <i>Phaseolus vulgaris</i>    | Chalcone isomerase                               |
| 8                         | 50(1)  | AAC18566    | 80  | 1e-23  | <i>Glycine max</i>           | 2,4-D inducible glutathione S-transferase        |
| 22                        | 52(1)  | AAF98157    | 65  | 8e-124 | <i>Phaseolus vulgaris</i>    | Homoglutathione synthetase                       |
| 31                        | 68(1)  | BAA12161    | 90  | 2e-112 | <i>Vigna unguiculata</i>     | CPRD14 protein                                   |
| 33                        | 70(1)  | AB056448    | 74  | 1e-24  | <i>Vigna unguiculata</i>     | CPRD2  |
| 39                        | 84(1)  | AJ784963.1  | 81  | 1e-109 | <i>Pisum sativum</i>         | Alpha-dioxygenase (alphaDOX1 gene)               |
| 40                        | 85(1)  | AAD37428    | 98  | 2e-46  | <i>Phaseolus vulgaris</i>    | Peroxidase 3 precursor                           |
| 10                        | 92(1)  | X06411.1    | 89  | 8e-51  | <i>Phaseolus vulgaris</i>    | Chalcone synthase                                |
| 48                        | 97(1)  | NP_566938   | 39  | 8e-18  | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | UDP-glucosyl transferase 72E1                    |
| 53                        | 104(1) | D83970.1    | 88  | 4e-75  | <i>Vigna unguiculata</i>     | CPRD8 protein                                    |
| 8                         | 109(1) | AF048978.1  | 77  | 1e-69  | <i>Glycine max</i>           | 2,4-D inducible glutathione S-transferase        |
| 22                        | 114(1) | AF258320.1  | 93  | 0      | <i>Phaseolus vulgaris</i>    | Homoglutathione synthetase                       |
| 65                        | 129(1) | ABV89651    | 85  | 1e-14  | <i>Brassica rapa</i>         | ERD15 protein                                    |
| 27                        | 130(1) | BAA22812    | 81  | 4e-74  | <i>Glycine max</i>           | 6-phosphogluconate dehydrogenase                 |
| 38                        | 147(1) | S46988      | 89  | 0      | <i>Glycine max</i>           | Phenylalanine ammonia-lyase                      |
| 40                        | 152(1) | AF149278.1  | 96  | 8e-128 | <i>Phaseolus vulgaris</i>    | Peroxidase 3 precursor (FBP3)                    |
| 40                        | 158(1) | AF149278.1  | 99  | 1e-150 | <i>Phaseolus vulgaris</i>    | Peroxidase 3 precursor (FBP3)                    |
| 10                        | 44(1)  | X06411.1    | 79  | 9e-129 | <i>Phaseolus vulgaris</i>    | Chalcone synthase                                |
| 10                        | 45(1)  | X06411.1    | 94  | 1e-155 | <i>Phaseolus vulgaris</i>    | Chalcone synthase                                |
| 31                        | 163(1) | D83971.1    | 90  | 0      | <i>Vigna unguiculata</i>     | CPRD14 protein                                   |

|   |        |              |     |        |                                      |   |
|---|--------|--------------|-----|--------|--------------------------------------|---|
| 76                                      | 173(1) | NP_191819    | 85  | 3e-27  | <i>Arabidopsis thaliana</i>          | DNAJ heat shock family protein                                |
| 10                                      | 178(1) | Q9ZRR8       | 35  | 1e-10  | <i>Casuarina glauca</i>              | Chalcone synthase   |
| 132                                     | 59(2)  | AB104740     | 70  | 9e-136 | <i>Pisum sativum</i>                 | OPR5 (12-oxophytodienoic acid 10, 11-reductase)               |
| 40                                      | 55(1)  | AF149278.1   | 98  | 0      | <i>Phaseolus vulgaris</i>            | Peroxidase 3 precursor (FBP3)                                 |
| <b>Síntesis de proteínas</b>            |        |              |     |        |                                      |   |
| 9                                       | 15(1)  | AF479234     | 98  | 4e-90  | <i>Thymelaea hirsuta</i>             | 26S ribosomal RNA gene  |
| 20                                      | 89(1)  | CAA63107     | 94  | 1e-24  | <i>Spinacia oleracea</i>             | Ribosomal protein L23   |
| 56                                      | 107(1) | AY341871.1   | 90  | 7e-105 | <i>Glycine max</i>                   | 40S ribosomal protein S25                                     |
| 63                                      | 121(1) | AAM62795     | 100 | 5e-22  | <i>Arabidopsis thaliana</i>          | 60S ribosomal protein L27A                                    |
| 23                                      | 133(1) | ABA98703     | 78  | 8e-27  | <i>Oryza sativa</i>                  | 40S ribosomal protein S29                                     |
| 67                                      | 134(1) | ACF06437     | 82  | 3e-18  | <i>Elaeis guineensis</i>             | Ribosomal L28-like protein                                    |
| 25                                      | 142(1) | Q9M5L0       | 83  | 9e-22  | <i>Euphorbia esula</i>               | 60S ribosomal protein L35                                     |
| 20                                      | 159(1) | CAA63107     | 94  | 1e-24  | <i>Spinacia oleracea</i>             | Ribosomal protein L23   |
| <b>Componente celular</b>               |        |              |     |        |                                      |   |
| 14                                      | 25(1)  | AM158278.1   | 81  | 5e-104 | <i>Phaseolus vulgaris</i>            | Proline-rich protein (prp3)                                   |
| 19                                      | 39(1)  | ACD37723     | 98  | 8e-83  | <i>Cicer arietinum</i>               | Actin   |
| 84                                      | 61(2)  | AAP34362     | 62  | 2e-10  | <i>Gossypium barbadense</i>          | Fiber protein Fb15  |
| 85                                      | 72(1)  | NP_564367    | 58  | 8e-09  | <i>Arabidopsis thaliana</i>          | Integral membrane HRF1 family protein                         |
| 52                                      | 103(1) | X99348.1     | 87  | 1e-54  | <i>Vigna radiata</i>                 | Pectinacetyltransferase                                       |
| 73                                      | 165(1) | XM_001189899 | 93  | 5e-29  | <i>Strongylocentrotus purpuratus</i> | Similar to tubulin alpha                                      |
| 77                                      | 174(1) | NP_565505    | 70  | 3e-25  | <i>Arabidopsis thaliana</i>          | GC1 (Giant Chloroplast 1)                                     |
| <b>Transducción de señales</b>          |        |              |     |        |                                      |   |
| 66                                      | 132(1) | AAF91337     | 92  | 9e-165 | <i>Glycine max</i>                   | Pti1 kinase-like protein                                      |
| 35                                      | 149(1) | L19359       | 98  | 0      | <i>Glycine max</i>                   | Calmodulin (SCaM-5)   |
| 24                                      | 32(1)  | AAD21872     | 84  | 7e-31  | <i>Phaseolus vulgaris</i>            | Receptor-like protein kinase homolog RK20-1                   |
| <b>Degradación de proteínas</b>         |        |              |     |        |                                      |   |
| 86                                      | 73(1)  | ABH03545     | 60  | 2e-15  | <i>Arabidopsis thaliana</i>          | Putative ubiquitin-interacting factor 4                       |
| 58                                      | 111(1) | NM_114443.2  | 74  | 8e-40  | <i>Arabidopsis thaliana</i>          | Hydrolase family protein /HAD-superfamily protein (AT3G45740) |
| 75                                      | 169(1) | NP_565836    | 81  | 1e-30  | <i>Arabidopsis thaliana</i>          | Ubiquitin extension protein 2 (UBQ2)                          |
| <b>Factores de transcripción</b>        |        |              |     |        |                                      |   |
| 49                                      | 98(1)  | XP_002284216 | 86  | 1e-26  | <i>Arabidopsis thaliana</i>          | AT-HSFB3 heat shock transcription factor                      |
| 68                                      | 135(1) | XM_002300744 | 74  | 2e-23  | <i>Populus trichocarpa</i>           | AP2/ERF domain-containing transcription factor (ERF17)        |
| <b>Proteínas de función desconocida</b> |        |              |     |        |                                      |   |
| 113                                     | 19(2)  | AK245355.1   | 79  | 0      | <i>Glycine max</i>                   | cDNA, clone: GMFL01-28-A16                                    |
| 114                                     | 20(1)  | AK243736.1   | 78  | 2e-46  | <i>Glycine max</i>                   | cDNA, clone: GMFL01-01-B21                                    |
| 115                                     | 26(1)  | CAO39211     | 74  | 4e-71  | <i>Vitis vinifera</i>                | Unnamed protein product                                       |
| 118                                     | 42(1)  | AK244466.1   | 69  | 1e-11  | <i>Glycine max</i>                   | cDNA, clone: GMFL01-03-O04                                    |
| 120                                     | 53(1)  | ABE84262     | 69  | 8e-39  | <i>Medicago truncatula</i>           | Conserved hypothetical protein                                |
| 122                                     | 100(1) | AP010392.1   | 67  | 2e-06  | <i>Lotus japonicus</i>               | Clone: LJT45B04   |
| 123                                     | 113(1) | AC187294.1   | 85  | 3e-175 | <i>Glycine max</i>                   | Clone gmw1-105h23   |
| 124                                     | 120(1) | EF146029.1   | 87  | 3e-44  | <i>Populus trichocarpa</i>           | Clone WS0115_A15  |
| 125                                     | 127(1) | NM_102223.4  | 78  | 4e-84  | <i>Arabidopsis thaliana</i>          | DNA-binding protein-related (AT1G23750)                       |



|   |        |          |    |       |                            |  |
|---|--------|----------|----|-------|----------------------------|--|
| 127                                       | 145(1) | AC150843 | 84 | 2e-19 | <i>Medicago truncatula</i> | Clone mth2-103p8                             |
| 128                                       | 155(1) | AC185958 | 84 | 3e-24 | <i>Glycine tomentella</i>  | Clone gtd1-181e18                            |
| 130                                       | 170(1) | CAN83158 | 75 | 2e-55 | <i>Vitis vinifera</i>      | Hypothetical protein                         |
| 131                                       | 172(1) | CAA75589 | 64 | 2e-92 | <i>Medicago truncatula</i> | MtN19  |
| 42  | 82(1)  | AC140026 | 71 | 4e-20 | <i>Medicago truncatula</i> | Clone mth2-36j24                             |
| <b>Secuencias sin identidad-(No hits)</b> |        |          |    |       |                            |  |
| 87  | 8(1)   |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 88  | 11(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 89  | 14(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 90  | 28(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 91  | 29(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 92  | 31(2)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 93  | 37(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 94  | 40(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 95  | 48(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 96  | 54(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 97  | 57(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 98  | 64(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 99  | 71(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 100                                       | 76(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 101                                       | 77(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 102                                       | 110(1) |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 103                                       | 122(1) |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 104                                       | 131(1) |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 105                                       | 136(1) |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 106                                       | 137(1) |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 107                                       | 143(1) |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 108                                       | 150(1) |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 109                                       | 157(1) |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 110                                       | 171(1) |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 111                                       | 175(1) |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 112                                       | 176(1) |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 116                                       | 30(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 117                                       | 41(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 119                                       | 46(1)  |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |
| 126                                       | 141(1) |          |    |       |                            | No se encontraron similitudes significativas |



|     |        |  |  |  |  |  |
|-----|--------|--|--|--|--|--|
| 129 | 166(1) |  |  |  |  | No se encontraron similitudes significativas |
| 134 | 75(1)  |  |  |  |  | No se encontraron similitudes significativas |

**BIBLIOGRAFÍA:**

- Agrawal, G. K., Rakwal, R., Jwa, N-S. (2000). Rice (*Oryza sativa* L.) *OsPR1b* gene is phytohormonally regulated in close interaction with light signals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278:290-98.
- Asai, T., Stone, J. M., Heard, J. E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J. y Ausubel, F., M. (2000). Fumonisin B1-induced cell death in Arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell*, 12:1823-1835.
- Beckers, G. J. M. y Spoel, S. H. (2006). Fine-tuning plant defense signaling: Salicylate versus Jasmonate. *Plant Biology*, 8:1-10.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A. y Solano, R. (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant Journal*, 29:23-32.
- Borrás-Hidalgo, O., Thomma, B. P. H., Collazo, C., Chacón, O., Borroto, C., Ayra, C., Portieles, R., López, Y. y Pujol, M. (2006). EIL2 transcription factor and glutathione synthetase are required for defense of tobacco against tobacco blue mold. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4:399-406.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. y Vanderleyden, J. (2003). Bean (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil*, 252:55-128.

- Cao, Y. F., Wu, Y. F., Zhang, Z. y Song, F. M. (2006). Overexpression of the rice EREBP-like gene OsBIERF3 enhances disease resistance and salt tolerance in transgenic tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67:202-211.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical. (1987). Standard system for the evaluation of bean germplasm. Van Schoonoven, A. y Pastor-Corrales, M. A. (compilers). Cali, Colombia. p 54.
- Chen, K., Du, L. y Chen, Z. (2003). Sensitization of defense response and activation of programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinase in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 53:61-74.
- Chen, K., Fan, B., Du, L. y Chen, Z. (2004). Activation of hypersensitive cell death by pathogen-induced receptor-like protein kinases from *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 56:271-283.
- Chen, Z. (2001). A superfamily of proteins with novel cysteine-rich repeats. *Plant Physiology*, 126:473-476.
- Clark, S. E., Williams, R.W. y Meyerowitz, E. M. (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*, 89:575-585.
- Clough, S. J. y Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16:735-743.

- Czernic, P., Visser, B., Sun, W., Savoure, A., Deslandes, L., Marco, Y., Van Montagu, M. y Verbruggen, N. (1999). Characterization of an *Arabidopsis thaliana* receptor-like protein kinase gene activated by oxidative stress and pathogen attack. *Plant Journal*, 18: 321-327.
- Dangl, J. L. y Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411:826-833.
- De Lorenzo, G., D'Ovidio, R. y Cervone, F. (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPS) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 39:313-3135.
- Degenhardt, J., Al-Masri, A. N., Kürkcüoglu, S., Szankowski, I. y Gau, A. (2005). Characterization by suppression subtractive hybridization of transcript that is differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. *Molecular Genetics and Genomics*, 273:326-335.
- Desender, S., Andrivon, D. y Val, F. (2007). Activation of defense reactions in Solanaceae: where is the specificity?. *Cellular microbiology*, 9:21-30.
- Devoto, A., Clark, A. J., Nuss, L., Cervone, F. y De Lorenzo, G. (1997). Developmental and pathogen-induced accumulation of transcripts of polygalacturonase-inhibiting protein in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 202:284-92.

- Dong, J., Chen, C. y Chen, Z. (2003). Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology*, 51:21-37.
- Du, L. y Chen, Z. (2000). Identification of genes encoding receptor like-kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid induced WRKY DNA-binding proteins in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 24:837-847.
- Duff, S. M. G., Sarath, G. y Plaxton, W. C. (1994). The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum*, 90:791-800.
- Durrant, W. E. y Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42:185-209.
- Durango, D., Quiñones, W., Torres, F., Rosero, Y., Gil, J. y Echeverri, F. (2002). Phytoalexin accumulation in colombian bean varieties and aminosugars as elicitors. *Molecules*, 7:817-832.
- Edwards, K., Johnstone, C. y Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19:1349.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kaló, P. y Kiss, G. B. (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*, 417:962-966.

- Estrada-Navarrete, G., Alvarado-Affantranger, G., Olivares, J. E., Díaz-Camino, C., Santana, O., Murillo, E., Guillén, G., Sánchez-Guevara, N., Acosta, J., Quinto, C., Li, D., Gresshoff, P. M. y Sánchez F. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* transformation of the Phaseolus spp.: A tool for functional genomics. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 19:1385-1393.
- Flor, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. (1971). *Annual Review of Phytopathology*, 9:275-296.
- Frendo, P., Harrison, J., Norman, C., Hernández-Jiménez, M. J., Van de Sype, G., Gilabert, A. y Puppo, A. (2005). Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 18:254-259.
- Gachomo, E. W., Shonukan, O. O. y Kotchoni, S. O. (2003). The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. *African Journal of Biotechnology*, 2:26-32.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. y Ryals, J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261:754-56.
- Gomez-Gomez, L. y Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell*, 5:1003-1011.

- González, G. V., Portal, O. M. y Rubio, S. V. (2006). Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. Spanish Journal of Agricultural Research, 4:55-79.
- Greenberg, J. T. (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48:525-545.
- Gvozdeva, E. L., Volotskaya, A. V., Sofin, A. V., Kudryavtseva, N. N., Revina, T. A. y Valueva, T. A. (2006). Interaction of proteinases secreted by the fungal plant pathogen *Rhizoctonia solani* with natural proteinase inhibitors produced by plants. Applied Biochemistry and Microbiology, 42:502-507.
- Hamberg, M., Sanz, A., Rodríguez, M. J., Calvo, A. P., Castresana, C. (2003). Activation of the fatty acid alpha-dioxygenase pathway during bacterial infection of tobacco leaves: formation of oxylipins protecting against cell death. The Journal of Biological Chemistry, 278:51796-51805.
- Hamberg, M., Ponce de León, I., Rodríguez, M. J. y Castresana, C. (2005).  $\alpha$ -Dioxygenases. Biochemical and Biophysical Research Communications, 338:169-174.
- Hammond-Kosack, K. E. y Parker, J. E. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. Current Opinion in Biotechnology, 14:177-193.

- Hardie, D. G. (1999). Plant protein serine/threonine kinases: Classification and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50:97-131.
- Heath, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, 44:321-334.
- Herve, C., Serres, J., Dabos, P., Canut, H., Barre, A., Rouge, P. y Lescure, B. (1999). Characterization of the Arabidopsis lecRK-a genes: members of a superfamily encoding putative receptors with an extracellular domain homologous to legume lectins. *Plant Molecular Biology*, 39:671-682.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. y Korenaga, T. (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucleic Acids Research*, 27:297-300.
- Hoegen, E., Strömberg, A., Pihlgren, U. y Kombrink, E. (2002). Primary structure and tissue-specific expression of the pathogenesis-related protein PR-1b in potato. *Molecular Plant Pathology*, 3:329-45.
- Holt III, B. F., Mackey, D. y Dangl, J. L. (2000). Recognition of pathogens by plants. *Current biology*, 10:R5-R7.
- Hosp, J., Tashpulatov, A., Roessner, U., Barsova, E., Katholnigg, H., Steinborn, R., Melikant, B., Lukyanov, S., Herbele-Bors, E. y Touraev, A. (2007). Transcriptional and metabolic profiles of stress-induced, embryogenic tobacco microspores. *Plant Molecular Biology*, 63:137-149.

- Hückelhoven, H. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*, 45:101-127.
- Jakobek, J. L. y Lindgren, P. B. (2002). Expression of a bean acid phosphatase cDNA is correlated with disease resistance. *Journal of Experimental Botany*, 53:387-389.
- Jones, J. D. G. y Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444:323-329.
- Kariola, T., Brader, G., Helenius, E., Li, J., Heino, P. y Palva, E. (2006). EARLY RESPONSIVE TO DEHYDRATION 15, a negative regulator of Abscisic Acid responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 142:1559-1573.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. y Fritig, B. (1987) Biological functions of pathogenesis-related proteins. Four PR proteins have  $\beta$ -1,3-glucanase activity, *EMBO Journal*, 6:3209-3212.
- Kobe, B. y Deisenhofer, J. (1994). The leucine-rich repeat: A versatile binding motif. *Trends in Biochemical Sciences*, 19:415-421.
- Lange, J., Xie, Z-P., Broughton, W. J., Vögeli-Lange, R. y Boller, T. (1999). A gene encoding a receptor-like protein kinase in the roots of common bean is differentially regulated in response to pathogens, symbionts and nodulation factors. *Plant Science*, 142:133-145.

- Li, J. y Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, 90:929-938.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T. y Geurts, R. (2003). LysM domain receptor kinases regulating Rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, 302:630-633.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J. J. y Solano, R. (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, 15:165-178.
- Luhová, L., Lebeda, A., Kutrová, E., Hedererová, D. y Pec, P. (2006). Peroxidase, catalase, amine oxidase and acid phosphatase activities in *Pisum sativum* during infection with *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. *Biologia Plantarum*, 50:675-682.
- Low, P. S. y Merida, J. R. (1996). The oxidative burst in plant defence: Function and signal transduction. *Physiologia Plantarum*, 96:532-542.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowsky, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N. y Stougaard, J. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 425:637-640.
- Mahe, S., Gausseres, N. y Tome, D. (1994). Legume proteins for human requirements. *Grain Legumes (AEP)*, 7:15-17.

- Marra, R., Ambrosino, P., Carbone, V., Vinale, F., Woo, S. L., Ruocco, M., Ciliento, R., Lanzuise, S., Ferraioli, S., Soriente, I., Gigante, S., Turrà, D., Fogliano, V., Scala, F. y Lorito, M. (2006). Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach. *Current Genetics*, 50:307-321.
- Montesinos, E. (2000). Pathogenic plant-microbe interactions. What we know and how we benefit. *Internatl. Microbiol.*, 3:69-70.
- Navarrete-Maya, R., Navarrete-Maya, J., Trejo-Albarrán, E., Prudencio-Sains, J. M. y Acosta-Gallegos, J. A. (2000). Identification of root rots resistant bean genotypes from a core collection grown in central México. *Bean Improvement Cooperative Annual Report*, 43:172-173.
- Nuss, L., Mah´e, A., Clark, A. J., Grisvard, J., Dron, M., Cervone, F. y De Lorenzo, G. (1996). Differential accumulation of polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) mRNA in two near-isogenic lines of *Phaseolus vulgaris* L. upon infection with *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Molecular Plant Pathology*, 48:83-89.
- Ogoshi, A., Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S. y Dijst, G. (1996). The genus *Rhizoctonia* in *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer, Dordrecht. pp 1-10.
- Ohtake, Y., Takahashi, T. y Komeda, Y. (2000). Salicylic acid induces the expression of a number of receptor-like kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 41:1038-1044.

- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2007). Base de datos para la agricultura. Disponible en <http://www.fao.org/waicent/agricult>
- Park, P. e Ikeda, K. (2008). Ultrastructural analysis of responses of host and fungal cells during plant infection. *Journal of General Plant Pathology*, 74:2-14.
- Park, S. y Tu, J. (1994). Genetic segregation of root rot resistance in dry bean crosses. *Bean Improvement Cooperative. Annual Report (USA)*, 37:229-230.
- Pierre, R. E. y Bateman, D. F. (1967). Induction and distribution of phytoalexins in *Rhizoctonia*-infected bean hypocotyls. *Phytopathology*. 57:1154-1160.
- Ponce de Leon, I., Sanz, A., Hamberg, M., Castresana, C. (2002). Involvement of the *Arabidopsis*  $\alpha$ -DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *The Plant Journal*, 29: 61-72.
- Poromarto, S. H., Nelson, B. D. y Freeman, T. P. (1998). Association of binucleate *Rhizoctonia* with soybean and mechanism of biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 88:1056-1067.
- Potter, S., Uknes, S., Lawton, K., Winter, A. N., Chandler, D., DiMaio, J., Novitzky, R., Ward, E. y Ryals, J. (1993). Regulation of a hevein-like gene in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 6:680-685.

- Rauscher M., Adam A. L., Wirtz S., Guggenheim R., Mendgen K. y Deising H. B. (1999). PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant Journal*, 19:625-633.
- Ramirez, M., Graham, M. A., Blanco-López, L., Silvente, S., Medrano-Soto, A., Blair, M., Hernandez, G., Vance, C. P. y Lara, M. (2005). Sequencing and analysis of common bean ESTs. Building a foundation for functional genomics. *Plant Physiology*, 137:1211-1227.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. y Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8:1809-1819.
- Sanchez, L., Weidmann, S., Arnould, C., Bernard, A. R., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. (2005). *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* trigger DMI3-dependent activation of genes related to a signal transduction pathway in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 139:1065-1077.
- Scheel, D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, 1:305-310.
- Shiu, S. H., Karlowski, W. M., Pan, R., Tzeng, Y. H., Mayer, K. F. y Li, W. H. (2004). Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell*, 16:1220-1234.

- Shiu, S. H. y Bleecker, A. B. (2001). Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:10763-10768.
- Shiu, S. H. y Bleecker, A. B. (2001). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Science Signaling*, 113:1-13.
- Singh, K., Foley, R. C. y Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defence and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 5:430-436.
- Singh, S. P. (2001). Broadening the genetic base of common bean cultivars: A review. *Crop Science*, 41:1659-1675.
- Smeets, K., Cuypers, A., Lambrechts, A., Semane, B., Hoet, P., van Laere, A. y Vangronsveld, J. (2005). Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43:437-444.
- Song, W. Y., Wang, G. L., Chen, L. L., Kim, H. S., Pi, L. Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W. X., Zhu, L. H., Fauquet, C. y Ronald, P. (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*, 270:1804-1806.
- Stockwell, V. y Hanchey, P. (1982). Cytohistochemical techniques for calcium localization and their application to diseased plants. *Plant Physiology*, 70:244-251.

- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K. y Parniske, M. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature*, 417:959-962.
- Tichtinsky, G., Vanoosthuysse, V., Cock, J. M. y Gaude, T. (2003). Making inroads into plant receptor kinase signalling pathways. *Trends in Plant Science*, 8:231-237.
- Torii, K. U. (2000). Receptor kinase activation and signal transduction in plants: and emerging picture. *Current Opinion in Plant Biology*, 3:361-367.
- Van Loon, L. C. y Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55:85-97.
- Van Loon, L. C., Rep, M. y Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44:135-162.
- Van Etten, H. D., Maxwell, D. P. y Bateman, D. F. (1967). Lesion maturation, fungal development and distribution of endopolygalacturonase and cellulase in *Rhizoctonia*-infected bean hypocotyls tissues. *Phytopathology*, 57:121-126.

- Verhagen, B. W., van Loon, L. C. y Pieterse, C. M. (2006). Induced disease resistance signaling in plants. Global Science Books. Floriculture ornamental and plant biotechnology, 3:334-343.
- Wagih, E. E. (1993). Stress Proteins and Isozymology of Acid Phosphatase, Esterase, and Peroxidase in *Phaseolus vulgaris* Following Peanut Mottle Virus Infection. Journal of Phytopathology, 139:157-164.
- Walter, M. H., Liu, J. W., Wunn, J. y Hess, D. (1996). Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (*Ypr1 0*) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression. European Journal of Biochemistry, 239:281-293.
- Wang, X., Zafian, P., Choudhary, M. y Lawton, M. (1996). The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences, 93:2598-2602.
- Xiong, L., Lee, M. W., Qi, M. y Yang, Y. (2001). Identification of defense-related rice genes by Suppression Subtractive Hybridation and differential Screening. The American Phytopathological Society, 14:685-692.
- Yoshida, K., Kaothien, P., Matsui, T., Kawaoka, A. y Shinmyo, A. (2003). Molecular biology and application of plant peroxidase genes. Applied Microbiology and Biotechnology, 60:665-670.

Zhang, H. B., Zhang, D. B., Chan, J., Yang, Y. H., Huang, Z. J., Huang, D. F., Wang, C. y Huang, R. F. (2004). Tomato stress responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Molecular Biology*, 55:825-834.

Zhou, J., Tang, X., Fredering, R. y Martin, G. (1998). Pathogen recognition and signal transduction by the Pto kinase. *Journal of the Plant Research*, 111:353-356.