



IPICYT

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis de la expresión génica durante la
interacción de jitomate y especies silvestres con
Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis*.**

Tesis que presenta

José Pablo Lara Ávila

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Dra. June Simpson Williamson

San Luis Potosí, S.L.P., 17 de Noviembre de 2011

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Análisis de la expresión génica durante la interacción de jitomate y especies silvestres con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis***” presentada para obtener el Grado de de Doctor en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **José Pablo Lara Ávila** y aprobada el **11 de noviembre de 2011** 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. Ángel Gabriel Alpuche Solís
(Codirector de la tesis)

Dra. June Simpson Williamson
(Codirector de la tesis)

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
(Asesor de la Tesis)

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
(Asesor de la Tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís y Dra. June Simpson Williamson, y recibió el apoyo de Fondos Mixtos-SLP (FMSLP-2008-C01-86875) y de la Fundación Produce SLP.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 060187).



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 039 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular en la opción de Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 17 días del mes de noviembre del año 2011, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|------------------------------------------------|------------------------|------------------|
| Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga | Presidente | IPICYT |
| Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís | Secretario | IPICYT |
| Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont | Sinodal | IPICYT |
| Dra. June Kilpatrick Simpson Williamson | Sinodal externo | CINVESTAV |

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

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

José Pablo Lara Avila

sobre la Tesis intitulada:

Análisis de la expresión génica durante la interacción de jitomate y especies silvestres con Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Dra. June Kilpatrick Simpson Williamson (CINVESTAV)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 17 días del mes de noviembre de 2011.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

Quiero dedicar con todo mi corazón, este esfuerzo de varios años a

MI FAMILIA:

Mi esposa Claudia

Mi mamá Magdalena,

Mis hermanas: Magui, Coquis, Doris, Chelis

Mis sobrinos: Daniel, Emi, José María, Santi, Diego, Vale, Omarcito

Muy en especial

A mi papá

Ya que después de todo

Sin ellos no hubiera podido lograrlo hoy

Agradecimientos

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por darme la oportunidad de trabajar bajo su asesoría para conseguir esta meta en mi vida.

A la Dra. June Simpson por su gentileza al recibirme en su laboratorio en CINVESTAV campus Irapuato.

A los Dres. Gerardo Argüello Astorga y Francisco Jiménez Bremont por sus atinadas sugerencias y consejos.

A los miembros del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas (IPICyT): Rosy Castillo, Salvador, Bernardo, Elvira, Lucy, Benita, Mariana, Yair, Lula, Mayra... y los demás que andan por ahí: Ruth, Sergio, Silvia, Miguel(es), Edith, Isabel... por los buenos momentos y también por los difíciles que nos tocó pasar....

Contenido

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Constancia de aprobación..... | i |
| Créditos institucionales..... | ii |
| Acta de examen..... | iii |
| Dedicatorias..... | iv |
| Agradecimientos..... | v |
| Lista de tablas..... | viii |
| Lista de tablas suplementarias..... | ix |
| Lista de figuras..... | x |
| Abreviaturas..... | xi |
| Glosario..... | xii |
| RESUMEN..... | xiii |
| ABSTRACT..... | xiv |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (<i>Cmm</i>)..... | 1 |
| 1.2 Fuentes de resistencia a <i>Cmm</i> | 3 |
| 1.3. Interacción planta-patógeno..... | 3 |
| 1.4. Resistencia anti-hospedero (non-host resistance)..... | 5 |
| 1.5. Resistencia basal inducida..... | 6 |
| 1.6. Resistencia mediada por genes de resistencia (genes R)..... | 7 |
| 1.7. Interconexión de señales: “crosstalking”..... | 10 |
| 1.8. Técnicas para analizar la expresión génica..... | 11 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 15 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 16 |
| 4. OBJETIVO..... | 16 |
| 4.1 Objetivos específicos..... | 16 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 17 |
| 5.1. Materiales biológicos y protocolo de infección..... | 17 |
| 5.2. Extracción de ARN y síntesis de cDNA doble cadena..... | 17 |
| 5.3. cDNA-AFLP..... | 18 |
| 5.4 Aislamiento de bandas diferenciales y secuenciación..... | 19 |
| 5.5 Confirmación de expresión génica diferencial por PCR en tiempo real (qRT-PCR)..... | 20 |
| 6. RESULTADOS..... | 21 |
| 6.1 Desarrollo de síntomas por la infección de <i>Cmm</i> en las diferentes especies de <i>Solanum</i> | 21 |
| 6.2 Identificación de fragmentos derivados de transcritos-diferencialmente expresados (DE-TDFs) mediante cDNA-AFLP en las especies de <i>Solanum</i> | 22 |
| 6.3 Clasificación funcional de genes diferencialmente expresados..... | 24 |
| 6.4 Análisis de agrupamiento jerárquico (hierarchical clustering)..... | 29 |
| 6.5 Validación de la expresión diferencial por PCR en tiempo real | |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| (qRT-PCR)..... | 31 |
| 7. DISCUSIÓN | 34 |
| 7.1 Aspectos generales de la interacción <i>Solanum-Cmm</i> | 34 |
| 7.2 Fotosíntesis..... | 35 |
| 7.3 Senescencia y etileno..... | 36 |
| 7.4 Genes diferenciales en <i>S. lycopersicum</i> | 36 |
| 7.5 Visualización gráfica de la expresión génica diferencial..... | 37 |
| 7.6 Análisis cuantitativo de genes candidatos..... | 38 |
| 8. CONCLUSIONES | 42 |
| 9. PERSPECTIVAS | 43 |
| 10. REFERENCIAS | 44 |
| 11. ANEXO I. Análisis bibliográfico | 58 |
| 11.1 Análisis bibliográfico de UniGenes diferencialmente expresados en <i>S. peruvianum</i> LA2157..... | 58 |
| 11.2 Análisis bibliográfico de UniGenes diferencialmente expresados en <i>S. peruvianum</i> LA2172..... | 62 |
| 11.3 Análisis bibliográfico de UniGenes diferencialmente expresados en <i>S. habrochaites</i> LA2128..... | 68 |
| 11.4 Análisis bibliográfico de UniGenes diferencialmente expresados en <i>S. lycopersicum</i> | 72 |
| 12. ANEXO II. Artículo publicado en línea en Plant Molecular Biology Reporter | 76 |
| 13. ANEXO III. Protocolos | 77 |
| 13.1 Síntesis de cDNA de doble cadena (ds cDNA)..... | 77 |
| 13.2 Protocolo de AFLP..... | 78 |
| 13.3 Electroforesis de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes..... | 80 |
| 13.4 Protocolo de tinción de plata..... | 82 |
| 13.5 Alineación de adaptadores..... | 82 |
| 13.6 Oligonucleótidos usados para qRT-PCR..... | 86 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Número y clase de secuencias encontradas en las especies de <i>Solanum</i> | 26 |
| Tabla 2. Lista de UniGenes diferencialmente expresados en <i>Solanum</i> spp. en etapas tempranas de la infección por <i>Cmm</i> | 26 |

LISTA DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla S1. Secuencia de oligonucleótidos +1 utilizados para cDNA-AFLP. | 79 |
| Tabla S2. Secuencia de oligonucleótidos +2 y +3 utilizados para cDNA-AFLP | 79 |
| Tabla S3. Tabla de adaptadores de AFLP..... | 83 |
| Tabla S4. Adaptador <i>MseI</i> | 84 |
| Tabla S5. Adaptador <i>EcoRI</i> | 84 |
| Tabla S6. Oligonucleótidos usados para qRT-PCR..... | 85 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Características de la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR)..... | 8 |
| Figura 2. Características estructurales de los dominios de los genes R..... | 8 |
| Figura 3. Modelos de interacción directa e indirecta entre las proteínas R con las proteínas Avr..... | 9 |
| Figura 4. Fundamento de la técnica de expresión diferencial cDNA-AFLP..... | 13 |
| Figura 5. Protocolo de infección de <i>Cmm</i> en plantas de <i>Solanum</i> de 40 días de edad..... | 22 |
| Figura 6. Sintomatología de las especies silvestres y la susceptible antes y 40 dpi..... | 22 |
| Figura 7. Controles de calidad para la técnica de cDNA-AFLP..... | 23 |
| Figura 8. Sección característica de un gel de cDNA-AFLP teñido con nitrato de plata. | 24 |
| Figura 9. Clasificación funcional de UniGenes encontrados en las diferentes especies de <i>Solanum</i> | 25 |
| Figura 10. Análisis de agrupamiento jerárquico (clustering hierarchical) de los patrones de expresión génica diferencial de especies resistentes y susceptibles de <i>Solanum</i> , ante el reto de <i>Cmm</i> | 31 |
| Figura 11. Validación por qRT-PCR de UniGenes seleccionados..... | 33 |

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--------------------------------------------------------------|
| Cmm | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> |
| DE-TDF | Differential Expressed-Transcrip Derived Fragment |
| cDNA-AFLP | Complementary DNA-Amplified Fragment Length Polimorphism |
| fs cDNA | First Strand cDNA |
| ds cDNA | Double Strand cDNA |
| QTL | Quantitative Trait Loci |
| SAR | Systemic Acquired Resistance |
| ISR | Induced Systemic Resistance |
| SA | Salycilic Acid |
| PRP | Protein Related Pathogenesis |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| NBS-LRR | Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Region |
| qRT-PCR | Quantitative Reverse Transcriptase-PCR |
| HR | Hypersensitive Response |

GLOSARIO

Interacción compatible. Es el caso de la interacción entre una planta susceptible y un patógeno virulento, la planta es infectada rápidamente con la subsecuente aparición de síntomas.

Interacción incompatible. Es la interacción entre un patógeno y una planta cuyas respuestas de defensa son eficientes para detener el avance del patógeno sin el desarrollo de síntomas.

Crosstalking. Son los puntos en común y las convergencias entre dos o más rutas de transducción de señales.

RESUMEN

Análisis de la expresión génica durante la interacción de jitomate y especies silvestres con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) es un fitopatógeno Gram-positivo causante de la enfermedad conocida como cáncer bacteriano del jitomate (*Solanum lycopersicum*), una enfermedad para la cual no existen tratamientos curativos o preventivos, lo que ha provocado pérdidas económicas importantes en México y en el mundo entero.

En este trabajo, se analizó la expresión génica de varias especies silvestres resistentes relacionadas al jitomate como *S. peruvianum* LA2157, *S. peruvianum* LA2172, y *S. habrochaites* LA2128, y una especie susceptible, con el fin de identificar genes involucrados en las respuestas de defensa y/o susceptibilidad. Mediante el estudio del transcriptoma con cDNA-AFLP (cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism), se logró la identificación de 403 transcritos diferencialmente expresados. Entre ellos, algunos genes mostraron un patrón de expresión opuesto entre las especies resistentes y la susceptible, dentro de los que se incluyen genes involucrados en la ruta de degradación de proteínas mediada por ubiquitina, y una peroxidasa secretoria. Estos genes mostraron una inducción en las especies resistentes, y fueron reprimidos en la especie susceptible, lo que sugiere una posible participación en las etapas tempranas de las respuestas de defensa posteriores a la infección por *Cmm*.

Los genes identificados en las especies silvestres son nuevos candidatos para análisis funcionales posteriores para determinar su contribución en las respuestas de defensa contra *Cmm*, y determinar las bases moleculares de incompatibilidad entre las especies silvestres resistentes y *Cmm*. Esto contribuirá en el desarrollo de mejores métodos de control del cáncer bacteriano del jitomate.

PALABRAS CLAVE: expresión génica, interacción compatible, interacción incompatible.

ABSTRACT

Gene expression analysis during Interaction of tomato and related wild species with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) is a Gram-positive bacterial pathogen causing bacterial wilt and canker of tomato (*Solanum lycopersicum*), an economically important disease producing economic losses worldwide.

In this study, gene expression analysis was conducted using several resistant tomato-related wild species, including *S. peruvianum* LA2157, *S. peruvianum* LA2172, and *S. habrochaites* LA2128, and a susceptible tomato species, to identify genes involved in the disease response. Using cDNA-amplified fragment length polymorphism (AFLP), 403 differentially expressed transcripts were identified. Among those, several genes showed contrasting expression patterns among resistant and susceptible species, including genes involved in the ubiquitin-mediated protein degradation pathway and secretory peroxidase. These genes were up-regulated in resistant species, but down-regulated in susceptible species, suggesting their likely involvement in early plant defense responses following *Cmm* infection.

These identified genes would serve as new candidate bacterial wilt disease resistance genes and should be subjected to further functional analyses to determine the molecular basis of incompatibility between wild species of tomato and *Cmm*. This would then contribute to the development of more effective and sustainable *Cmm*-control methods.

KEYWORDS: Compatible interaction, gene expression profiling, incompatible interaction

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*)

La infección por el patógeno Gram-positivo *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), causante de la enfermedad conocida como cáncer bacteriano en jitomate; ha provocado pérdidas millonarias en los estados de San Luis Potosí, Baja California, Estado de México, Michoacán, Guanajuato, Sinaloa, Morelos, Zacatecas; y tal es su importancia en el mundo que es una especie sujeta a regulaciones de cuarentena internacional por parte de la Unión Europea (Commission Directive 95/4/EC) y de Estados Unidos (NAPPO) (Jahr y col., 1999); en México es catalogada como plaga cuarentenaria grado A1 por la Hoja de Requisitos Fitosanitarios y Norma Oficial Mexicana 007 (NOM 007). La enfermedad es devastadora debido al movimiento sistémico de la bacteria en el tejido vascular, lo cual ha sido demostrado recientemente con la generación de una cepa bioluminiscente de *Cmm* (Xu y col., 2010). La infección de la planta ocurre a través de heridas, estomas o por el uso de semillas contaminadas. Los síntomas son marchitez unilateral de hojas, heridas en el fruto llamadas ojo de pájaro y el desarrollo de heridas en el tallo llamadas chancros (Carlton y col., 1998; Jahr y col., 1999; Balaji y col., 2008; Gartermann y col., 2008). *Cmm* es considerado como un organismo biotrófico pero puede sobrevivir por largos períodos de tiempo cuando se asocia a restos vegetales, lo cual constituye un foco de infección para el siguiente ciclo agrícola. *Cmm* puede ser transmitido por semillas contaminadas, que es la causa más común de los brotes de *Cmm* (Jahr y col., 1999; Gartermann y col., 2003).

El control químico de la enfermedad por medio de antibióticos, sales cuaternarias de amonio o compuestos de cobre no es efectivo y causa estragos en el medio ambiente. Alternativamente el uso de bacteriófagos o de las posibles endolisinas codificadas por genes de los bacteriófagos CMP1 y CN77 han sido propuestos como una estrategia de control, dichas proteínas mostraron una alta especificidad de control sobre *Cmm* sin efectos ambientales adversos, sin embargo este método de control biológico aun no ha sido implementado ampliamente en condiciones de campo (Wittmann y col., 2010). Una disminución en la incidencia de esta enfermedad, se ha logrado por medio

del uso de semillas certificadas, transplantes libres de *Cmm* y prácticas culturales, pero estas plantas pueden infectarse posteriormente en campo (Jahr y col., 1999).

Se sabe poco acerca de las estrategias de virulencia que utiliza *Cmm* durante la infección; se ha reportado que los exopolisacáridos (EPS) presentes en la pared celular, pudieran ser los responsables de los síntomas de marchitez de hojas, sin embargo no representan un factor de patogenicidad importante (Jahr y col., 1999; Gattermann y col., 2003). En la cepa NCPPB382 de *Cmm* se ha reportado la presencia de plásmidos denominados pCM1 (con un tamaño de 27 kb) y pCM2 (con un tamaño de 70 kb), y se ha identificado que los genes *celA*, presente en el plásmido pCM1 y que codifica para una β -1,4 endocelulasa (Jahr y col., 2000); y el gen *pat1* del plásmido pCM2 que codifica una posible serín proteasa (Dreier y col., 1997), son factores importantes de patogenicidad. Recientemente se identificaron los genes *chpC* y *tomA*, ambos ubicados en el cromosoma, que codifican para una posible serín proteasa con homología al factor de virulencia *pat-1*, y una endo-1,4- β -glicosidasa respectivamente; son factores de virulencia que pueden afectar la interacción de *Cmm* con la planta (Kaup y col., 2005; Stork y col., 2008).

El análisis del genoma de *Cmm*, reveló que una región de 129 kb ubicada entre los genes *chpC/tomA*, con un bajo contenido de G+C cercana al origen de replicación, es necesaria para la patogenicidad, ya que contiene genes involucrados en el metabolismo de azúcares y algunas serín proteasas que pueden interferir con la señalización de las respuestas de defensa y están involucradas en la colonización de la planta (Gattermann y col., 2008).

Recientemente, se ha demostrado que existe interdependencia entre los niveles de expresión de genes cromosomales que codifican serín-proteasas y enzimas que degradan pared celular, con los niveles de expresión de los genes plasmídicos *celA* y *pat1* en *Cmm*, durante las primeras horas de la infección del jitomate. Lo anterior sugiere la evolución de *Cmm* de un estado endofítico a uno patogénico, a través de la adquisición horizontal de factores de virulencia (Chalupowicz y col., 2010). Sin embargo, otros genes de *Cmm* necesarios para la infección, colonización y evasión/supresión de las respuestas de defensa de la planta se encuentran codificados en el cromosoma, ésto se muestra en la

cepa CM100, una cepa curada de plásmidos derivada de *Cmm* NCPBB382, que es capaz de colonizar plantas de tomate sin causar síntomas de marchitez (Meletzus y col., 1993).

1.2 Fuentes de resistencia a *Cmm*

A la fecha se cuentan con cultivares comerciales de jitomate resistentes a enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y nemátodos (Arie y col., 2007), pero no existen variedades resistentes a *Cmm*. Estas variedades comerciales resistentes han sido obtenidas por mejoramiento genético tradicional que involucra la cruce de especies silvestres de jitomate resistentes a diversos patógenos. La obtención de variedades resistentes a *Cmm* no ha sido exitoso debido a: (i) los entrecruzamientos del jitomate con las variedades silvestres resistentes han sido ineficientes (van Heusden y col., 1999) y (ii) *Cmm* ha mostrado una alta variabilidad genética, lo que implica que ciertas cepas puedan tener diferente grado de virulencia en cultivares diferentes (Kleitman y col., 2008).

Se han reportado fuentes potenciales de resistencia en *L. peruvianum* LA2157 (*S. peruvianum*) (Van-Heusden y col., 1999) y en *L. hirsutum* LA407 (*S. habrochaites*) (Francis y col., 2001), las cuales son especies silvestres relacionadas a jitomate, con 3 y 2 QTLs (Quantitative Trait Loci) respectivamente, asociados a los fenotipos de resistencia, sin embargo, no se han caracterizado los mecanismos moleculares tempranos involucrados en los eventos de resistencia. El análisis proteómico de *S. habrochaites* LA407 mostró que el estrés oxidativo tiene un papel en las respuestas de defensa contra *Cmm* (Coaker y col., 2004); sin embargo, una revisión de las respuestas de defensa en Solanaceae por Desender y col. (2007), enfatizó la importancia de comparar las respuestas de defensa inducidas por el mismo patógeno en una planta resistente y en una susceptible, los autores sugieren que tales respuestas pueden depender de la velocidad de reacción más que en cambios específicos de la transcripción y/o actividad enzimática.

1.3 Interacción planta-patógeno

Los conocimientos actuales durante la interacción de plantas con fitopatógenos bacterianos y los mecanismos de resistencia a enfermedades están basados principalmente en estudios en proteobacterias (*Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*), (Abramovitch y Martin, 2004; Abramovitch y col., 2006; Jones y Dangl, 2006; Mole y col., 2007), mientras que existe poca información acerca de los mecanismos moleculares durante la interacción de plantas con patógenos del grupo de actinobacterias (bacterias Gram positivas) (Hogenhout y Loria, 2008; Chalupowicz y col., 2010). Con la secuencia completa del genoma de *Cmm* y de otros fitopatógenos importantes, será posible realizar investigación con el fin de determinar los mecanismos de patogénesis de fitopatógenos Gram positivos y realizar comparaciones con otros microorganismos importantes (Setubal y col., 2005; Garterman y col., 2008).

Cuando una planta y un patógeno entran en contacto, ocurre una reprogramación de la actividad transcripcional ya que el patógeno se enfoca en la colonización de los tejidos y en la utilización de los recursos de la planta con fines de nutrición, mientras que la planta se adapta para la detección del patógeno y defenderse, lo que implica cambios en la expresión génica y cambios metabólicos (Wan y col., 2002). En el caso de una defensa eficiente, los síntomas en la planta son restringidos, el patógeno no se multiplica o propaga y no hay desarrollo de la enfermedad (interacción incompatible); cuando la defensa es ineficiente la planta es rápidamente infectada, aparecen síntomas y la planta muere (interacción compatible). Existe una continua co-evolución de rutas bioquímicas entre la planta y el patógeno, donde el patógeno trata de evadir los mecanismos de defensa de la planta y la planta genera compuestos que le permitan protegerse.

Con el fin de combatir tales infecciones, las plantas han desarrollado un sistema de defensa en cada célula y otro basado en señales sistémicas que emanan del sitio de infección (Jones y Dangl, 2006). Las plantas cuentan con tres niveles de defensa: la resistencia pasiva o basal proporcionada por barreras físicas y químicas, la resistencia inducida mediada por fitohormonas y la resistencia mediada por genes de resistencia (R).

Planta y patógeno son especies co-evolucionadas, esto significa que las barreras estándares de una planta pueden ser sobrepasadas por un patógeno en particular, pero pueden bloquear con éxito el avance de otros (Baker y col., 1997; Bishop y col., 2000; Wan y col., 2002). Relativamente pocos microorganismos pueden romper los mecanismos de defensa de las plantas, con consecuencias devastadoras en términos agronómicos y económicos, como es el caso de *Cmm* en jitomate, sin embargo aun se desconoce la razón por la cual un microorganismo puede ser altamente virulento en una especie y puede ser no patogénico en otra especie, incluso dentro del mismo género.

1.4 Resistencia anti-hospedero (non-host resistance).

La resistencia anti-hospedero (conocida como non host resistance), es un complejo sistema que consiste en una serie de barreras mecánicas y químicas; proporciona resistencia contra patógenos en general en la mayoría de las especies vegetales, es la forma más común y durable de los mecanismos de resistencia en plantas; sin embargo, es la menos comprendida.

La comprensión de la resistencia anti-hospedero es la clave para el desarrollo de nuevas metodologías de control de enfermedades en cultivos importantes (Mysore y Ryu, 2004).

Es posible distinguir un componente pasivo y uno inducible en la resistencia anti-hospedero. Las defensas preformadas son el primer obstáculo para impedir la colonización del tejido vegetal por un fitopatógeno potencial. La barrera más exterior es la cutícula cerosa, que está formada por compuestos derivados de ácidos grasos. El propósito de la cutícula cerosa es proteger a la planta de la desecación y de la entrada de algún patógeno (Nürnberg y Lipka, 2005). Muchos virus, hongos y bacterias fitopatógenos no son capaces de atravesar esta capa y solo pueden entrar a través de heridas o aberturas naturales, como los estomas. Si logran atravesar la cutícula, la siguiente barrera es la pared celular que puede detener el avance de los fitopatógenos. La pared celular consiste de (hemi-) celulosa, un polímero de β -1,4 glucano y pectina. Muchos fitopatógenos de origen fúngico y bacteriano pueden degradar la pared celular con celulasas, poligalacturonidasas y xilanasas (Mysore y Ryu, 2004).

Otra barrera es el citoesqueleto; los microfilamentos de actina han sido implicados en la defensa contra las infecciones fúngicas. La disrupción del citoesqueleto da lugar a la pérdida de la resistencia anti-hospedero en trigo, cebada, calabaza y tabaco contra algunos hongos como *Erysiphe spp*, *Colletotrichum spp*, *Mycosphaella spp* y *Alternaria spp* (Mysore y Ryu, 2004; Nürnberger y Lipka, 2005).

Si el patógeno logra atravesar estas barreras mecánicas, las plantas contienen compuestos antimicrobianos preexistentes y/o que pueden ser inducidos en cantidades significativas como un mecanismo de defensa en respuesta a elicitores químicos producidos por el fitopatogeno, dentro de esos compuestos se encuentran diversos compuestos fenólicos como los glicósidos fenólicos, lactonas insaturadas, compuestos de sulfuro, fitoalexinas, saponinas y glicosinolatos; que pueden ser liberados de las células vegetales mediante la lisis de sus vacuolas, todos estos compuestos forman parte de un cocktail de compuestos antimicrobianos que pueden ser liberados al exterior celular como una medida de defensa (Mysore y Ryu, 2004).

Al respecto, el producto del gen *tomA* de *Cmm*, ubicado en la isla de patogenicidad, mostró una alta similitud con proteínas conocidas como tomatinasas de hongos, implicadas en la degradación de la α -tomatina, una saponina con actividad antimicrobiana producida por el jitomate; por lo que puede considerarse como un factor de patogenicidad que facilita la invasión de los tejidos vegetales y que permite la evasión/supresión de los mecanismos de defensa del jitomate (Kaup y col., 2005; Bednarek y Osbourn, 2009).

Aún se desconoce si la durabilidad de la resistencia anti-hospedera es debido al reconocimiento de elicitores microbianos generales y/o múltiples, que puedan ser reconocidos por el sistema de defensa; o por genes que puedan actuar simultáneamente (Mysore y Ryu, 2004). La durabilidad de este tipo de resistencia radica en que el fitopatógeno difícilmente podrá contrarrestar la acción de múltiples mecanismos de defensa que actúan simultáneamente.

1.5 Resistencia basal inducida

Con base en las diferentes interacciones que se han estudiado, una regla general es que las respuestas de resistencia a patógenos biotróficos requieren

la ruta mediada por ácido salicílico (SA), mientras que las respuestas de resistencia ante patógenos necrotróficos son mediadas por ácido jasmónico (JA) y etileno (Hammond-Kosack y Parker, 2003; O'Donnell y col., 2003; Vallad y Goodman, 2004).

La infección por un patógeno puede desencadenar respuestas de defensa tanto en tejidos proximales como distales. La resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR) son respuestas relacionadas pero versiones distintas de una sola respuesta sistémica de defensa. Ambas respuestas potencian los mecanismos de defensa, de tal forma que ante alguna infección subsiguiente por el mismo o por diferente patógeno, las respuestas de defensa son activadas rápidamente y hace a la planta más fuerte para defenderse (Wan y col., 2002; Vallad y Goodman, 2004). La resistencia sistémica adquirida (SAR) es activada por la infección por un fitopatógeno biotrófo y se caracteriza por un incremento del SA endógeno, un incremento en los niveles de las proteínas relacionadas a patogénesis (PRP), el establecimiento temprano de un estrés oxidativo por parte de las especies reactivas de oxígeno (ROS); y como consecuencia la planta presenta una resistencia incrementada a un amplio espectro de patógenos (Wan y col., 2002; Vallad y Goodman, 2004). La resistencia sistémica inducida (ISR) ocurre después de la colonización de la raíz por cepas catalogadas como no patogénicas, entre ellas *Pseudomonas fluorescens*. Las hormonas que participan en este tipo de resistencia son el JA y el etileno. Se ha demostrado la ISR en diferentes especies vegetales contra varios patógenos bajo diferentes condiciones donde la rizobacteria y el patógeno se mantienen separados espacialmente (Vallad y Goodman, 2004) (Figura 1).

1.6 Resistencia mediada por genes de resistencia (genes R).

Una clase de resistencia muy bien estudiada es la mediada por la interacción del producto del gen R (resistencia) con el producto del gen Avr (avirulencia) (Flor, 1971). La mayoría de los genes R codifican proteínas con dominios NBS-LRR (Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Region); el dominio NBS está involucrado en la hidrólisis de ATP y en el inicio de la transducción de señales, mientras que el extremo carboxilo-LRR tiene la función de modular la activación

de la transducción de señales y ciertos residuos de aminoácidos están involucrados en el reconocimiento de los fitopatógenos (Belkhadir y col., 2004) (Fig. 2).

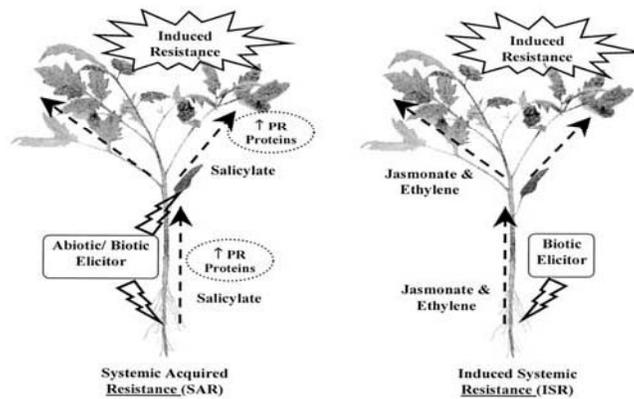


Figura 1. Características de la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR). Tomada de Vallad y Goodman (2004).

Los genes R pueden ser agrupados funcionalmente en 5 clases en base a la presencia de dominios adicionales: la clase CNL posee un dominio adicional tipo espiral (coiled-coil); la clase TNL posee un dominio adicional TIR, receptor de interleucina tipo Toll (Toll inteleukine-receptor); la clase RLP carece del dominio NBS y en su lugar posee un dominio serina-treonina-cinasa (ser/thr kinase) y un LRR extracelular; la clase RLK posee un dominio cinasa y un LRR extracelular; la última clase involucra a aquellos genes que proporcionan resistencia a travez de otros mecanismos (Dangl y Jones, 2001).

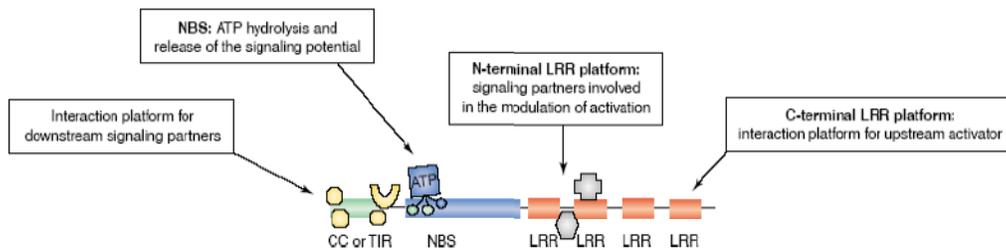


Figura 2. Características estructurales de los dominios de los genes R. Tomada de Belkhadir y col. (2004).

Cuando la proteína de avirulencia (*Avr*) de un patógeno (hongo, bacteria, virus, nemátodo, insecto) es reconocida directamente o indirectamente (hipótesis del guardián) por la correspondiente proteína de resistencia (*R*)

presente en la planta, la proteína *R* desencadena las respuestas de defensa de una manera rápida y específica contra el patógeno, que resultan ser lo suficientemente fuertes para detener la infección (Belkhadir y col., 2004). Se han asociado con este tipo de resistencia la respuesta hipersensible (HR), que es la muerte celular alrededor del sitio de infección, que permite detener el avance del fitopatógeno; y el establecimiento posterior de la SAR (Dangl y McDowell, 2006; DeYoung e Innes, 2006).

La hipótesis del guardián (la interacción indirecta) implica que las proteínas *R* desencadenan los mecanismos de resistencia cuando interactúan con otras proteínas de la planta (“guardianes”), en este sentido se ha descrito que *Avr* interactúa en primera instancia con su proteína blanco para modificarla y crear un ambiente favorable para la colonización de los tejidos vegetales (McDowell y Woffenden, 2003; Dangl y McDowell, 2006) (Figura 3).

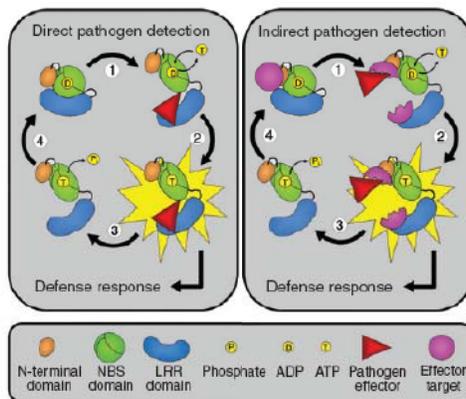


Figura 3. Modelos de interacción directa e indirecta entre las proteínas *R* con las proteínas *Avr*. Tomada de DeYoung e Innes, 2006.

Sin embargo, para que una planta pueda mantener mecanismos viables de resistencia basados en genes *R*, debe existir un balance entre la rápida evolución de los fitopatógenos y la diversificación de los genes que codifican proteínas NBS-LRR (DeYoung e Innes, 2006); al respecto la resistencia mediada por genes *R* puede perderse debido a mutaciones en el correspondiente gen *Avr* sin perder viabilidad ni virulencia, evitando ser reconocido por *R*, volviendo indetectable al fitopatógeno (McDowell y Woffenden, 2003).

A la fecha se han clonado varios genes *R*, que codifican proteínas con estructuras conservadas, sin embargo el análisis de los genomas de

Arabidopsis y arroz (y probablemente muchas otras especies de plantas) revelan cientos de genes homólogos a genes *R* (Baker y col., 1997; Jia y col., 2000; Dangl y Jones, 2001; Wan y col., 2002; Gachomo y col., 2003; Hammond-Kosack y Parker, 2003; Mysore y col., 2003).

Debido a que el producto del gen de avirulencia puede causar daño a la planta dependiendo de si encuentra su proteína contraparte “R”, el término gen de avirulencia no es considerado como adecuado por algunos autores, ya que en interacciones compatibles, el patógeno es virulento y genera enfermedad, por lo que se ha sugerido usar el término de efector (Hogenhout y col., 2009).

1.7 Interconexión de señales: “crosstalking”

La regulación de la expresión de genes de defensa es fundamental en las respuestas inducidas, por ejemplo en *Arabidopsis* se ha calculado que existen aproximadamente 1,500 factores de transcripción lo cual corresponden aproximadamente al 5% de su genoma (Riechmann y col., 2000).

Diversos estudios han mostrado que muchos genes asociados con defensa o patogénesis son activados por diferentes estímulos (Cheong y col., 2002; Durrand y col., 2000; Grennan, 2006; Hammond-Kosack y Parker, 2003; Li y col., 2004; Robatzek y Somssich, 2002; Zaninotto y col., 2006), lo que sugiere que existen convergencias (cross-talking) entre las rutas de defensa, a estrés biótico y abiótico y las rutas mediadas por genes *R*. Un gen con regulación diferente bajo algún estímulo, puede tener contribuciones diferentes en cada ruta.

Ya que múltiples genes están involucrados en las respuestas a diferentes tipos de estrés, es posible que existan mecanismos que permitan la correcta integración de estas señales en una manera ordenada. Estas complejas redes regulatorias, agonistas y antagonistas deben ser rápidamente integradas en una sola respuesta apropiada para el tipo de estrés, estos mecanismos de “cross-talking” son objeto de investigaciones para elucidar los mecanismos de resistencia contra ciertos patógenos en particular (Cheong y col., 2002; Hammond-Kosack y Parker, 2003; O’Donnell y col., 2003; Li y col., 2006; van Loon y col., 2006).

Por otra parte, el análisis de las similitudes y diferencias de los mecanismos moleculares entre la interacción compatible (enfermedad) y la incompatible (resistencia), es un punto esencial a considerar cuando se realizan estudios acerca de una resistencia duradera a fitopatógenos. En tabaco, la evidencia sugiere que la diferencia entre resistencia y susceptibilidad a enfermedades radica en la cinética de las defensas más que en su naturaleza (Desender y col., 2007), sin embargo, no es posible generalizar este caso. La búsqueda de diferencias eventuales cuantitativas y/o cualitativas entre la interacción compatible y la incompatible es un trabajo en progreso (Polessani y col., 2008; Ventelon-Debout y col., 2008; Wang y col., 2009; Sestili y col., 2011).

Las interacciones entre plantas y patógenos son específicas, complejas, dinámicas y difíciles de monitorear. La identificación de genes clave involucrados en resistencia a enfermedades por métodos tradicionales de observación de fenotipos en especies silvestres y su posterior introgresión en cultivares comerciales, ha sido el método utilizado por los mejoradores y requiere varios años de trabajo; la principal desventaja del mejoramiento tradicional es que existe la probabilidad de que los cultivares obtenidos pueden perder otras características como calidad del fruto, incluso el posterior rompimiento de la resistencia por el fitopatógeno. Sin embargo, nuevas estrategias con enfoques moleculares han sido desarrolladas para la identificación, caracterización y análisis funcional de genes involucrados en la señalización y respuesta a estrés biótico (Hammond-Kossak y Parker, 2003).

1.8 Técnicas para analizar la expresión génica

Con las tecnologías de expresión génica global, es posible la identificación de transcritos diferencialmente expresados y así proponer su posible función en base a su patrón de expresión diferencial (Wan y col., 2002).

Las técnicas para la obtención de perfiles de expresión génica global resultan útiles en el estudio de la interacción planta-patógeno, ya que permiten la identificación de genes potenciales involucrados en las respuestas de defensa, y la asignación de una posible función a uno o varios genes, en un contexto espacial y temporal. Además, estas técnicas, generan información

acerca de las redes de regulación génica en las que los genes analizados posiblemente participan (Wan y col., 2002; Breyne y col., 2003).

La técnica de microarreglos ha sido utilizada con éxito en un gran número de estudios (Wan y col., 2002). Sin embargo, su utilidad y potencial se restringen a un número reducido de organismos cuyos genomas o transcriptomas están secuenciados y en algunos casos, se limita por la ausencia de un juego representativo de genes (Breyne y col., 2003).

Métodos alternativos para los análisis de expresión génica global basados en amplificación de fragmentos de transcritos por PCR, han sido utilizados con éxito en diferentes organismos (Breyne y Zabeau, 2001; Breyne y col., 2002; Donson y col., 2002; Hammond-Kosack y Parker, 2003).

Dentro de estas técnicas, cDNA-AFLP es un método que permite la generación de datos cuantitativos de expresión génica de cualquier organismo. Este método resulta ser una tecnología robusta y sensible para el descubrimiento de genes. La mayor ventaja que ofrece esta técnica es que no requiere conocimiento previo de alguna secuencia, por lo que esta tecnología es un sistema abierto a cualquier organismo comparado con los sistemas de expresión que requieren la disponibilidad de secuencias de genes, como los chips de ADN (Bachem y col., 1996; Durrant y col., 2000; Vuylsteke y col., 2007) (Figura 4).

La técnica de cDNA-AFLP se ha utilizado para la obtención de patrones cuantitativos de expresión génica a diferentes tiempos (Breyne y col., 2002; Vandenaabeele y col., 2003; De Paepe y col., 2004; Goossens y col., 2003; Mao y col., 2004); y en la generación de mapas cuantitativos de expresión génica (expression quantitative trait loci mapping, eQTL), ya que los niveles de expresión génica pueden ser considerados como un rasgo cuantitativo (quantitative trait); lo cual permite identificar genes con patrones comunes de regulación génica (Brugmans y col., 2002; Vuylsteke y col., 2006).

En el caso de la interacción planta-patógeno, considerando su complejidad y dinamismo, la técnica de cDNA-AFLP ha sido aplicada con éxito en diferentes sistemas planta-patógeno (Durrant y col., 2000; Ditt y col., 2001; Petters y col., 2002; Carmona y col., 2004; Borrás-Hidalgo y col., 2005; Gabriëls y col., 2005).

El objetivo del análisis de la expresión génica durante la interacción planta-patógeno es el entendimiento de las respuestas de defensa en plantas y el uso de esta información para mejorar la resistencia de plantas a plagas y enfermedades. Asimismo, el entendimiento de las rutas y sistemas involucrados en resistencia y susceptibilidad en plantas, permitirá modificar la planta y hacer más efectivas las respuestas de resistencia.

El análisis de la expresión génica en la interacción trigo-*Puccinia* reveló diferencias cuantitativas entre un genotipo susceptible y uno resistente, algunos de los genes diferenciales encontrados están involucrados en procesos como fotosíntesis, ubiquitinación, transducción de señales, y en la ruta de shikimato (un predecesor de la fitohormona SA) y en el metabolismo de los fenilpropanoides (predecesores de las fitoalexinas, compuestos con actividad antimicrobiana). Lo que sugiere que varias rutas son afectadas por la infección del patógeno, algunas de las cuales son utilizadas para la defensa (Fofana y col., 2007).

Lund y col. (1998), reportaron que mutantes de jitomate con insensibilidad a etileno, mostraron una reducción de los síntomas de enfermedad producida por *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* y *Fusarium*. Lo cual sugiere que la insensibilidad a etileno en tejidos vegetativos podría proporcionar tolerancia a un amplio número de patógenos, sin embargo el etileno es necesario para la maduración de frutos como el jitomate.

Recientemente, el análisis por microarreglos durante la interacción de jitomate con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Balaji y col., 2008), reveló un papel importante del etileno en el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, sin embargo no está claro como es su contribución en la enfermedad, pero se ha reportado que el etileno puede promover el avance de una enfermedad si se aplica durante la infección o después que aparecen los síntomas (Van-Loon y col., 2006). Para el desarrollo de una estrategia de control es necesario caracterizar algún mecanismo de resistencia efectivo contra *Cmm*, como los que se encuentran en las especies silvestres *S. peruvianum* y *S. habrochaites*.

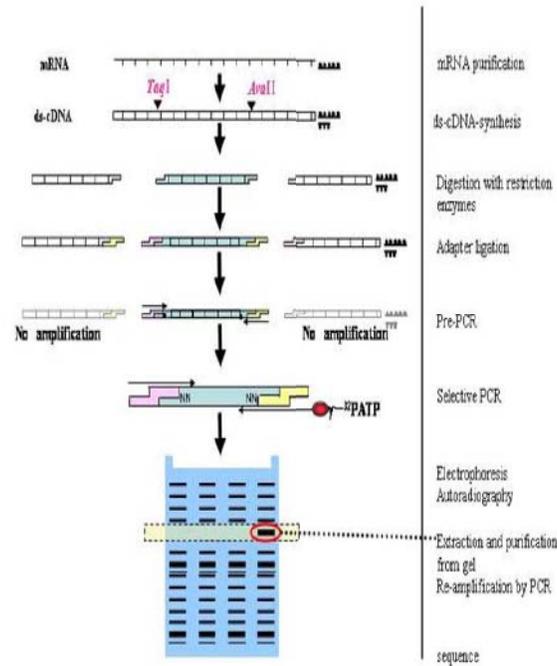


Figura 4. Fundamento de la técnica de expresión diferencial cDNA-AFLP.

Los análisis de expresión génica en combinación con otras herramientas genómicas y metabolómicas, pueden tener un impacto sustancial en el entendimiento de la interacción planta-patógeno, lo que permitirá encontrar estrategias nuevas para el desarrollo de resistencia a enfermedades en plantas (Wan y col., 2002; Hammond-Kosack y Parker, 2003; Gabriëls y col., 2005; Ossowski y col., 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los vegetales comestibles más populares mundialmente. Su producción alcanzó en 2001 las 100 millones de toneladas, siendo México uno de los principales productores a nivel mundial.

Sin embargo, su cultivo en México se ha reducido por la abundancia de enfermedades que lo afectan, reportándose que el jitomate puede ser afectado por 24 hongos, 7 bacterias, 10 virus, 3 viroides y múltiples nemátodos. Muchos de estos patógenos tienen una distribución mundial (Jones y col., 1991). En San Luis Potosí, se han reportado desde hace varios años problemas por enfermedades por virus en Rioverde, y enfermedades bacterianas en Villa de Arista, dentro de las que sobresale el cáncer bacteriano producido por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) que es devastadora y ha obligado a algunos agricultores a cambiar de cultivo.

El control convencional de enfermedades bacterianas en jitomate implica el uso de agroquímicos como compuestos derivados de cobre, sales cuaternarias de amonio, o antibióticos que no han resultado ser efectivos en todos los casos en el manejo de la enfermedad y además provocan daños al medio ambiente.

Una alternativa a este problema es el estudio de la base genética de las especies silvestres de jitomate como *Solanum peruvianum* y *S. habrochaites*, en las que se ha reportado resistencia a *Cmm*, de tal manera que con estrategias de análisis de expresión diferencial de genes como cDNA-AFLP se puedan seleccionar genes candidatos a ser transferidos a especies comerciales y tolerar la enfermedad. Esta estrategia es dirigida, segura y más rápida que con las metodologías tradicionales de fitomejoramiento genético. Además esta estrategia tendría un impacto ecológico favorable al reducir el uso de agroquímicos y por otro lado, se utilizarían recursos genéticos de especies emparentadas y representaría un impacto económico benéfico directo para los productores de jitomate.

Con el propósito del desarrollo de nuevas y mejores metodologías de control de enfermedades, es fundamental el análisis con técnicas avanzadas de Biología Molecular de la interacción del jitomate y especies silvestres resistentes con sus diferentes patógenos

3. HIPÓTESIS

El análisis de la expresión génica de especies silvestres de jitomate resistentes, en etapas tempranas de la infección por *Cmm*, permitirá la identificación de genes implicados en la regulación de los mecanismos de resistencia, con la probabilidad de conferir resistencia a cultivares comerciales susceptibles.

4. OBJETIVO

El objetivo general es la identificación de genes en *Solanum habrochaites* 2128 y *Solanum peruvianum* 2157 y 2172 involucrados en las respuestas de resistencia a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

4.1 Objetivos específicos

- Obtención del perfil de expresión génica global a 0, 8, 24 y 32 hpi, de las especies resistentes *S. habrochaites* 2128, *S. peruvianum* 2172 y 2157 y la especie susceptible *S. lycopersicum* en respuesta a la infección de *Cmm*.
- Identificación de posibles genes clave involucrados en la resistencia a *Cmm* en las especies *S. habrochaites* 2128 y *S. peruvianum* 2172 y 2157.
- Confirmación de la expresión génica diferencial de genes candidatos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales biológicos y protocolo de infección

Todo el protocolo se realizó en condiciones controladas y los desechos fueron esterilizados. Se solicitaron semillas de *S. peruvianum* LA2157 al Dr. Van-Heusden (Wageningen University) y semillas de *S. habrochaites* LA2128 y *S. peruvianum* LA2172 al TGRC (Tomato Genetics Resource Center, University of California, Davis). Plantas de aproximadamente 40 días de edad (justo cuando comenzaban a desarrollar la primera inflorescencia) de *S. habrochaites* LA2128, *S. peruvianum* LA2157 y LA2172, y *S. lycopersicum*, crecidas en condiciones de invernadero, fueron inoculadas con una suspensión de *Cmm* 191 (IFO, Instituto de Fermentación de Osaka) en PBS con una jeringa de insulina en una de las primeras ramas de cada planta. La bacteria fue crecida 24 h en el medio líquido 802 (polipeptona 1g/L, extracto de levadura 2g/L, sulfato de magnesio 0.92g/L) y se ajustó a una absorbancia de 0.2 (aprox. 1×10^5 UFC) a una longitud de onda de 600 nm. Se tomaron muestras de tejido (tallo y hojas) cercano al punto de infección para extracción de ARN total de cada planta antes de la infección (lo cual sirvió como control para todas las especies: 0 horas post-infección (hpi) y a las 8, 24 y 32 hpi para las especies resistentes, y 8 y 24 hpi para la susceptible; las muestras consistieron de una mezcla de tallo y hojas para disminuir el error de muestreo. Se evaluó el desarrollo de síntomas en cada planta por 22 días post-infección (dpi).

5.2 Extracción de ARN total y síntesis de cDNA doble cadena.

Para la extracción de ARN total, se utilizó el protocolo basado en TRizol (Invitrogen Cat. No. 15596-026) y la purificación se realizó con el kit "PureLink Micro-to-Midi. Total RNA purification system" (Invitrogen Cat. No. 121183-018). Muestras de 50-100 mg de tejido congelado fueron homogenizadas en nitrógeno líquido, en 1 mL de TRizol Reagent (Invitrogen Cat. No. 15596-026) en un tubo Eppendorf. El lisado preparado en el paso anterior se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos para permitir la completa disociación de complejos proteicos. Se añadió 0.2 mL de cloroformo por cada mL de TRizol utilizado, y se agitó vigorosamente por 15 segundos. Se incubó a temperatura ambiente por 2-3 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm por

15 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, la mezcla se separó en una fase inferior de fenol:cloroformo, una interfase y una fase superior acuosa conteniendo el ARN total. El volumen de esta fase fue aproximadamente 600 µL. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo Eppendorf, y se añadió un volumen igual de etanol 70% y se mezcló en vortex. Se procedió con la purificación del ARN extraído con el kit "PureLink Micro-to-Midi. Total RNA purification system" (Invitrogen Cat. No. 121183-018) de acuerdo a las especificaciones del fabricante, y las muestras se almacenaron a -80°C. Se verificó en gel de agarosa en condiciones desnaturizantes la calidad del ARN total extraído y fue cuantificado en Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Para la síntesis de la primer cadena de cDNA (DNA complementario) se utilizó el kit SuperScript II RT (Invitrogen Cat. No. 18064-014) con oligo dT₁₈, seguido de la síntesis de cDNA doble cadena (ds cDNA) con las enzimas de *E. coli* RNasa H, DNA ligasa y DNA polimerasa I, con una posterior precipitación y purificación con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), el cDNA de doble cadena fue cuantificado con Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA).

5.3 cDNA-AFLP

Para los análisis de expresión génica por cDNA-AFLP, se siguió el protocolo descrito por Vos y col. (1995) y Bachem y col. (1996), con algunas modificaciones. 250 ng de cDNA doble cadena fueron digeridos con 10 U de *TaqI* (Roche, Alemania) y 10 U de *MseI* (Roche, Alemania) en un volumen final de 25 µL, a 35°C por 24 h. Después de la digestión, las enzimas se inactivaron por incubación a 70° C por 15 min y las muestras se colocaron inmediatamente en hielo. Fueron ligados 5 pmol del adaptador doble cadena *TaqI* (5'-GACGATGAGTCCTGAC 3', 5'-CGGTCAGGACTCAT 3') y 50 pmol del adaptador doble cadena *MseI* (5'-GACGATGAGTCCTGAG 3'; 5'-TACTCAGGACTCAT 3') a los fragmentos procedentes de la digestión utilizando 1U de T4 DNA Ligasa (Roche, Alemania) a 16°C por 12 h. Después se realizó una dilución 1/10 de las ligaciones, y esta dilución se utilizó como templado para la preamplificación selectiva por PCR utilizando 50 ng de los oligo *TaqI*+0 (GACGATGAGTCCTGACCGA) y *MseI*+A

(GATGAGTCCTGAGTAAA), en un volumen final de 25 μ L, las condiciones de PCR fueron: 5 min para la desnaturalización inicial a 94° C seguido de 20 ciclos a 94° C por 30 s, 56° C por 60 s, 72° C por 60 s con 7 min a 72° C de extensión final. Para la amplificación selectiva, se utilizaron cuatro combinaciones de oligos +2+3. Se realizó una dilución 1/150 de la preamplificación, y se utilizaron las combinaciones de oligos selectivos: TaqI+TC/MseI+ACA, TaqI+TC/MseI+AAC, TaqI+TC/MseI+AGA, TaqI+GA/MseI+ACA; TaqI+GA/MseI+AAC y TaqI+GA/MseI+AGA en un volumen final de 25 μ L, las condiciones de PCR fueron: 5 min para la desnaturalización inicial a 94° C; 6 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 65° C, 60 s a 72° C; 6 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 60° C, 60 s a 72° C; 23 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 56° C, 60 s a 72° C; y 5 min a 72° C para la extensión final. Los productos de amplificación fueron mezclados con 10 μ L de amortiguador de carga y separados en geles de poliacrilamida al 6.5% en condiciones desnaturalizantes (urea 8M) en una cámara de secuenciación (BioRad, USA). La electroforesis se llevó a cabo en amortiguador TBE 1X (Tris-Base 0.9M, ácido bórico 0.9M, EDTA 20mM, pH 8.3) a 2000 V y 90 W. El gel fue teñido con nitrato de plata de acuerdo a las especificaciones del manual (Promega, Madison, USA).

5.4 Aislamiento de bandas diferenciales y secuenciación

Los geles teñidos fueron escaneados y se identificaron las bandas polimórficas basadas en ausencia, presencia o diferencia de intensidad en cada especie analizada, y fueron cortadas del gel con bisturí con extremo cuidado para evitar contaminación con otras bandas; las bandas polimórficas (Fragmentos Derivados de Transcritos-Diferencialmente Expresados, DE-TDF) aisladas fueron hidratados en 100 μ L de H₂O destilada estéril y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Para la reamplificación de las DE-TDFs fueron utilizados 5 μ l de una dilución 1:10 de cada banda y los oligos *TaqI*+0 y *MseI*+A con 40 ciclos de PCR y las mismas condiciones de la preamplificación; los DE-TDFs reamplificados fueron clonados en pGEM-T-Easy (Promega, Madison, USA) y secuenciados por el método de terminación con dideoxinucleótidos. Las secuencias obtenidas fueron analizadas para búsqueda

de homología en la base de datos del NCBI (Blastx; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>); las secuencias fueron manualmente asignadas a alguna categoría funcional en base a la literatura científica y a la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Los geles escaneados fueron analizados con el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>) para la cuantificación de la intensidad de cada DE-TDFs; el análisis de clustering jerárquico (hierarchical clustering) se llevó a cabo con el algoritmo del promedio de ligamiento (average linkage algorithm) y la medida de la distancia Euclidiana (Euclidean distance measure) con el software Cluster y TreeView (Eisen y col., 1998).

5.5 Confirmación de expresión génica diferencial por PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Para la confirmación por PCR tiempo real, se sintetizó cDNA a partir de 500 ng de RNA total de las muestras de plantas infectadas, con el kit SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras de cDNA fueron amplificadas con oligos específicos para genes, diseñados con los softwares Primer 3.0 (Rozen y Skaletsky, 2000) y OligoCalc (Kibbe, 2007) con base en a la secuencia de 5 DE-TDFs. La cuantificación se desarrolló en el equipo Applied Biosystems 7500 Fast Real time PCR system versión 2.0, en formato de 96 pozos. El programa de ciclado fue: desnaturalización inicial 94°C 5 min; 40 ciclos de 94°C 25 s, 60°C 30 s, los experimentos fueron llevados a cabo con el kit SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Al término del programa de ciclado, se añadió una curva de disociación para asegurar la amplificación de un solo producto de PCR. Los niveles de expresión fueron normalizados con el gen ACTIN1 (NM_001155179.1). Los cambios en los niveles de expresión fueron determinados utilizando el ciclo umbral (C_t) con el método de $\Delta\Delta C_t$ (Livak y Schmittgen, 2001); cada determinación se realizó por duplicado y los valores reportados representan el promedio más la desviación estándar.

6. RESULTADOS

6.1 Desarrollo de síntomas por la infección de *Cmm* en las diferentes especies de *Solanum*

Para la obtención de los perfiles de expresión en las plantas resistentes (*S. habrochaites* LA2128, *S. peruvianum* LA2157 y LA2172) y en la susceptible (*S. lycopersicum*) se realizó la infección en la primera rama verdadera de cada planta con la cepa *Cmm* 191 procedente del IFO (Institute of Fermentation of Osaka) (Fig. 5). Para evaluar la expresión génica diferencial se tomaron muestras de tejido vegetal para la extracción de ARN justo antes de la infección (tiempo 0) y a las 8, 24 y 32 hpi. Se consideraron estos tiempos tomando en cuenta que en *S. lycopersicum* los síntomas del cáncer bacteriano producido por *Cmm* aparecen aproximadamente entre los 7 y 10 dpi, por lo que resulta esencial conocer los eventos moleculares de reconocimiento y señalización que ocurren durante las primeras horas después de la infección en las especies resistentes dado que estas primeras horas pueden resultar determinantes en el desarrollo de la respuesta de defensa efectiva contra *Cmm* en el caso de las especies silvestres *S. habrochaites* LA2128, *S. peruvianum* LA2157 y LA2172. Para reducir el error de muestreo, la muestra tomada a los diferentes tiempos en cada especie consistió en una mezcla de hojas y tallo cercanos al punto de infección.

Las plantas infectadas con *Cmm* se monitorearon para el desarrollo de síntomas hasta 22 dpi. En las especies silvestres *S. habrochaites* LA2128 y *S. peruvianum* LA2172, se observaron ligeros síntomas localizados cercanos al punto de infección; mientras que en *S. peruvianum* LA2157 no se observó el desarrollo de síntomas de cáncer bacteriano, las plantas continuaron con su crecimiento y desarrollo normal; mientras que *S. lycopersicum* mostró un ligero síntoma de la enfermedad a 10 dpi, y a los 22 dpi los síntomas de marchitez fueron generalizados (Figura 6). Lo anterior sugiere que *S. peruvianum* LA2157 posee un grado de resistencia mayor, mientras que las especies silvestres *S. habrochaites* LA2128 y *S. peruvianum* LA2172 poseen un grado menor.



Figura 5. Protocolo de infección de *Cmm* en plantas de *Solanum* de 40 días de edad.

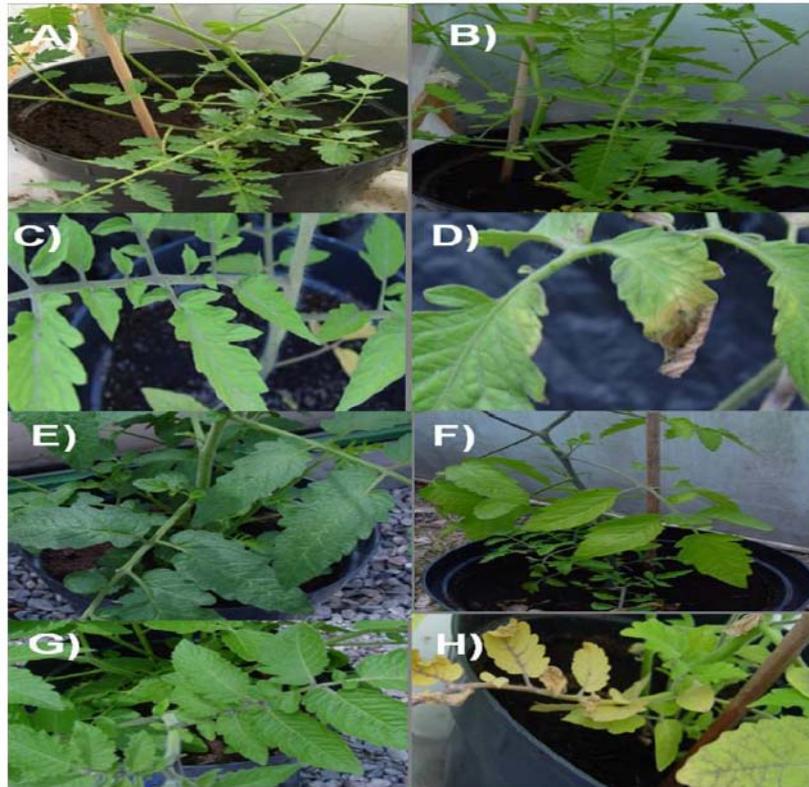


Figura 6. Sintomatología de las especies silvestres y la susceptible antes y 40 dpi. a) y b) *S. peruvianum* LA2157, antes y 40 dpi respectivamente; c) y d) *S. lycopersicum* antes y 40 dpi respectivamente; e) y f) *S. peruvianum* LA2172 antes y 40 dpi respectivamente; g) y h) *S. habrochaites* LA2128 antes y 40 dpi respectivamente.

6.2 Identificación de fragmentos derivados de transcritos-diferencialmente expresados (DE-TDFs) mediante cDNA-AFLP en las especies de *Solanum*

Para la obtención de los patrones de expresión génica por cDNA-AFLP, se partió de muestras de ARN total de cada especie a las 0, 8, 24 y 32 hpi;

posteriormente se realizó la síntesis de cDNA doble cadena (ds cDNA) con oligo dT₁₈ para seleccionar los RNA mensajeros (mRNA), se verificó que el ds cDNA fuera de buena calidad mediante la amplificación por PCR del gen constitutivo de actina; dado que la integridad del ARN extraído y del cDNA sintetizado, es esencial para el desarrollo de la metodología de cDNA-AFLP (Figura 7).

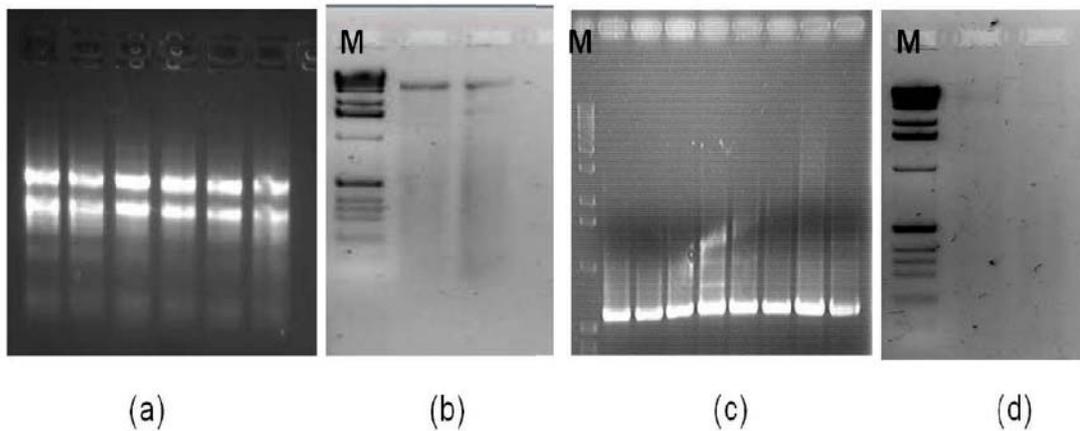


Figura 7. Controles de calidad para la técnica de cDNA-AFLP. a) Gel de calidad del ARN total extraído, b) calidad de cadena sencilla (fs) del cDNA sintetizado, c) amplificación por PCR de un fragmento del gen actina, d) calidad de doble cadena (ds) del cDNA sintetizado. M: marcador de peso molecular.

Los patrones de expresión génica consisten en un patrón de bandas (Fragmentos Derivados de Transcritos, TDFs) de cDNA cuyos tamaños van desde 150 hasta 500 pares de bases (pb), que se obtiene para cada muestra de cDNA doble cadena. Una de las principales ventajas de esta técnica es que se puede aplicar a cualquier organismo sin la necesidad de conocer secuencias de ADN, además de su alta reproducibilidad, versatilidad y robustez; permite la obtención de perfiles cuantitativos de expresión génica y su robustez ha sido comparada con la de los microarreglos (Vuylsteke y col., 2007). Para el análisis de la expresión génica de las especies resistentes *S. habrochaites* LA2128, *S. peruvianum* LA2157 y LA2172; y de la susceptible *S. lycopersicum*, durante su interacción con *Cmm*, se utilizaron 6 combinaciones de oligos selectivos +2+3 (TaqI+TC/MseI+ACA, TaqI+TC/MseI+AAC, TaqI+TC/MseI+AGA, TaqI+GA/MseI+ACA; TaqI+GA/MseI+AAC) con la finalidad de abarcar la mayor parte posible del transcriptoma de cada especie. Con cada combinación de oligos selectivos se obtuvieron entre 20 y 30 TDFs por muestra, de las cuales

la mayoría fueron polimórficas (Diferencialmente Expresados). Se seleccionaron aquellas TDFs que dentro de la serie (muestras a 0, 8, 24 y 32 hpi) de una misma planta tuvieran diferencias en su intensidad y/o estuvieran presentes/ausentes para considerarlos como TDFs-Diferencialmente Expresados (DE-TDFs) (Fig. 8).

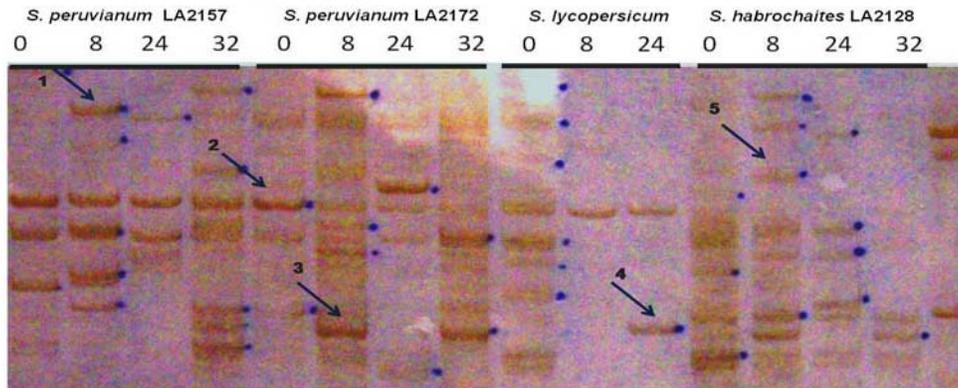


Figura 8. Sección característica de un gel de cDNA-AFLP teñido con nitrato de plata. La flecha 1 indica un DE-TDF inducido a 8 hpi en *S. peruvianum* LA2157; la flecha 2 indica un DE-TDF reprimido en *S. peruvianum* LA2172; la flecha 3 indica un DE-TDF con comportamiento cíclico en *S. peruvianum* LA2172; la flecha 4 indica un DE-TDF inducido a 24 hpi en *S. lycopersicum*; la flecha 5 indica un DE-TDF inducido a 8 hpi en *S. habrochaites* LA2128.

En total se lograron aislar 403 DE-TDFs de los geles de AFLP teñidos con plata; de los cuales 103 fueron encontrados en *S. peruvianum* LA2157, 115 en *S. peruvianum* LA2172, 98 en *S. habrochaites* LA2128 y 87 en *S. lycopersicum*. De los DE-TDFs identificados, el 47.64% fueron inducidos después de la infección por *Cmm*, el 39.7% fueron reprimidos y el 12.65% mostraron un comportamiento cíclico, esto significa que sus valores de expresión incrementaron y/o disminuyeron en al menos dos tiempos (Fig. 9). Aproximadamente 200 DE-TDFs fueron reamplificados con los oligos *TaqI*+0 y *MseI*+A; de los cuales, los que produjeron una sola banda del tamaño esperado fueron clonados y 141 DE-TDFs fueron secuenciados por duplicado.

6.3 Clasificación funcional de genes diferencialmente expresados

De los 141 DE-TDFs secuenciados, 134 produjeron secuencias de buena calidad (100 pb a 550 pb). Cada secuencia fue identificada por similitud utilizando la herramienta bioinformática BLASTx (Basic Local Alignment Search

Tool), en la base de datos pública GenBank (non-redundant public sequence database).

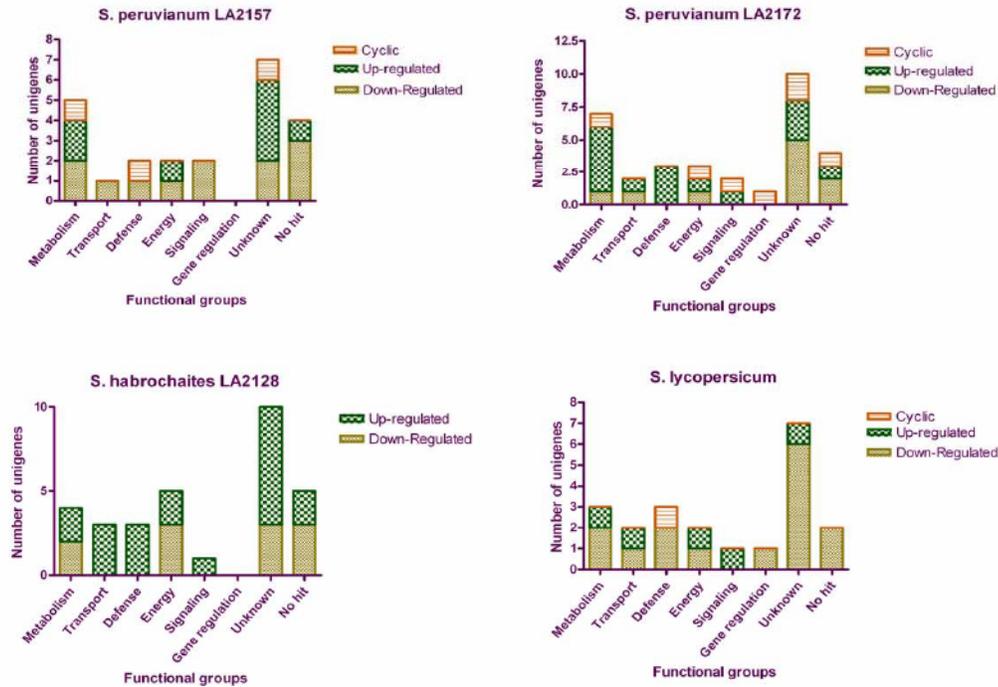


Figura 9. Clasificación funcional de UniGenes encontrados en las diferentes especies de *Solanum*.

El 40.2% de las secuencias tuvieron homología (mejor puntaje de similitud con un organismo) con secuencias conocidas de plantas, el 25.3% tuvieron homología con secuencias no caracterizadas de plantas, el 14.1% fueron secuencias de procariotes (secuencias no clasificadas) y el 11.1% no tuvieron ninguna homología (no hit) (Tabla 1). El análisis BLASTx, de los 66 DE-TDFs con homología a secuencias conocidas de plantas, dio lugar a 57 UniGenes; mientras que se obtuvieron 34 DE-TDFs con homología a secuencias no caracterizadas de plantas. Para comparar los mecanismos moleculares de la interacción compatible y la incompatible entre las especies de *Solanum* y *Cmm*, los 57 UniGenes encontrados fueron clasificados en grupos funcionales de acuerdo a su posible función asignada por la base de datos UNIPROT y la literatura disponible (Fig. 9). Los 57 UniGenes con homología a secuencias conocidas de plantas fueron clasificados en los grupos funcionales: transporte, defensa, energía, señalización, metabolismo y regulación génica (Tabla 2). Los

datos presentados corresponden a la cuantificación de la densidad óptica en el gel de poliacrilamida, de cada DE-TDF.

En todas las especies analizadas, se encontraron UniGenes de los grupos funcionales de metabolismo, transporte, defensa, energía y señalización; mientras que solo se encontraron UniGenes del grupo de regulación génica en *S. peruvianum* LA2172 y *S. lycopersicum*.

Tabla 1. Número y clase de secuencias encontradas en las especies de *Solanum*.

| | <i>S. peruvianum</i> LA2157 | <i>S. peruvianum</i> LA2172 | <i>S. habrochaites</i> LA2128 | <i>S.</i> <i>lycopersicum</i> | Total of sequences |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| Characterized sequences | 12 | 25 | 17 | 12 | 66 (49.2%) |
| Uncharacterized sequences | 7 | 10 | 10 | 7 | 34 (25.3%) |
| Unclassified | 1 | 6 | 8 | 4 | 19 (14.1%) |
| No Hit | 4 | 4 | 5 | 2 | 15 (11.1%) |
| Total number of sequences | 24 | 45 | 41 | 25 | |

En las especies resistentes el grupo funcional correspondiente a metabolismo tuvo el mayor número de UniGenes inducidos, mientras que el grupo funcional de energía tuvo el mayor número de UniGenes reprimidos. La especie susceptible tuvo el mayor número de UniGenes reprimidos, particularmente de los grupos funcionales de defensa y metabolismo (Fig. 9).

Tabla 2. Lista de UniGenes diferencialmente expresados en *Solanum* spp. en etapas tempranas de la infección por *Cmm*.

| Especie | Acceso | Anotación | E-value | Expresión génica (Densidad óptica) | | | |
|-------------------|----------------|-------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------|-------|--------|--------|
| | | | | 0 hpi | 8 hpi | 24 hpi | 32 hpi |
| TRANSPORTE | | | | 0 hpi | 8 hpi | 24 hpi | 32 hpi |
| Sp2157 | gb EEF35920.1 | protein transport protein sec: | 3E-33 | 22.2 | 15.2 | 17.2 | 24.2 |
| Sp2172 | gb EEF35920.1 | protein transport protein sec: | 4E-32 | 8.3 | 11.3 | 3.3 | 14.3 |
| | dbj BAG16520.1 | MRP1 putative multidrug resistance-associated protein | 9E-35 | 16.6 | 16.6 | 5.6 | 11.6 |
| Sh2128 | gb EEF35920.1 | protein transport protein sec23 | 1E-31 | 6.6 | 11.6 | 6.8 | 6.6 |
| | gb EEF32044.1 | signal recognition particle protein, putative | 1E-25 | 39.75 | 37.75 | 31.75 | 28.75 |

| | | | | | | | |
|----------------|--------------------|----------------------------------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | sp Q76CU2.1 | PDR1 Pleiotropic drug resistance protein 1 | 8E-52 | 31.41 | 18.41 | 5.41 | -0.59 |
| Slyc | gb EEF35920.1 | protein transport protein sec23 | 1E-32 | 4.6 | 1.6 | 15.6 | |
| | gb ABB86276.1 | mitochondrial processing peptidase-like | 6E-38 | 7.65 | -5.35 | -11.35 | |
| DEFENSA | | | | | | | |
| Sp2157 | gb AAD33072.1 | secretory peroxidase | 6E-39 | 18.2 | 18.2 | 15.2 | 27.2 |
| | gb EEF34729.1 | trehalose-6-phosphate synthase, putative | 1E-72 | 22.6 | 16.6 | 10.6 | 12.6 |
| Sp2172 | sp Q05538.1 | Basic 30 kDa endochitinase | 5E-37 | 14.3 | 25.3 | 6.3 | 14.3 |
| | dbj BAA10929.1 | cytochrome P450 like_TBP | 4E-14 | 20.3 | 15.3 | 17.3 | 26.3 |
| Sh2128 | gb AAD33072.1 | secretory peroxidase | 5E-40 | 56.75 | 50.75 | 46.75 | 41.75 |
| | sp Q05538.1 | Basic 30 kDa endochitinase | 1E-36 | 42.75 | 38.75 | 40.75 | 24.75 |
| | dbj BAA10929.1 | cytochrome P450 like_TBP | 1E-14 | 102.75 | 98.75 | 103.75 | 100.75 |
| Slyc | sp Q05538.1 | Basic 30 kDa endochitinase | 2E-36 | 9.6 | 6.6 | 3.6 | |
| | gb ABB72805.1 | Per1-like family protein | 1E-41 | 7.65 | -13.35 | -14.35 | |
| | gb ACH68563.1 | alpha-tubulin | 1E-53 | 41.75 | 37.35 | 23.45 | |
| ENERGÍA | | | | | | | |
| Sp2157 | sp P32980.1 | ATP synthase delta chain, chloroplastic | 8E-12 | -6.69 | -4.75 | -14.45 | -12.84 |
| | ref NP_001148439.1 | chlorophyll a-b binding protein 2 | 3E-43 | 0.14 | -5.06 | 1.444 | -1.68 |
| Sp2172 | sp P23322.2 | Oxygen-evolving enhancer protein1, chloroplastic | 7E-55 | -1.35 | -6.35 | -1.35 | -0.35 |
| | gb AAA34192.1 | ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, small subunit precursor | 4E-32 | -4.35 | -2.35 | -10.35 | -4.35 |
| | gb ABY21255.1 | ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit | 0.02 | 0.407 | 14.407 | -3.993 | 22.587 |
| Sh2128 | ref YP_001837389.1 | photosystem II phosphoprotein | 3E-17 | 22.6 | 12.6 | 8.6 | 9.6 |
| | emb CAK24966.1 | chlorophyll a/b binding protein | 2E-59 | 26.2 | 8.2 | 5.2 | 17.2 |
| | gb ACH54085.1 | putative chlorophyll b reductase | 1E-49 | 13.1 | 80.1 | 71.4 | 72.6 |

| | | | | | | | |
|---------------------|--------------------|------------------------------------------------------------------|----------|-------|--------|--------|--------|
| | gb ABY21255.1 | Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit | 0.13 | 26 | 18 | 14 | 2 |
| | gb ABB90047.1 | ATP synthase CF1 epsilon chain | 2E-16 | 6.65 | 2.65 | 7.65 | 4.65 |
| Slyc | ref YP_001837389.1 | photosystem II phosphoprotein | 3E-17 | -1.75 | -10.67 | -3.06 | |
| | sp O49074.1 | Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase | 3E-55 | -2.75 | -13.05 | -2.55 | |
| SEÑALIZACIÓN | | | | | | | |
| Sp2157 | NM_128064.2 | protein phosphatase 2C | 2E-30 | 13.6 | 6.6 | 17.6 | 10.6 |
| | gb AAK52801.1 | Calcium-dependent protein kinase CDPK1 | 1E-21 | -6.88 | 5.16 | 6.24 | 1.66 |
| Sp2172 | NM_115007.3 | ATGLR3.5 (Glutamate receptor 6) | 5E-42 | 8.3 | 15.3 | 10.3 | 31.3 |
| | ATU43377.1 | Arabidopsis thaliana similar to GTP-binding protein | 1E-12 | 14.3 | 24.3 | 15.3 | 35.3 |
| Sh2128 | sp P93213.2 | 14-3-3 protein 8 | 2E-35 | 49.75 | 55.75 | 45.75 | 29.75 |
| Slyc | gb AAB37246.1 | Calmodulin-binding protein | 3E-44 | 4.6 | 1.6 | -7.4 | |
| METABOLISMO | | | | | | | |
| Sp2157 | gb AAO66472.1 | biotin carboxylase carrier protein | 4E-19 | 12.4 | 19.5 | 10.8 | 12.5 |
| | gb EEH50839.1 | senescence-associated protein | 2E-13 | 19.8 | 8.2 | 7.6 | 15.7 |
| | gb ACG60665.1 | basic helix-loop-helix protein | 3E-21 | -4.06 | -6.06 | 6.04 | -0.86 |
| | gb ACC68681.1 | vacuolar processing enzyme 2 | 3.00E-06 | 42.35 | 59.65 | 51.55 | 66.25 |
| | AF347664.1 | Lycopersicon esculentum translation initiation factor IF1 (infA) | 1E-28 | 4.65 | 6.65 | 1.65 | -4.35 |
| Sp2172 | ref NP_564149.1 | PBC1 (20S proteasome beta subunit C1) | 4E-87 | -2.7 | 6.3 | -0.7 | 15.3 |
| | emb CAE45567.1 | SUMO E2 conjugating enzyme SCE1 | 1E-18 | 6.3 | 14.3 | 8.3 | 27.3 |
| | gb EEH50839.1 | senescence-associated protein | 1E-14 | 5.3 | 10.3 | 2.3 | 26.3 |
| | gb EEF42045.1 | amino acid binding protein, putative | 2E-67 | 5.857 | 1.207 | -5.063 | -0.643 |
| | emb CAB43882.1 | proton pump interactor | 0.009 | 33.75 | 33.75 | 26.75 | 38.75 |
| | EU161982.1 | 25S ribosomal RNA gene | 6E-30 | 23.75 | 62.75 | 33.75 | 45.75 |

| | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------|----------------------------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | gb ABC01888.1 | 40S ribosomal protein-like protein | 3E-24 | 11.6 | 27.6 | 7.6 | 21.6 |
| Sh2128 | gb ACC66148.3 | cell division cycle protein | 0.16 | 8.65 | 14.65 | 19.65 | 4.65 |
| | gb EEH50839.1 | senescence-associated protein | 6E-15 | 8.6 | 6.6 | 4.6 | 9.6 |
| | dbj BAG80553.1 | UDP-glucose:glucosyltransferase | 2E-18 | 14.08 | 15.14 | 12.7 | 5.56 |
| | emb CAA63432.1 | D12 oleate desaturase | 9.3 | 18.1 | 16.9 | 20.4 | 0.8 |
| Slyc | gb EEH50839.1 | senescence-associated protein | 4E-07 | 6.5 | -0.4 | 0 | |
| | EU161982.1 | RNA ribosomal | 6E-28 | 32.2 | 29.2 | 27.2 | |
| | AF479180.1 | 26s RNA ribosomal | 2E-25 | 49.2 | 36 | 32.2 | |
| REGULACIÓN GÉNICA | | | | | | | |
| Sp2172 | ref XP_002310574.1 | AP2/ERF domain-containing transcription factor | 5E-06 | 12.607 | 15.507 | -6.543 | 15.377 |
| Slyc | gb ABK41200.1 | transcriptional coactivator multiprotein bridging factor | 3E-34 | 7.65 | 0.65 | -13.35 | |

6.4 Análisis de agrupamiento jerárquico (hierarchical clustering)

El método más usado para el análisis de un grupo de datos de expresión génica es el análisis de agrupamiento (clustering). El análisis se emplea con el fin de visualizar grupos de genes que muestren un patrón similar de expresión a través del tiempo. Los métodos de clustering ordenan un número de genes en un cierto número de grupos o clusters, con base en sus niveles de expresión, de tal forma que dentro de un grupo existe una mayor similitud en los patrones de expresión de los genes que lo componen, que otros que están fuera de dicho cluster. Por lo que, es probable que los genes agrupados dentro del mismo cluster sean potencialmente relacionados funcionalmente.

En el clustering jerárquico cada muestra es considerada como un cluster. La similitud es calculada entre cada par de clusters y los más similares son agrupados en un nuevo cluster. El procedimiento es repetido hasta que solo queda un cluster. Para nuestro estudio, los valores de expresión de 91 DE-TDFs de las 4 especies, con homología a secuencias conocidas y desconocidas de plantas, fueron obtenidos mediante la cuantificación de la intensidad de cada DE-TDF en los geles de poliacrilamida a 0, 8, 24 y 32 hpi

mediante el software ImageJ; los valores de cada DE-TDF fueron normalizados con el valor a 0 hpi (que corresponde al estado basal sin infección), para realizar el análisis de agrupamiento jerárquico (hierarchical clustering analysis) de cada especie mediante el uso de los softwares Cluster y TreeView (Eisen y col., 1998).

El agrupamiento jerárquico en *S. peruvianum* LA2172 resultó en la formación de 4 subgrupos (Fig. 10a), el subgrupo A mostró los UniGenes que poseen un mayor grado de expresión; el subgrupo B tiene UniGenes que en términos generales disminuyen sus niveles de expresión a 8 o 24 hpi, y mantienen niveles bajos; el subgrupo C muestra UniGene con niveles de expresión menores a los del subgrupo A pero mayores a los del subgrupo B; el subgrupo D tiene UniGenes con un comportamiento cíclico y con picos en sus niveles de expresión a 32 hpi. En *S. peruvianum* LA2157, el agrupamiento jerárquico resultó en la formación de 2 grupos principales (Fig. 10b), el subgrupo A muestra UniGenes con niveles de expresión similares en todos los tiempos, con la excepción de los siguientes genes: Una cinasa dependiente de calcio CDPK1 (Calcium-dependent protein kinase), que muestra inducción a 8 y 24 hpi y represión a 32 hpi; y el gen peroxidasa secretoria, que muestra represión a 24 y 32 hpi. En *S. habrochaites* LA2128, se observó la formación de 4 subgrupos (Fig 10c), el subgrupo A muestra que el UniGene tipo citocromo P450 (cytochrome P450 like_TBP) es fuertemente expresado en todos los momentos analizados, mientras que el UniGene de una reductasa de clorofila b putativa (putative chlorophyll b reductase), muestra una inducción desde 8 hpi. El subgrupo D muestra UniGenes con niveles de expresión menores a los del subgrupo A, pero sus niveles disminuyen a 24 y 32 hpi; los subgrupos B y C muestran UniGenes con niveles de expresión más bajos. En *S. lycopersicum* se observó la formación de 3 subgrupos con UniGenes reprimidos (Fig. 10d), el subgrupo A muestra UniGenes con bajos niveles de expresión en todos los tiempos, el subgrupo B muestra UniGenes con represión desde las 8 hpi, y en el subgrupo C hay UniGenes con represión a las 24 hpi. El subgrupo D muestra UniGenes con ligeros cambios en sus niveles de expresión similares.

En términos generales, *S. peruvianum* LA2157 la especie más resistente mostró que la mayoría de los UniGenes tuvieron niveles de expresión

equiparables al tiempo 0; sin embargo hubo algunos que mostraron un patrón de represión importante. Las especies *S. peruvianum* LA2172 y *S. habrochaites* LA2128, que mostraron una reacción de resistencia intermedia contra *Cmm*, no mostraron un patrón característico de expresión diferencial; y la especie susceptible *S. lycopersicum* mostró, principalmente, un patrón de represión a 8 y 24 hpi.

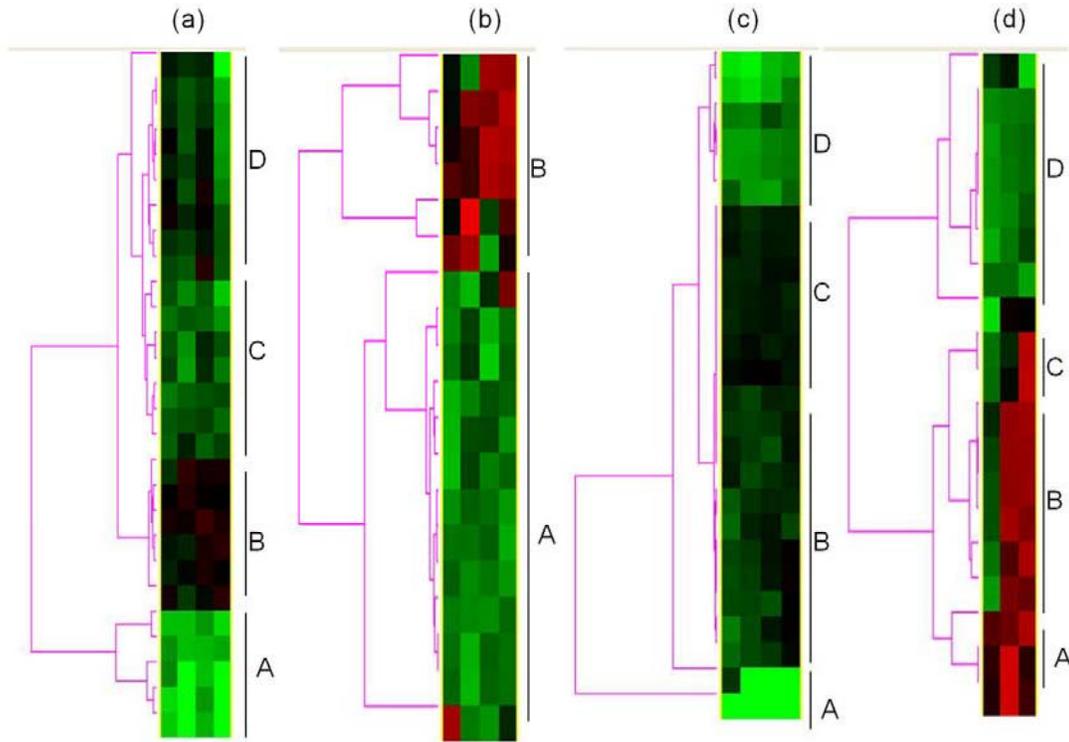


Figura 10. Análisis de agrupamiento jerárquico (hierarchical clustering) de los patrones de expresión génica diferencial de especies resistentes y susceptibles de *Solanum*, ante el reto de *Cmm*. a) *S. peruvianum* LA2172, b) *S. peruvianum* LA2157, c) *S. habrochaites* LA2128, y d) *S. lycopersicum*. Los colores rojo y verde indican bajos y altos niveles de expresión respectivamente.

6.5 Validación de la expresión diferencial por PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Para validar los patrones de expresión obtenidos por cDNA-AFLP, se evaluó la expresión de 5 UniGenes: peroxidasa secretoria, endoquitinasa de 30 kDa, subunidad C1 beta proteosoma (PBC1), proteína asociada a resistencia a multidrogas (MRP1), enzima de conjugación SUMO E2 (SCE1) por qRT-PCR a 0, 8 y 24 hpi, en las especies *S. peruvianum* LA2172, *S. habrochaites* LA2128 y

S. lycopersicum, utilizando oligonucleótidos específicos diseñados en las secuencias obtenidas de las bandas aisladas de los geles de cDNA-AFLP. Estos 5 UniGenes fueron seleccionados en base a su homología con genes conocidos y por su papel en los mecanismos de defensa en plantas, reportado en la literatura disponible. El qRT-PCR proporcionó datos cuantitativos de cómo ocurren los cambios en los niveles de expresión de los genes seleccionados tanto en las especies resistentes como en la susceptible, en las etapas tempranas de la infección por *Cmm* (Fig. 11).

La Figura 11 muestra la cuantificación relativa de los UniGenes peroxidasa secretoria, endoquitinasa básica de 30 kDa, PBC1, MRP1 y SCE1, en las especies *S. peruvianum* LA2172, *S. habrochaites* LA2128 y *S. lycopersicum*. La peroxidasa secretoria fue inducida en las especies resistentes a 8 hpi, con una represión a niveles basales a 24 hpi; mientras que en la susceptible, hubo una ligera represión a 8 hpi y una ligera inducción a 24 hpi.

La endoquitinasa básica de 30 kDa fue inducida a 8 hpi en las especies resistentes, en *S. habrochaites* LA2128 su nivel de expresión se incrementó en 24 hpi, mientras que en *S. peruvianum* LA2172 mostró una represión a 24 hpi; en la especie susceptible este gen mostró una represión desde 8 hpi.

El UniGen PBC1, involucrado en la degradación de proteínas mediada por ubiquitina, mostró una fuerte inducción en *S. peruvianum* LA2172 a 8 hpi, con una importante represión a 24 hpi; mientras que fue reprimido en *S. habrochaites* LA2128 desde 8 hpi; en *S. lycopersicum* mostró una represión a 8 hpi con una ligera inducción a 24 hpi; en este caso, los niveles de expresión en *S. lycopersicum* fueron más altos que en *S. habrochaites* LA2128.

MRP1, un transportador ABC involucrado en el transporte de metabolitos, fue reprimido a 8 hpi tanto en las especies resistentes como en la susceptible, con una ligera inducción a 24 hpi. Este patrón de expresión es muy interesante, ya que es la misma tendencia en las especies resistentes y en la susceptible, pero con diferencias cuantitativas a 8 hpi; en este caso los niveles de expresión de MRP1 en las especies resistentes fueron mayores que en la susceptible.

El UniGen SCE1, involucrado en la degradación de proteínas mediada por ubiquitina, fue altamente inducido a 8 hpi en las especies resistentes, con una

represión a niveles basales en 24 hpi; mientras que en la especie susceptible no hubo cambios significativos en sus niveles de expresión.

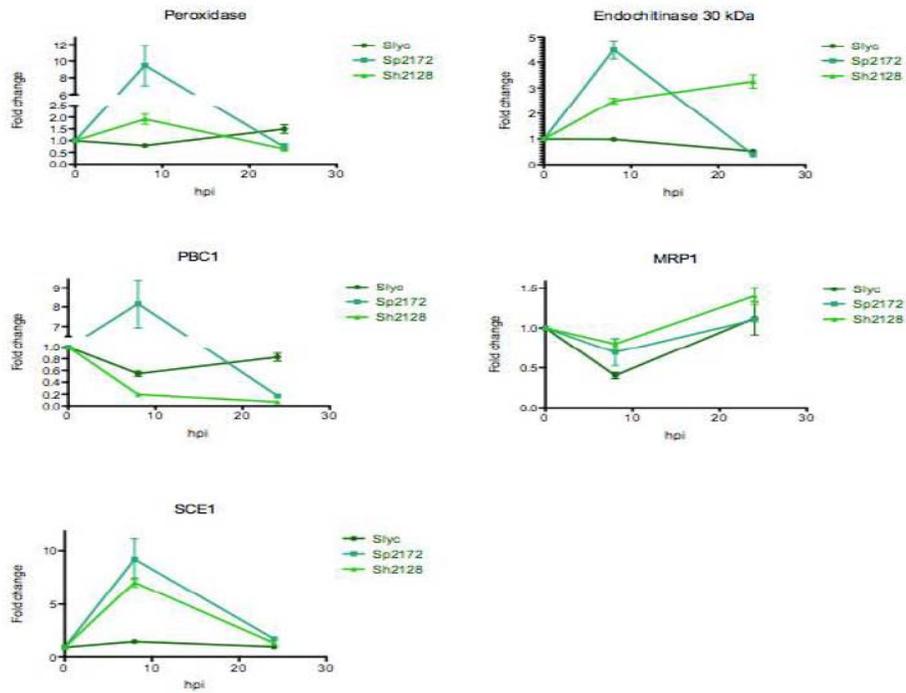


Figura 11. Validación por qRT-PCR de UniGenes seleccionados. UniGenes analizados: peroxidasa secretoria (gb|AAD33072.1|), endoquitinasa de 30 kDa (sp|Q05538.1), subunidad C1 beta proteosoma (PBC1) (ref|NP_564149.1), proteína asociada a resistencia a multidrogas (MRP1) (dbj|BAG16520.1|), enzima de conjugación SUMO E2 (SCE1) (emb|CAE45567.1|). Todos los datos fueron normalizados con el nivel de expresión de actina. Los datos representan cambios en los niveles de expresión a 8 y 24 hpi vs 0 hpi (estado basal). Se muestra el promedio de tres réplicas y desviación estándar.

7. DISCUSIÓN

7.1 Aspectos generales de la interacción *Solanum-Cmm*

Los análisis de expresión génica o comúnmente llamados análisis de transcriptoma, son una herramienta poderosa en el análisis de la expresión génica global durante la compleja y dinámica interacción planta-patógeno. Reportes previos han mostrado que las especies silvestres relacionadas a jitomate, poseen cierto grado de resistencia a *Cmm* (van Heusden y col., 1999; Francis y col., 2001; Kabelka y col., 2002), por lo tanto seleccionamos los genotipos silvestres *S. peruvianum* LA2157, LA2172 y *S. habrochaites* LA2128, para comparar las respuestas de defensa en las etapas tempranas de la infección por *Cmm*, entre los genotipos resistentes y el genotipo susceptible, ya que las respuestas tempranas pueden ser determinantes para el desarrollo de defensas posteriores efectivas contra la infección de fitopatógenos (Muelleborn y col., 2011).

La sintomatología observada en los genotipos analizados tuvo diferencias en el grado de severidad: en *S. peruvianum* LA2157 los síntomas fueron mínimos (van Heusden y col., 1999), mientras que en *S. peruvianum* LA2172 y *S. habrochaites* LA2128 se observaron síntomas de una forma local, es decir cercanos al punto de infección, mientras que *S. lycopersicum* mostró los característicos síntomas generalizados de marchitez. Lo cual permitió comparar las diferencias en los patrones de expresión génica durante una infección débil (en *S. peruvianum* LA2157), una intermedia (*S. peruvianum* LA2172 y *S. habrochaites* LA2128) y una fuerte (en *S. lycopersicum*).

El análisis de expresión diferencial identificó secuencias con homología a plantas (aproximadamente 75%), procariotes (aproximadamente 15%) y secuencias no reportadas en las bases de datos utilizadas (aproximadamente 10%). Un punto interesante es que cerca del 25% de las secuencias analizadas fueron secuencias de plantas sin caracterizar, lo cual sugiere que muchos de los genes asociados son componentes de la interacción *Solanum-Clavibacter* que no han sido caracterizados en otras especies, y deben ser determinados para ser estudiados en detalle. Estas secuencias podrían corresponder a transcritos específicos de la interacción *Solanum-Clavibacter* y/o a interacciones generales con bacterias Gram-positivas.

La técnica de cDNA-AFLP ha sido exitosamente aplicada en el estudio de diversos sistemas planta-patogeno y en estrés abiótico (Polesani y col., 2008, Ventelon-Debout y col., 2008, Wang y col., 2009, Cheng y col., 2010, Sestili y col., 2011) y resulta menos costosa que los microarreglos. Con el uso del protocolo de tinción de nitrato de plata, fue posible identificar y recuperar bandas diferenciales, directamente de los geles desnaturalizantes de poliacrilamida. El uso de 6 combinaciones de oligos selectivos +2+3 permitió identificar transcritos diferencialmente expresados entre las especies resistentes y la susceptible, entre diferentes especies resistentes y además, entre diferentes líneas (LA2157 y LA2172) de la misma especie. La mayoría de los UniGenes diferencialmente expresados encontrados en este trabajo, tienen un papel claro en las respuestas de resistencia a enfermedades en otros sistemas planta-patógeno. Además, algunos genes han sido asociados principalmente con respuestas al estrés abiótico como la trehalosa-6-fosfato sintasa, lo cual sugiere respuestas cruzadas (crosstalking) entre los mecanismos de resistencia a *Cmm* y estrés abiótico, incluso se ha reportado crosstalking entre el desarrollo y las respuestas de defensa en plantas a través de modificaciones epigenéticas de la cromatina (Demetriou y col., 2010). Nueva evidencia sugiere que la resistencia anti-hospedero (non host resistance) está compuesta por mecanismos que se sobrelapan entre sí, y de aquí, surge su durabilidad (Mysore y Ryu, 2004).

7.2 Fotosíntesis

Este trabajo reveló que algunos genes implicados en fotosíntesis fueron reprimidos tanto en las especies resistentes como en la susceptible, lo que resalta la idea de que existe una relación entre la fotosíntesis y los mecanismos de defensa a enfermedades, con una tasa de fotosíntesis disminuída los procesos celulares no esenciales podrían también disminuir, mientras que la síntesis de metabolitos antimicrobianos, como las fitoalexinas, llega a ser una prioridad con la finalidad de detener el avance del fitopatógeno al menos cerca del sitio de infección (Bolton, 2009). Mientras que por otro lado, una disminución en la tasa local fotosintética, puede provocar la acumulación de carbohidratos en el sitio de infección, particularmente hexosas, como resultado

de un incremento de la actividad de invertasa (Bolton, 2009; Wang y col., 2009). En este escenario, *Cmm* tendría una ventaja durante la interacción compatible, ya que la isla de patogenicidad *chpC/tomA* de 129 kb, contiene numerosos genes involucrados en el metabolismo de diversos carbohidratos (Gatermann y col., 2008).

7.3 Senescencia y etileno

Un transcrito con homología a una proteína asociada a senescencia fue encontrado en todas las especies, en *S. peruvianum* LA2172 y *S. habrochaites* LA2128 fue inducido, mientras que en *S. peruvianum* LA2157 y *S. lycopersicum* fue reprimido. Al respecto es posible afirmar que la senescencia prematura puede ser inducida por diversos factores, entre ellos la infección de un patógeno o un descenso en la tasa fotosintética (Espinoza y col., 2007; Quirino y col., 1999; Quirino y col., 2000). La muerte celular puede ser una liga entre las respuestas de defensa, los eventos de senescencia y los efectos del etileno, mientras que el etileno tiene papeles importantes tanto en las respuestas de resistencia (Meng y col., 2010), y en la susceptibilidad a enfermedades (Balaji y col., 2008); adicionalmente algunos componentes de la senescencia y la respuesta hipersensible (HR) pueden ser potenciados simultáneamente. Balaji y col. (2008) mostraron que durante la interacción jitomate-*Cmm*, factores de transcripción de la familia ERF/AP2, involucrados en la señalización del etileno, fueron inducidos a 4 y 8 días post-infección; interesantemente en nuestro trabajo encontramos un transcrito con un dominio AP2/ERF reprimido en la especie resistente *S. peruvianum* LA2172 en las primeras horas después de la infección, lo cual puede sugerir que los genes involucrados en la señalización de etileno, con patrones de expresión opuestos en las especies resistentes y la susceptible podrían estar involucrados en los mecanismos de resistencia y/o susceptibilidad a *Cmm*. Sin embargo, es necesario un trabajo más detallado en esta área (Lund y col., 1998; Van Loon y col., 2006; Wan y col., 2002).

7.4 Genes diferenciales en *S. lycopersicum*

Interesantemente en la especie susceptible de jitomate, se encontraron UniGenes reprimidos con homología a proteínas de la familia Per1, proteínas de unión a calmodulina (calmodulin-binding protein) y a un coactivador transcripcional MBF1c (MBF1c transcriptional coactivator multiprotein bridging factor). Per1 es una proteína LEA encontrada en el genotipo de maíz Mp420, y está involucrada en la tolerancia a estrés abiótico y a la infección por *Aspergillus* (Chen y col., 2007). Por otro lado, evidencia reciente sugiere que las proteínas de unión a calmodulina, involucradas en la señalización de Ca^{2+} , son esenciales para la acumulación del ácido salicílico (SA) y para el establecimiento de la respuesta hipersensible (HR) (Du y col., 2009). Los coactivadores son factores de transcripción que pueden interconectar otros factores de transcripción con la maquinaria basal de transcripción, y por lo tanto, pueden fortalecer las respuestas de defensa (Suzuki y col., 2005). En nuestro estudio, en *S. lycopersicum*, Per1 y la proteína de unión a calmodulina fueron reprimidos, mientras que MBF1c fue inducido a 8 hpi y reprimido a 24 hpi. Nuestra hipótesis es que las respuestas de defensa mediadas por estos genes, podrían estar siendo reprimidas en las etapas tempranas, como resultado de la infección por *Cmm*.

7.5 Visualización gráfica de la expresión génica diferencial

El agrupamiento jerárquico (hierarchical clustering) mostró diferencias significativas en los patrones de regulación génica entre las especies resistentes con respecto a los tiempos analizados. En *S. lycopersicum*, la especie susceptible, encontramos un patrón predominante de represión, lo que sugiere que *Cmm* podría ser un fitopatógeno altamente adaptado al jitomate, capaz de manipular el metabolismo vegetal bajo circunstancias que aún permanecen sin ser elucidadas. El complejo patrón de regulación génica observado en las especies silvestres, resalta un mecanismo multigénico de resistencia operando desde las etapas tempranas de la infección (Muelleborn y col., 2011; Zhang y col., 2011). Es importante mencionar que no es posible descartar la posibilidad de que algunas de las diferencias observadas en las especies silvestres estén asociadas a cada genotipo más que solamente a la diferencia en su patrón de expresión, sin embargo, los datos mostrados en este

trabajo resultan confiables dado que la mayoría de los genes identificados tienen un papel claro en los mecanismos de defensa contra fitopatógenos, y los patrones de una selección de genes fueron confirmados por qRT-PCR. Este trabajo es el inicio para determinar con mayor certeza la función de cada gen en los mecanismos de defensa contra *Cmm* en las especies silvestres; al respecto, cada especie podría poseer su propio mecanismo de defensa.

7.6 Análisis cuantitativo de genes candidatos

El patrón de expresión de los UniGenes peroxidasa secretoria, endoquitinasa de 30 kDa, PBC1, MRP1 y SCE1 fue validado (cuantificación relativa) por qRT-PCR en las especies *S. peruvianum* LA2172, *S. habrochaites* LA2128 y *S. lycopersicum*. Los resultados indican que la peroxidasa secretoria, endoquitinasa, de 30 kDa, SCE1 y PBC1 fueron inducidos en las especies resistentes mientras que en la susceptible estos UniGenes fueron reprimidos o sin cambios significativos en sus niveles de expresión. Lo cual sugiere que las respuestas de defensa en las especies silvestres son más intensas y/o más rápidas que en la susceptible.

Los resultados de expresión relativa de la peroxidasa secretoria sugieren un posible papel en el metabolismo oxidativo apoplástico, como un mecanismo inicial de defensa en las especies resistentes contra la infección de *Cmm* (Kotchoni y Gachomo, 2006), y en la señalización mediada por especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que el H₂O₂ puede actuar como segundo mensajero intracelular e intercelular para la inducción sistémica de mecanismos de defensa en el estrés abiótico y biótico (Mittler y col., 2004; Nanda y col., 2010). Balaji y col. (2008), mostraron una peroxidasa (AW647641) reprimida a 8 dpi en la especie susceptible, mientras que en nuestro trabajo encontramos una peroxidasa secretoria inducida a 8 hpi en las especies resistentes, e inducida en la susceptible a 24 hpi, lo cual puede sugerir un retraso en las respuestas de defensa mediadas por ROS, ya sea en las rutas de señalización y/o en el metabolismo oxidativo en la especie susceptible.

La inducción de la endoquitinasa de 30 kDa en las especies silvestres, manifiesta la importancia de las quitinasas durante las respuestas de defensa, incluso contra bacterias; la actividad de las quitinasas produce compuestos que

inducen la síntesis de fitoalexinas que pueden potenciar las respuestas de defensa basal en la resistencia anti-hospedero (non-host resistance) (Yamaguchi y col., 2000). Balaji y col. (2008) mostraron que una quitinasa (BG629612) fue inducida a 8 dpi durante la interacción jitomate-*Cmm*, mientras que en este trabajo encontramos una endoquitinasa 30 kDa inducida a 8 hpi en las especies resistentes, y reprimida en la susceptible. Lo cual también puede sugerir un retraso en las respuestas de defensa mediada por quitinasas en la especie susceptible.

Nuevas líneas de investigación sugieren que la ruta de ubiquitina/proteasoma tiene un papel importante en las respuestas de defensa (Dong y col., 2006), dado que la ruta de ubiquitinación está implicada en la señalización de los genes R, defensas basales e inducidas y en el establecimiento de la HR (Shirsekhar y col., 2010). En nuestro estudio, identificamos en *S. peruvianum* LA2172 dos transcritos inducidos a 8 hpi, el primero con homología a la enzima de conjugación SUMO E2 (SCE1), y el segundo con homología a la subunidad C1 de la unidad 20S del proteasoma (PBC1, 20S proteasome beta subunit C1), ambos implicados en la ruta de ubiquitinación. El análisis de expresión relativa mostró que en la especie susceptible PBC1 fue reprimido, mientras que SCE1 no mostró cambios significativos en sus niveles de expresión. Balaji y col. (2008), mostraron genes inducidos a 8 dpi involucrados en el complejo del proteasoma 26S y enzimas de conjugación a ubiquitina, en la especie susceptible, y en un trabajo reciente, la susceptibilidad de *Nicotiana benthamiana* a *Cmm* fue incrementada mediante el silenciamiento génico de una enzima ubiquitin-activadora (ubiquitin activating enzyme) (Balaji y col., 2010). Lo cual apoya el papel que juega la ruta de ubiquitinación en las respuestas de defensa efectivas contra *Cmm* en *S. habrochaites* LA2128 y *S. peruvianum* LA2172.

El UniGen MRP1, un transportador de la familia ABC (ATP Binding Cassette), mostró un patrón de expresión similar tanto en especies resistentes como en la susceptible, sin embargo hubo diferencias cuantitativas teniendo en la especie susceptible a niveles de expresión más bajos. Es probable que este gen carezca de una función sobresaliente en las respuestas de defensa contra *Cmm*; sin embargo es posible que las diferencias cuantitativas observadas

sean suficientes para establecer mecanismos efectivos de resistencia. Por otro lado, se requiere más investigación al respecto, ya que algunos transportadores ABC, como MRP1 y PDR1 (ambos expresados diferencialmente en nuestro trabajo) resultan esenciales en los mecanismos de resistencia en otros sistemas planta-patógenos (Hückelhoven, 2007; Kwon y col., 2008; Stukkens y col., 2005).

Aunque no hay evidencia directa de que algún gen R pudiera estar involucrado en la resistencia a *Cmm* (Kabelka y col., 2002), aún no es posible descartar el papel de algún gen R, genes constitutivos y/o variaciones morfológicas; ya que los genes homólogos a R (R gene homologs, RGH) son abundantes en el genoma de especies como el tabaco, una especie domesticada con un bajo nivel de diversidad genética (Leng y col., 2010); por otro lado, Gabriëls y col. (2005), reportaron la inducción de un gen NBS-LRR en jitomate, durante la interacción jitomate-*Cladosporium*, involucrado en el desarrollo de HR, lo cual es sobresaliente pues se cree que usualmente estos genes son constitutivos. Por lo tanto, es alta la probabilidad de encontrar nuevos RGH con nuevas características en especies silvestres con alto nivel de diversidad genética, como *S. peruvianum* LA2157, LA2172 y *S. habrochaites* LA2128. Además, las especies silvestres poseen diferencias morfológicas que podrían actuar como defensas pasivas, como la estructura, tamaño y densidad de los haces vasculares, lo que en conjunto podría tener influencia en la patogénesis de *Cmm* y/o en potenciar los mecanismos de defensa, este trabajo se enfocó en investigar las respuestas inducidas, sin embargo, se requiere más investigación para identificar los elicitores o potenciadores químicos producidos por *Cmm* y para identificar los receptores en las especies resistentes y en la susceptible.

En resumen, los resultados de este trabajo revelan patrones contrastantes de expresión génica entre las especies resistentes y la susceptible en respuesta a la infección por *Cmm*, los cuales son datos similares a lo reportado para la interacción melón-*Fusarium* (Sestili y col., 2011). Nuestra hipótesis es que los mecanismos de defensa basal podrían estar siendo inhibidas y/o retrasadas, posiblemente por la manipulación del metabolismo de la planta por parte de *Cmm*. Esto resalta el hecho de que *Cmm* es un fitopatógeno altamente

adaptado al jitomate, capaz de manipular las respuestas tempranas de defensa; mientras que aun no se adapta a las especies silvestres *S. peruvianum* LA2172, LA2157 y *S. habrochaites* LA2128, donde los mecanismos moleculares de una defensa exitosa, inician desde etapas tempranas de la infección (como 8 hpi), y son más intensas y rápidas que en la especie susceptible. Al respecto, Wan y col. (2002), sugieren que durante la infección, el metabolismo de la planta representa una mezcla de respuestas de resistencia y de susceptibilidad; en este caso la comprensión de la forma en que *Cmm* manipula el metabolismo del jitomate y/o suprime sus defensas será esencial. Además, con la identificación de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) percibidos por las especies resistentes, así como los sistemas de detección de PAMPs en las especies resistentes, podrá ayudar en el desarrollo de estrategias nuevas y durables para el control del cáncer bacteriano, mientras que el apoyo de técnicas de ingeniería genética aplicada a protección de cultivos, permitirá el mejoramiento genético mediante el uso de genes específicos inducidos por el patógeno, con la preservación de las características deseadas del cultivar (Cardoso y col., 2010).

8. CONCLUSIONES

- Este es el primer trabajo en el que se compara una parte del transcriptoma de especies silvestres relacionadas al jitomate, resistentes a *Cmm* y la especie susceptible, en etapas tempranas en respuesta a la infección por *Cmm*.
- La tercera parte de las secuencias identificadas tienen similitud con secuencias no caracterizadas de plantas, lo cual sugiere nuevos mecanismos de interacción entre *Solanum* spp. y *Cmm*.
- Los patrones cuantitativos de expresión de algunos genes en etapas tempranas post-infección muestran un comportamiento opuesto entre las especies resistentes y la susceptible.
- Este trabajo proporciona nuevos elementos para la comprensión de los mecanismos moleculares tempranos en las interacciones compatible e incompatible de las especies de *Solanum* con *Cmm*, y proporciona nuevos genes candidatos para un análisis funcional detallado.

9. PERSPECTIVAS

- Secuenciar y analizar los DE-TDFs faltantes.
- Obtener las secuencias codificantes completas (ORF) de los actuales genes candidatos.
- Analizar las regiones promotoras de los genes candidatos en especies silvestres y en el genoma de *S. lycopersicum*.
- Realizar los experimentos de VIGS en las especies silvestres, utilizando el vector viral más adecuado y de mayor facilidad de manejo.
- Determinar el fenotipo (resistencia o susceptibilidad) en respuesta a la infección por *Cmm*, de las especies silvestres con uno o más genes candidatos silenciados.
- Generar una planta de jitomate transgénica de un cultivar comercial, con una regulación génica del transgén seleccionado con base al análisis funcional, diferente a la silvestre, ya sea a través de la sobreexpresión o por medio de la incorporación/manipulación de determinados elementos regulatorios.
- Identificar los PAMPs producidos por *Cmm*, y los sistemas de reconocimiento de PAMPs en las especies silvestres, mediante análisis de metabolómica y genómica comparativa.
- Desarrollar una estrategia de control efectiva del cáncer bacteriano, con base en los recursos fitogenéticos del género *Solanum*.

10. REFERENCIAS

- Abramovitch RB, Anderson JC, Martin GB (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature* 7: 601-611
- Abramovitch RB, Martin GB (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 7: 356–364
- Allen LJ, Macgregor KB, Koop RS, Bruce DH, Karner J, Bown AW (1999). The relationship between photosynthesis and a mastoparan-induced hypersensitive response in isolated mesophyll cells. *Plant Physiol* 119: 1233–1241
- Anzi C, Pelucchi P, Vazzola V, Murgia I, Gomarasca S, Piccoli MB, Morandini P (2008). The proton pump interactor (Ppi) gene family of *Arabidopsis thaliana*: expression pattern of Ppi1 and characterisation of knockout mutants for Ppi1 and 2. *Plant Biol* 10: 237-49.
- Arie T, Takahashi H, Kodama M, Teraoka T (2007). Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnol* 24: 135–147.
- Bachem CWB, van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RGF (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber developmen. *Plant J* 9: 745–753.
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-33.
- Balaji V, Mayrose M, Sherf O, Jacob-Hirsch J, Eichenlaub R, Iraki N, Manulis-Sasson S, Rechavi G, Barash I, Sessa G (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol* 146: 1797-1809.
- Balaji V, Sessa G, Smart CD (2010). Silencing of host basal defense response related gene expression increases susceptibility of *Nicotiana benthamiana* to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 101: 349-57
- Bednarek P y Osbourn A (2009). Plant-Microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* 324:746-748
- Belkhadir Y, Subramaniam R, Dangl JL (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol* 7: 391–399
- Bhattacharjee S (2005). Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr Sci* 89: 1113-1121.

- Bishop JG, Dean AM, Mitchell-Olds T (2000). Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *PNAS* 97: 5322–5327
- Bolton MD (2009). Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 487–497
- Borrás-Hidalgo O, Thomma BTHJ, Carmona E, Borroto CJ, Pujol M, Arencibia A, Lopez J (2005). Identification of sugarcane genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. *Plant Physiol Biochem* 43: 1115-1121.
- Breyne P, Zabeau M (2001). Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Curr Opin Plant Biol* 4: 136–142.
- Breyne P, Dreesen R, Vandepoele K, De Veylder L, Van Breusegem F, Callewaert L, Rombauts S, Raes J, Cannoot B, Engler G, Inzé D, Zabeau M (2002). Transcriptome analysis during cell division in plants. *PNAS* 23: 14825-30
- Breyne P, Dreesen R, Cannoot B, Rombaut D, Vandepoele K, Rombauts S, Vanderhaeghen R, Inze D, Zabeau M (2003). Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Mol Gen Genomics* 269: 173–179
- Brugmans B, Fernandez del Carmen A, Bachem CWB, van Os H, van Eck HJ, Visser RGF (2002). A novel method for the construction of genome wide. *The Plant J* 31: 211-222
- Cai X, Takken FLW, Joosten MHAJ, De Wit PJGM (2001). Specific recognition of AVR4 and AVR9 results in distinct patterns of hypersensitive cell death in tomato, but similar patterns of defence-related gene expression. *Mol Plant Pathol* 2: 77-86.
- Cardoso SC, Barbosa-Mendes JM, Boscariol-Camargo RL, Christiano RSC, Filho AB, Vieira MLC, Mendes BMJ, Mourão Filho FAA (2010) Transgenic sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) expressing the attacin A gene for resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Mol Biol Rep* 28:185–192
- Carlton WM, Braun EJ, Gleason ML (1998). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology* 88: 525-529.
- Carmona E, Vargas D, Borroto CJ, Lopez J, Fernandez AI, Arencibia A, Borrás-Hidalgo O (2004). cDNA-AFLP analysis of differential gene expression during the interaction between sugarcane and *Puccinia melanocephala*. *Plant Breed* 123: 499 -501

- Castillo AG, Kong LJ, Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER (2004). Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system. *J Virol* 78: 2758–2769
- Chalupowicz L, Cohen-Kandli M, Dror O, Eichenlaub R, Gartemann KH, Sessa G, Barash I, Manulis-Sasson S (2010). Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 3: 252-261
- Chen F, Li Q, Sun L, He Z (2006). The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. *DNA Res* 13: 53–63
- Chen ZY, Brown RL, Damann KE, Cleveland TE (2007). Identification of maize kernel endosperm proteins associated with resistance to aflatoxin contamination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 97: 1094-1103
- Cheng LB, Li SY, Yang GX, Jing XM, He GY, Mones NG (2010). Overexpression of soybean (*Glycine max* (L.) Meer.) L34 gene leads to reduced survival to cold stress in transgenic Arabidopsis. *Plant Mol Biol Rep* 28:41–48
- Cheong YH, Chang HS, Gupta R, Wang X, Zhu T, Luan S (2002). Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* 129: 661–677
- Chevalier D, Morris ER, Walker JC (2009). 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions. *Annu Rev Plant Biol* 60: 67–91
- Choi HW, Jin Kim Y, Lee SH, Hong JK, Hwang BK (2007). Hydrogen peroxide generation by the pepper extracellular peroxidase CaPO₂ activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiol* 145: 890–904
- Coaker GL, Willard B, Kinter M, Stockinger EJ, Francis DM (2004). Proteomic analysis of resistance mediated by Rcm 2.0 and Rcm 5.1, two loci controlling resistance to bacterial canker of tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 1019–1028.
- Cummings HS, Hershey JW (1994). Translation initiation factor IF1 is essential for cell viability in *Escherichia coli*. *Bacteriol* 176: 198-205
- Dangl JL y McDowell JM (2006). Two modes of pathogen recognition by plants. *PNAS* 103:8575–8576
- Dangl JL, Jones JDG (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-33
- Davenport R (2002). Glutamate receptors in plants. *Ann of Bot* 90: 549-557

- Davies DR, Bindschedler LV, Strickland TS, Bolwe GP (2006). Production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures in response to an elicitor from *Fusarium oxysporum*: implications for basal resistance. *J Exp Bot* 57: 1817–1827
- De Jong CF, Takken FLW, Cai X, De Wit PJGM, Joosten MHAJ (2002). Attenuation of Cf-mediated defense responses at elevated temperatures correlates with a decrease in elicitor-binding sites. *Mol Plant Microbe Interact* 15:1040-1049
- De Paepe A, Vuylsteke M, Van Hummelen P, Zabeau M, Van Der Straeten D (2004). Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant J* 39:537–559
- Demetriou K, Kapazoglou A, Bladenopoulos K, Tsaftaris AS (2010). Epigenetic chromatin modifiers in barley: II. Characterization and expression analysis of the HDA1 family of barley histone deacetylases during development and in response to jasmonic acid. *Plant Mol Biol Rep* 28:9–21
- Desender S, Andrivon D, Val F (2007). Activation of defense reactions in *Solanaceae*: where is the specificity? *Cell Microbiol* 9: 21–30.
- Dessi P, Rudhe C, Glaser E (2000). Studies on the topology of the protein import channel in relation to the plant mitochondrial processing peptidase integrated into the cytochrome bc1 complex. *The Plant J* 24: 637-644
- DeYoung BJ, Innes RW (2006). Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nature Immunol* 7: 1243-1249
- Diaz-Vivancos P, Clemente-Moreno MJ, Rubio M, Olmos E (2008). Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to plum pox virus. *J Exp Bot* 59: 2147–2160
- Ditt R, Nester EW, Comai L (2001). Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *PNAS* 18: 10954-10959
- Dixon RA (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847
- Dong W, Nowara D, Schweizer P (2006). Protein polyubiquitination plays a role in basal host resistance of barley. *Plant Cell* 18: 3321–3331.
- Donson J, Fang Y, Espiritu-Santo G, Xing W, Salazar A, Miyamoto S, Armendarez V y Volkmuth W (2002). Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol Biol* 48: 75–97
- Dreier J, Meletzus D, Eichenlaub R (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 195-206.

- Du L, Ali GS, Simons KA, Hou J, Yang T, Reddy ASN, Poovaiah BW (2009). Ca^{2+} /calmodulin regulates salicylic-acid-mediated plant immunity. *Nature* 457: 1154-1158
- Durrant WE, Rowland O, Piedras P, Hammond-Kosack KE, Johnes JD (2000). cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12: 963-977
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *PNAS* 95: 14863-14868
- Espinoza C, Medina C, Somerville S, Arce-Johnson P (2007). Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 58: 3197-3212
- Flor HH (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9: 275-296
- Fofana B, Banks TW, McCallum B, Strelkov SE, Cloutier S (2007). Temporal gene expression profiling of the wheat leaf rust pathosystem using cDNA microarray reveals differences in compatible and incompatible defense pathways. *Int J Plant Genomics* 2007: 1-13
- Forde BG, Lea PJ (2007). Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. *J Exp Bot* 58: 2339-2358
- Francis DM, Kabelka E, Bell J, Franchino B, St. Clair D (2001). Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Dis* 85: 1171-1176
- Fu H, Doelling JH, Arendt CS, Hochstrasser M, Vierstra RD (1998). Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 149: 677-692
- Gabriëls SHEJ, Takken FLW, Vossen JH, de Jong CF, Liu Q, Turk SCHJ, Wachowski LK, Peters J, Witsenboer HMA, de Wit PJGM, Joosten MHAJ (2005). cDNA-AFLP combined with functional analysis reveals novel genes involved in the hypersensitive response. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 567-576
- Gachomo EW, Shonukan OO, Kotchoni SO (2003). The molecular initiation and subsequent acquisition of disease resistance in plants. *African J Biotech* 2: 26-32
- Gartemann KH, Abt B, Bekel T, Burger A, Engemann J, Flügel M, Gaigalat L, Goesmann A, Gräfen I, Kalinowski J, Kaup O, Kirchner O, Krause L, Linke B, McHardy A, Meyer F, Pohle S, Rückert C, Schneiker S, Zellermann EM, Pühler A, Eichenlaub R, Kaiser O, Bartels D (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp.

- michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J Bacteriol* 190: 2138-49
- Gartemann KH, Kirchner O, Engemann J, Gräfen I, Eichenlaub R, Burger A (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *J Biotechnol* 106: 179-191
- Glaser E, Dessi P (1999). Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome *bc1* complex in plants. *J Bioenerg and Biomembr* 31:259-274
- Godoy AV, Zanettia ME, Segundo BS, Casalongue C (2001). Identification of a putative *Solanum tuberosum* transcriptional coactivator up-regulated in potato tubers by *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* infection and wounding. *Physiol Plant* 112: 217-222
- González-Mendoza D (2007). El complejo enzimático citocromo p450 en las plantas. *Rev Int Contam Ambient* 23: 177-183
- Goodman CD, Casati P, Walbot V (2004). A multidrug resistance-associated protein involved in nithocyanin transport in *Zea mays*. *The Plant Cell* 16: 1812-1826
- Goossens A, Häkkinen ST, Laakso I, T nen-Laakso S, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Söderlund H, Zabeau M, Inze D, Oksman-Caldentey KM (2003). A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci* 100: 8595-8600
- Greenberg JT (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 525-545
- Grennan AK (2006). Plant Response to Bacterial Pathogens. Overlap between Innate and Gene-for-Gene Defense Response. *Plant Physiology* 142: 809-811
- Grosshans H, Deinert K, Hurt E, Simos G (2001). Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export. *J Cell Biol* 153: 745-762
- Gutterson N, Reuber TL (2004). Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 7:465-71.
- Hammond-Kosack KE, Parker JE (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol* 14: 177-193

- Hanton SL, Matheson LA, Chatre L, Brandizzi F (2009). Dynamic organization of COPII coat proteins at endoplasmic reticulum export sites in plant cells. *The Plant J* 57: 963–974
- Heim MA, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, Bailey PC (2003). The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol. Biol. Evol.* 20: 735–747
- Hirose T, Ideuea T, Wakasugib T, Sugiura M (1999). The chloroplast *infA* gene with a functional UUG initiation codon. *FEBS Letters* 445: 169-172
- Hogenhout SA, Loria R (2008). Virulence mechanisms of Gram-positive plant pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol* 11: 449–56.
- Hogenhout SA, Van der Hoorn RAL, Terauchi R, Kamoun S (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Inter* 22: 115-122
- Howell KA, Cheng K, Murcha MW, Jenkin LE, Millar AH, Whelan J (2007). Oxygen initiation of respiration and mitochondrial biogenesis in rice. *J Biol Chem* 282: 15619–15631
- Hua X, Songa F, Zheng Z (2006). Molecular characterization and expression analysis of a rice protein phosphatase 2C gene, *OsBIPP2C1*, and overexpression in transgenic tobacco conferred enhanced disease resistance and abiotic tolerance. *Physiol Plant* 127: 225–236
- Hückelhoven R (2007). Transport and secretion in plant–microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol* 10: 573–579
- Iordachescu M, Imai R (2008). Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *J Integr Plant Biol* 50: 1223–1229
- Jahr H, Bahro R, Burger A, Ahlemeyer J, Eichenlaub R (1999). Interactions between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. *Environ Microbiol* 1: 113-118
- Jahr H, Dreier J, Meletzus D, Bahro R, Eichenlaub R (2000). The endo- β -1,4-glucanase of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for the induction of bacterial wilt of tomato. *Mol Plant Microbe Interac* 13: 703-714
- Jantasuriyarat C, Gowda M, Haller K (2005). Large-scale identification of expressed sequence tags involved in rice and rice blast fungus interaction. *Plant Physiol* 138: 105–115
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B (2000). Direct interaction of resistant gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO J* 19: 4004-4014

- Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA (1991). Compendium of Tomato Diseases. APS Press, St. Paul, MN, USA
- Jones JDG, Dangl JL (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- Kabelka E, Franchino B, Francis DM (2002). Two loci from *Lycopersicon hirsutum* LA407 confer resistance to strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 92:504-510.
- Kachroo A, Kachroo P (2009). Fatty acid–derived signals in plant defense. *Ann Rev Phytopath* 47: 153-176
- Kachroo P, Venugopal SC, Navarre DA, Lapchyk L, Kachroo A (2005). Role of salicylic acid and fatty acid desaturation pathways in ssi2- mediated signaling. *Plant Physiol.* 139: 1717-1735.
- Kang CH, Jung WY, Kang YH, Kim JY, Kim DG, Jeong JC, Baek DW, Jin JB, Lee JY, Kim MO, Chung WS, Mengiste T, Koiwa H, Kwak SS, Bahk JD, Lee SY, Nam JS, Yun DJ, Cho MJ (2006). AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants. *Cell Death Differ* 13: 84–95
- Kaup O, Gräfen I, Zelleremann EM, Eichenlaub R, Gartemann KH (2005). Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 1090–1098
- Kawasaki T, Henmi K, Ono E, Hatakeyama S, Iwano M, Satoh H, Shimamoto K (1999). The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10922–10926
- Kibbe WA (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 35: 43- 46
- Klein M, Burla B, Martinoia E (2006). The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Letters* 580: 1112–1122
- Kleitman F, Barash I, Burger A, Iraki N, Falah Y, Sessa G, Weinthal D, Chalupowicz L, Gartemann KH, Eichenlaub R, Manulis-Sasso S (2008). Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *Eur J Plant Pathol* 121: 463–475
- Kotchoni SO, Gachomo EW (2006). The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *J Biosci* 31: 389–404
- Kwon C, Bednarek P, Schulze-Lefert P (2008). Secretory pathways in plant immune responses. *Plant Physiol* 147: 1575–1583

- Landau A, Díaz Paleo A, Civitillo R, Jauregualzo M, Prina AR (2007). Two *infA* gene mutations independently originated from a mutator genotype in barley. *J Hered.* 98: 272-276.
- Leng X, Xiao B, Wang S, Gui Y, Wang Y, Lu X, Xie J, Li Y, Fan L (2010) Identification of NBS-type resistance gene homologs in tobacco genome. *Plant Mol Biol Rep* 28:152–161
- Lequeu J, Simon-Plasa F, Fromentina J, Etienneb P, Petitotc AS, Bleina JP, Suty L (2005). Proteasome comprising a b1 inducible subunit acts as a negative regulator of NADPH oxidase during elicitation of plant defense reactions. *FEBS Letters* 579: 4879–4886
- Li J, Brader G, Palva ET (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *The Plant Cell* 16: 319–331
- Li J, Brader G, Kariola T, Palva ET (2006). WRKY70 modulates the selection of signaling pathways in plant defense. *The Plant J* 46: 477–491
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25: 402–408
- Lund S, Stall RE, Klee HJ (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *The Plant Cell* 10: 371-382
- Mao C, Yi K, Yang L, Zheng B, Wu Y, Liu F, Wu P (2004). Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. *J Exp Bot* 55: 137–143
- Mayfield JD, Folta KM, Paul AL, Ferl RJ (2007). The 14-3-3 proteins μ and ν influence transition to flowering and early phytochrome response. *Plant Physiol* 145: 1692–1702
- Mayfield S, Rahire M, Rank G, Zuber H, Rochaix JD (1987). Expression of the nuclear gene encoding oxygen-evolving enhancer protein 2 is required for high levels of photosynthetic oxygen evolution in *Chlamydomonas reinhardtii* (photosystem II/thylakoid membrane/transit peptide). *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 749-753
- McDowell JM, Woffenden BJ (2003). Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends Biotechnol* 21:178-183
- Meletzus D, Bermphol A, Dreier J, Eichenlaub R (1993). Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *J Bacteriol* 175: 2131-2136

- Meng X, Li F, Liu C, Zhang C, Wu Z, Chen Y (2010) Isolation and characterization of an ERF transcription factor gene from cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Plant Mol Biol Rep* 28:176–183
- Meyer K, Leube MP, Gril EI (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 264: 1452-1455
- Miller JD, Arteca RN, Pell EJ (1999). Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 120: 1015–1023
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-498
- Mole BM, Baltrus DA, Dangl JL, Grant SR (2007). Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends Microbiol* 15: 363-71
- Mosolov VV, Valueva TA (2006). Participation of proteolytic enzymes in the interaction of plants with phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry* 71: 838-845.
- Morandini P, Valera M, Albumi C, Bonza MC, Giacometti S, Ravera G, Murgia I, Soave C, Ida De Micheli M (2002). A novel interaction partner for the C-terminus of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane H⁺-ATPase (AHA1 isoform): site and mechanism of action on H⁺-ATPase activity differ from those of 14-3-3 proteins. *The Plant J* 31: 487-497
- Muellenborn C, Krause JH, Cerboncini C (2011) Analysis of differential transcript expression reveals time-dependent leaf responses to *Sclerotinia sclerotiorum* in wild and cultivated sunflower. *Plant Mol Biol Rep* 29:597–608
- Mysore KS, D'Ascenzo MD, He X, Martin GB (2003). Overexpression of the disease resistance gene *Pto* in tomato induces gene expression changes similar to immune responses in human and fruitfly. *Plant Physiol* 132: 1901–1912
- Mysore KS, Ryu CM (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci* 9: 97-104
- Nanda AK, Andrio E, Marino D, Pauly N, Dunand C (2010). Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J Integr Plant Biol* 52: 195–204
- Nürnbergger T, Lipka V (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Path* 6:335-345
- O'Donnell PJ, Schmelz E, Block A, Miersch O, Wasternack C, Jones JB, Klee HJ (2003). Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiology* 133: 1181–1189

- Ossowski S, Schwab R, Weigel D (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant J* 53: 674–690
- Perez-Bueno ML, Rahoutei J, Sajnani C, García-Luque I, Baron M (2004). Proteomic analysis of the oxygen evolving complex of photosystem II under biotic stress: studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomic* 4: 418–425
- Petters J, Gobel C, Scheel D, Rosahl S (2002). A pathogen-responsive cDNA from potato encodes a protein with homology to a phosphate starvation-induced phosphatase. *Plant Cell Physiol* 43: 1049-53
- Polesani M, Desario F, Ferrarini A, Zamboni A, Pezzotti M, Kortekamp A, Polverari A (2008). cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics* 9: 142
- Prakash Bolar J, Norelli JL, Wong KW, Hayes CK, Harman GE, Aldwinckle HS (2000). Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* 90:72-77
- Quirino BF, Noh YS, Himelblau E, Amasino RM (2000). Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci* 5: 278–282
- Quirino BF, Normanly J, Amasino RM (1999). Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol Biol* 40: 267–278
- Rea PA (2007). Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol* 58: 347–75
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, -Z C, Jiang, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu GL (2000). Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105–2110.
- Robatzek S, Somssich IE (2002). Targets of *AtWRKY6* regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev* 16: 1139–1149
- Roberts MR, Bowles DJ (1999). Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiology* 119: 1243–1250.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Edited by Humana Press, Totowa, NJ, 2000, 365-386

- Saracco SA, Miller MJ, Kurepa J, Vierstra RD (2007). Genetic analysis of sumoylation in Arabidopsis: conjugation of SUMO1 and 2 to nuclear proteins is essential. *Plant Physiology* 145: 119-134
- Seo S, Okamoto M, Iwai T (2000). Reduced levels of chloroplast FtsH protein in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves accelerate the hypersensitive reaction. *The Plant Cell* 12: 917–932.
- Sestili S, Polverari A, Luongo L, Ferrarini A, Scotton M, Hussain J, Delledonne M, Ficcadenti N, Belisario A (2011). Distinct colonization patterns and cDNA-AFLP transcriptome profiles in compatible and incompatible interactions between melon and different races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *BMC Genomics*. 12: 122
- Setubal J, Moreira LM, da Silva ACR (2005). Bacterial phytopathogens and genome science. *Curr Opin Microbiol* 8: 595–600
- Shirsekar G, Dai L, Hu Y, Wang X, Zeng L, Wang GL (2010). Role of ubiquitination in plant innate immunity and pathogen virulence. *J Plant Biol* 53: 10–18
- Shintani' D, Roesler K, Shorrosh B, Savage L, Ohlrogge J (1997). Antisense repression and overexpression of biotin carboxylase in tobacco leaves. *Plant Physiol* 114: 881-886
- Stacy RAP, Nordeng TW (1999). The dormancy-related peroxiredoxin antioxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *The Plant J* 19:1-8
- Stork I, Gartemann KH, Burger A, Eichenlaub R (2008). A family of serine proteases of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* chpC plays a role in colonization of the host plant tomato. *Mol Plant Pathol* 51: 149–154
- Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, Trombik T, Vanham D, Boutry M (2005). NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiol* 139: 341–352
- Suzuki N, Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Mittler R (2005). Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor 1c1. *Plant Physiol* 139: 1313–1322
- Swiatek A, Azmi A, Witters E, Onckelen HV (2003). Stress messengers jasmonic acid and abscisic acid negatively regulate plant cell cycle. *Bulg. J. Plant Physiol (special issue)* 172–178
- Takemoto D, Hardham AR (2004). The cytoskeleton as a regulator and target of biotic interactions in plants. *Plant Physiol* 136: 3864–3876

- Takemoto D, Jones D, Hardham A (2006). Re-organization of the cytoskeleton and endoplasmic reticulum in the *Arabidopsis* pen1-1 mutant inoculated with the non-adapted powdery mildew pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*. *Mol Plant Pathol* 7: 553–563
- Vallad GE, Goodman RM (2004). Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci* 44: 1920–1934
- van Heusden AW, Koornneef M, Voorrips RE, Brüggemann W, Pet G, Vrielink-van Ginkel R, Chen X, Lindhout P (1999). Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theor Appl Genet* 99: 1068–1074
- Van Loon LC, Geraats BPJ, Linthorst HJM (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant* 11: 184-191
- Vandenabeele S, Van Der Kelen K, Dat J, Gadjev I, Boonefaes T, Morsa S, Rottiers P, Slooten L, Van Montagu M, Zabeau M, Inzé D, Van Breusegem F (2003). A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. *Proc Natl Acad Sci* 26: 16113–16118
- Ventelon-Debout M, Tranchant-Dubreuil C, Nguyen TTH, Bangratz M, Siré C, Delseny M, Brugidou C (2008). Rice Yellow Mottle Virus stress responsive genes from susceptible and tolerant rice genotypes. *BMC Genomics* 8: 26
- Viotti C, Luoni L, Morandini P, Ida De Michelis M (2005). Characterization of the interaction between the plasma membrane H⁺-ATPase of *Arabidopsis thaliana* and a novel interactor (PPI1). *FEBS Journal* 272: 5864–5871
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407–4414.
- Vuylsteke M, Daele H, Vercauteren A, Zabeau M, Kuiper M (2006). Genetic dissection of transcriptional regulation by cDNA-AFLP. *Plant J.* 45: 439–446
- Vuylsteke M, Peleman JD, van Eijk MJT (2007). AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nat Protoc* 2: 1399-1413
- Wan J, Dunning FM, Bent AF (2002). Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Funct Integr Genomics* 2: 259–273
- Wang J, Hou B (2009). Glycosyltransferases: key players involved in the modification of plant secondary metabolites *Front. Biol. China* 2009, 4(1): 39–46
- Wang L, Tsuda K, Sato M, Cohen JD, Katagiri F, Glazebrook J (2009). *Arabidopsis* CaM Binding Protein CBP60g contributes to MAMP-Induced SA

- accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. PLoS Pathogens 5: 1-14
- Wang X, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang C, Liu B, Qu Z, Zhao J, Han Q, Huang L, Chen X, Kang Z (2009). cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striiformis f. sp. tritici*. BMC Genomics 10: 289
- Weaver LM, Gan S, Quirino B, Amasino RM (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. Plant Mol Biol 37: 455–469
- Wittmann J, Eichenlaub R, Dreiseikelmann B (2010). The endolysins of bacteriophages CMP1 and CN77 are specific for the lysis of *Clavibacter michiganensis* strains. Microbiol 156: 2366-2373
- Wu Q, Liu T, Liu H, Zheng G (2009). Unsaturated fatty acid: Metabolism, synthesis and gene regulation. Afr J Biotechnol 8:1782-1785
- Xu X, Miller SA, Baysal-Gurel F, Gartemann KH, Eichenlaub R, Rajashekara G (2010). Bioluminescent imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. Appl Environ Microbiol 12: 3978-88
- Yamaguchi T, Yamada A, Hong N, Ogawa T, Ishii T, Shibuya N (2000). Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: beta-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension cultured rice cells. Plant Cell 12: 817-26
- Zaninotto F, La Camera S, Polverari A, Delledonne M (2006). Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. Plant Physiol 141: 379–383
- Zhang H, Hu Y, Wang C, Ji W (2011) Gene expression in wheat induced by inoculation with *Puccinia striiformis* west. Plant Mol Biol Rep 29:458–465
- Zhoua J, Lia F, Wang J, Maa Y, Chonga K, Xua Y (2009). Basic helix-loop-helix transcription factor from wild rice (OrbHLH2) improves tolerance to salt- and osmotic stress in Arabidopsis. J Plant Physiol 166: 1296-306
- Zou J, Rodriguez-Zas R, Aldea M (2005). Expression profiling soybean response to *Pseudomonas syringae* reveals new defense-related genes and rapid HR-specific downregulation of photosynthesis. Mol Plant Microbe Interact 18: 1161–1174

11. ANEXO I. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO.

11.1 Análisis bibliográfico de UniGenes diferencialmente expresados en *S. peruvianum* LA2157

gb|EEF35920.1| protein transport protein sec23, putative [*Ricinus communis*]

TRANSPORTE

Sec23 es una proteína que forma parte del complejo proteico COPII, formado por las proteínas Sar1, Sec23/24 y Sec13/31. Este complejo participa en la exportación de proteínas de secreción en sitios especializados llamados ERES (ER export sites) localizados en el retículo endoplásmico (ER). Estudios recientes han revelado la existencia de una maquinaria de secreción que se activa en las respuestas de defensa extracelulares. La mayoría de los fitopatógenos se mantienen en el espacio intercelular (apoplasto), o entran al interior de los órganos a través de aperturas naturales como los estomas, por lo que las plantas deben contar con mecanismos de defensa que les permitan detener los intentos de colonización extracelular del patógeno, lo que indica la existencia de una respuesta de defensa en el apoplasto. Esta defensa consiste en la secreción de un cocktail de compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular y proteínas relacionadas a patogénesis (PR) (Kwon y col., 2008; Hanton y col., 2009).

gb|AAD33072.1|AF149251_1 secretory peroxidase [*Nicotiana tabacum*]

DEFENSA

Una de las respuestas de defensa más rápidas en activarse contra el ataque de un patógeno es el metabolismo oxidativo, que da lugar a la producción transitoria de especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluyen el radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (-OH). Las enzimas involucradas en la generación de ROS son la NADPH oxidasa localizada en la membrana plasmática y las peroxidasas de pared celular, que desencadenan el metabolismo oxidativo apoplástico como una medida para impedir la colonización del patógeno, el cual resulta ser un paso temprano durante las respuestas de resistencia basal. Existe evidencia de que el H_2O_2 actúa como un segundo mensajero intracelular e intercelular para la inducción sistémica de genes de defensa en plantas. Lo que pone de manifiesto la

importancia de la maquinaria de secreción en la resistencia basal (Davies, y col., 2006; Choi y col., 2007).

gb|EEF34729.1| trehalose-6-phosphate synthase, putative [*Ricinus communis*]

DEFENSA

La trehalosa es un disacárido no reductor presente en diversos organismos desde bacterias, hongos hasta invertebrados. Su función es como fuente de energía, osmolito y protector de membranas y proteínas. En plantas se ha asociado a la tolerancia a ciertos tipos de estrés abiótico como la alta salinidad, frío, calor y sequía (Iordachescu y Imai, 2008).

NM_128064.2 *Arabidopsis thaliana* protein phosphatase 2C

SEÑALIZACIÓN

La defosforilación y fosforilación de proteínas, que es un proceso mediado por fosfatasas y cinasas, tiene un papel esencial en las redes de transducción de señales en plantas. Diversos estudios han mostrado que la fosfatasa 2C (PP2C) está implicada en el desarrollo y en la señalización mediada por ácido abscísico (ABA) (Meyer y col., 1994). Por otro lado, plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen OsBIPP2C1, una PP2C de arroz, mostraron un incremento en la resistencia al virus del mosaico del tabaco y a *Phytophthora parasitica*; y también mostraron un incremento en la tolerancia a estrés salino y osmótico, lo que pone de manifiesto un papel importante de la PP2C en las rutas de defensa en estrés biótico y abiótico (Hua y col., 2006).

AF347664.1 *Lycopersicon esculentum* translation initiation factor IF1 (infA) mRNA (*Amborella trichopoda*)

TRADUCCIÓN

El factor de iniciación de la traducción IF1 es un elemento conservado en el aparato de traducción en procariotes. Se ha demostrado que IF1 es esencial para la viabilidad celular en *E. coli*, lo que sugiere que una o más de sus funciones son cruciales para la célula procariote (Cummings y Hershey, 1994). Los cloroplastos poseen su propio genoma y su propia maquinaria de traducción. La maquinaria basal de traducción es estructuralmente similar a procariotes, por lo que la evidencia sugiere que los mecanismos de traducción son similares a *E. coli*. Dentro de los factores solubles de traducción solo el IF1

es codificado por el genoma del cloroplasto (Hirose y col. 1999). Los mutantes de clorofila CL2 y CL2-like de cebada son mutantes del gene *infA*, que codifica a IF1, y son los únicos mutantes que presentan un fenotipo atribuido al gen *infA* en plantas superiores (Landau y col., 2007).

sp|P32980.1 ATP synthase delta chain, chloroplastic
ref|NP_001148439.1 chlorophyll a-b binding protein 2
ENERGÍA/FOTOSÍNTESIS.

Existen dos hipótesis acerca de la relación entre la fotosíntesis y las respuestas de defensa. La primera indica que es razonable asumir que la fotosíntesis podría incrementar el aporte de carbono y energía para soportar las intensas respuestas de defensa. Por otro lado, con una tasa fotosintética baja durante las respuestas de defensa, las actividades celulares no indispensables serían minimizadas mientras que la producción de compuestos antimicrobianos sería la prioridad, hasta el momento en que el fitopatógeno sea detenido. Una reducción de la tasa fotosintética podría proteger al aparato fotosintético del daño oxidativo, o ser consecuencia de daño oxidativo; sin embargo, esta reducción de la tasa fotosintética en las respuestas de defensa, ocurre típicamente en el área localizada cerca del punto de infección (Bolton, 2009).

gb|AAK52801.1| Calcium-dependent protein kinase CDPK1
SEÑALIZACIÓN

El Calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero ubicuo en la transducción de señales en eucariotes. En plantas, los niveles de Ca^{2+} intracelular son modulados por diversas señales, entre ellas el estrés biótico. Evidencia reciente sugiere la participación del Ca^{2+} intracelular en la ruta de señalización mediada por *Cf-9* (un gen R) y en el establecimiento de la HR, cuando interacciona con su correspondiente producto del gen *Avr9*, durante la interacción incompatible jitomate-*Cladosporium fulvum*; además las CDPK pueden ser responsables de cambios en la concentración de los iones H^+ , debido a los cambios de fosforilación/defosforilación de ATPasas de membrana (Cheong y col., 2002).

gb|AAO66472.1| biotin carboxylase carrier protein
METABOLISMO

La proteína biotin carboxilasa acarreadora forma parte del complejo enzimático heteromérico plastídico acetil-coenzima A carboxilasa (ACCase), involucrado en la regulación de la síntesis de ácidos grasos (FA) (Shintani y col. 1997). Históricamente, los papeles de los ácidos grasos en las respuestas de defensa eran asociados a la biosíntesis de precursores de la cutícula o la biosíntesis de la fitohormona jasmonato, sin embargo, nueva evidencia indica un papel directo de los FA (particularmente los de 16 y 18 carbonos) y sus subproductos en la inducción de defensas basales y resistencia sistémica (Kachroo y Kachroo 2009).

gb|EEH50839.1| senescence-associated protein

METABOLISMO

La senescencia es el proceso degenerativo que da lugar a la eventual muerte del tejido; este proceso es altamente regulado e involucra un declive en la actividad fotosintética, degradación de proteínas, peroxidación de lípidos y degradación de la clorofila. Las ROS, tienen un papel crítico en el curso natural de la senescencia, ya que la peroxidación de lípidos es una fuente natural de ROS. El curso natural que se ha propuesto es que los lípidos de la membrana son hidrolizados por enzimas como la fosfolipasa D, causando la liberación de ácidos grasos libres; la peroxidación de los ácidos grasos libres es llevada a cabo por la lipoxigenasa o por los radicales libres, lo que da lugar a un incremento en la producción de ROS y en los niveles de etileno y la aceleración de la senescencia (Bhattacharjee, 2005). La senescencia natural depende de la edad de la planta y de su fase reproductiva, sin embargo otros factores externos como deficiencia de nutrientes, el ataque de un patógeno, limitación de luz, ozono y temperatura pueden inducir una senescencia prematura (Weaver y col., 1998; Miller y col., 1999).

gb|ACG60665.1| basic helix-loop-helix protein

METABOLISMO

Las proteínas básica hélix-loop-helix, son factores de transcripción diméricos localizados en eucariotes, en animales tienen funciones en el desarrollo embrionario. En plantas, aunque se sabe poco de estos factores de transcripción, se ha asociado con el desarrollo de tejidos y en la tolerancia a estrés salino y osmótico, lo cual sugiere que estos factores de transcripción

actúan positivamente en la compleja red de señalización (Heim y col., 2003; Zhou y col., 2009).

gb|ACC68681.1| vacuolar processing enzyme 2

METABOLISMO

Las plantas utilizan una serie de proteinasas intracelulares y extracelulares como defensa contra la infección de algún fitopatógeno; entre éstas, las enzimas de procesamiento vacuolar (vacuolar processing enzymes, VEP) tienen un papel especial, ya que llevan a cabo la función de caspasas en la célula vegetal. De acuerdo con este modelo, la activación de las VEP por la interacción con un fitopatógeno, desencadena la activación de hidrolasas localizadas en vacuolas, como proteinasas, nucleasas, lipasas. Lo que da lugar a la destrucción del tonoplasto y la rápida degradación del contenido intracelular, y por último la muerte celular, lo que en conjunto se conoce como muerte celular programada; la cual tiene una estrecha relación con la respuesta hipersensible (Mosolov y Valueva, 2006).

11.2. Análisis bibliográfico de UniGenes diferencialmente expresados en *S. peruvianum* LA2172

NM_115007.3 Arabidopsis thaliana ATGLR3.5 (GLUTAMATE RECEPTOR 6)

SEÑALIZACIÓN

Los receptores de glutamato actúan en animales como canales catiónicos no selectivos dependientes de glutamato, se han identificado en genomas de plantas numerosos genes del tipo receptores de glutamato con una actividad de canal iónico no selectivo y una actividad de receptor ligando. Los canales iónicos no selectivos son ubicuos en las membranas plasmáticas de células vegetales, con diversas funciones como asimilación de nutrientes y señalización (Davenport, 2002). La señalización por glutamato en meristemas apicales de raíz en plantas, forma parte de una red compleja de rutas de señalización de nitrógeno (N) que dispone a la planta para monitorear y adaptarse a los cambios en los niveles y aporte de N (Forde y Lea, 2007).

ATU43377.1 Arabidopsis thaliana similar to GTP-binding protein

SEÑALIZACIÓN

Las proteínas de unión a GTP están involucradas en la transducción de señales durante el procesamiento de un estímulo extracelular, en el caso de los mecanismos de defensa, las proteínas de unión a GTP participan en la regulación de la producción de las especies reactivas de oxígeno y en la muerte celular que implica una compleja red con una delicada regulación de múltiples factores de transcripción, citocininas y SA (Kawasaki y col., 1999).

**gb|ABC01888.1| 40S ribosomal protein-like protein [*Solanum tuberosum*]
 EU161982.1 25S ribosomal RNA gene *Solanum lycopersicum***

TRADUCCIÓN

La regulación masiva transcripcional de genes relacionados de defensa en tomate para desarrollar las respuestas de resistencia, entre ellas la respuesta hipersensible (HR) requiere un incremento similar en la maquinaria de traducción; además, la síntesis *de novo* de proteínas es esencial en la activación de las respuestas de defensa (Greenberg 1997; Cai y col., 2001; de Jong y col., 2002; Gábriels y col., 2005).

ref|NP_564149.1| PBC1 (20S proteasome beta subunit C1); peptidase [*Arabidopsis thaliana*]

METABOLISMO

El proteasoma 20S es un complejo proteolítico en eucariotes responsable de la degradación de proteínas intracelulares anormales o de vida corta, especialmente aquellas conjugadas con ubiquitina. En plantas, se ha asociado con ciclo celular, diferenciación celular, senescencia y en las respuestas de defensa. En relación a esto, la inducción de la subunidad b del proteasoma 20S se ha asociado con el establecimiento de SAR en plantas y como un regulador negativo de la NADPH oxidasa, y contribuye a la regulación en la generación de ROS durante las primeras etapas de las respuestas de resistencia (Fu y col., 1998; Lequeu y col., 2005).

emb|CAE45567.1| SUMO E2 conjugating enzyme SCE1 {*Nicotiana benthamiana*}

METABOLISMO

La adición post-traducciona de polipéptidos tipo ubiquitina (SUMO, Small Ubiquitin-like Modifier) a proteínas intracelulares implica una modificación en la función, actividad y localización de la proteína modificada; este proceso está

involucrado en diversos procesos de desarrollo, homeostasis y respuesta al estrés. El mecanismo de SUMO involucra las reacciones de activación por la enzima E1 (SAE1/SAE2) y la de conjugación mediada por la enzima E2 (SCE1). Algunas veces la enzima E3 (SIZ1) participa en el reconocimiento y ligación del objetivo. La función que SUMO puede tener es un efecto directo al modificar la actividad o localización de las proteínas, y puede impactar a una batería de proteínas nucleares regulatorias cuando las plantas están expuestas a algún estrés. Bajo estas circunstancias algunos objetivos potenciales para regulación negativa podrían incluir factores que promueven la división celular u otros procesos fisiológicos que son reprimidos por las plantas en condiciones adversas. Algunos estudios han mostrado una participación del proceso SUMO en patogénesis. En *Arabidopsis*, la evidencia sugiere que SUMO regula negativamente la respuesta basal. En tomate, cuando SUMO es sobreexpresado, la infección por *Trichoderma viridae* es reducida. En plantas de tabaco infectadas con el virus TGMV (Tomato Golden Mosaic Virus) y a su vez sobreexpresando SUMO1, se vió una reducción en la replicación viral, por lo que se sugiere que SUMO reprime factores necesarios para la replicación viral (Saracco y col., 2007; Castillo y col., 2004).

**sp|Q05538.1|CHIC_SOLLC RecName: Full=Basic 30 kDa endochitinase;
Flags: Precursor *Solanum lycopersicum***

DEFENSA

En respuesta a un fitopatógeno la planta activa una variedad de genes que incluyen quitinasas; estas enzimas hidrolizan la quitina presente en la pared celular de hongos. Algunas quitinasas de plantas (arroz, tabaco, canola, tomate) han sido clonadas y sobreexpresadas constitutivamente como una estrategia para incrementar la resistencia a hongos con varios niveles de protección (Prakash Bolar y col., 2000).

dbj|BAA10929.1| cytochrome P450 like_TBP [*Nicotiana tabacum*]

DEFENSA

La familia del CYP450 está involucrada en la síntesis de fenilpropanoides y glucósidos cianogénicos, fitoalexinas, lignina, en la biosíntesis de brasinoesteroides (BR) y en la regulación de los niveles endógenos de los BR en las plantas. También participa en la síntesis de la enzima cinamato-4-

hidrolasa (CH4) que regula la conversión de ácido trans cinámico a ácido p-cumárico, un compuesto fenólico de defensa contra patógenos (Dixon, 2001; González-Mendoza, 2007).

gb|EEH50839.1| senescence-associated protein *Micromonas pusilla* CCMP1545

METABOLISMO

Descrita anteriormente.

gb|EEF35920.1| protein transport protein sec23, putative [*Ricinus communis*]

TRANSPORTE/ SECRECIÓN DE PROTEÍNAS

Descrita anteriormente.

dbj|BAG16520.1| putative multidrug resistance-associated protein [*Capsicum chinense*]

TRANSPORTE

Las proteínas asociadas a resistencia multidrogas (MRP) pertenecen a la familia de las ABC (ATP-binding cassette) proteínas, cuya función principal es la relacionada al transporte de iones, lípidos y péptidos; además de la regulación de canales iónicos. En algunos casos, las plantas producen muchos metabolitos que deben ser removidos del citoplasma, a través de los transportadores ABC para prevenir daño celular. La característica de estos transportadores son que utilizan MgATP como fuente de energía y no ATP libre, el mecanismo de transporte es independiente del potencial eléctrico de la membrana y es dependiente del vanadato. Existen varias subfamilias de transportadores ABC dependiendo de su tamaño, orientación y dominios transmembranales; entre las cuales las proteínas MRP participan en la regulación de estomas (Rea, 2007), y son esenciales en el secuestro vacuolar de compuestos endógenos como las antocianinas (Goodman y col., 2004) y flavonas glicosiladas como 2-O- D-glucosa conjugado del ácido salicílico, quien participa en la señalización durante la resistencia sistémica adquirida (SAR) y en la respuesta hipersensible durante la interacción planta patógeno (Klein y col., 2006): y en el transporte de xenobióticos que son susceptibles a conjugación con glutatión (GSH).

sp|P23322.2|PSBO_SOLLC RecName: Full=Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplastic**ENERGÍA**

El complejo fotosintético de evolución de oxígeno (oxygen-evolving complex OEC) es la enzima en plantas verdes que participa en el uso de fuertes oxidantes producidos en la luz para oxidar agua formando oxígeno molecular como subproducto. La evolución del oxígeno es una reacción lineal de oxidación de 4 electrones (Ghanot-Akis y Yocum, 1990). Este complejo se encuentra unido al centro de reacción del complejo fotosistema II (PSII) en la membrana interna del tilacoide del cloroplasto (Hashimoto y col., 1997). El polipéptido potenciador de la evolución de oxígeno (oxygen-evolving enhancer OEE) se ha identificado como una subunidad del complejo PSII y es el sitio de la evolución del oxígeno en plantas superiores y algas (Mayfield y col., 1987). En chícharo (*Pea sativa*), se observaron alteraciones en el metabolismo del cloroplasto, como una respuesta temprana a la infección del virus PPV (Plux Pox Virus); también se observó un decremento en RUBISCO y OEE mientras la enfermedad se desarrollaba, lo que sugiere que los síntomas de la enfermedad de Sharka provocada por PPV en chícharo es debido a un desbalance de los sistemas antioxidantes de la célula y a un incremento en las especies reactivas de oxígeno, lo que sugiere que los cloroplastos son fuente de un estrés oxidativo durante la infección del virus PPV (Díaz-Vivancos y col., 2008). Se ha reportado que el daño a la actividad de OEE en plantas infectadas por virus puede resultar en un incremento en la acumulación viral (Perez-Bueno y col., 2004). En células de mesófilo de *Asparagus sprengeri*, la inducción de la respuesta hipersensible por mastoparan resultó en cambios en la fotosíntesis, la evolución de oxígeno cesó por la ruptura del PSII y el transporte de electrones y la fotosíntesis fueron eventualmente inhibidas durante la HR inducida por mastoparan (Allen y col., 1999).

gb|AAA34192.1| ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, small subunit precursor (*Solanum lycopersicum*).**gb|AAA34192.1| ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, small subunit precursor.****ENERGÍA**

Rubisco es la principal fuente de producción de energía para la célula vegetal, generando ATP y potencial reductor (NADPH) mediante la fotosíntesis. En la interacción compatible de chícharo con el virus PPV, existe una disminución de la cantidad de Rubisco, lo que implica un desbalance de los sistemas oxidativos de la célula. Una disminución de Rubisco implica también una disminución en la fijación de CO₂ y por consiguiente una disminución en los niveles de NADPH, el mayor aceptor de electrones del fotosistema I (PSI) (Diaz-Vivancos y col., 2008); también se ha reportado una regulación diferencial de Rubisco en la interacción entre el trigo y el hongo *Puccinia triticina* (Fofana y col., 2007). Lo que indica que la inhibición del transporte de electrones y la fotosíntesis pueden ser parte de un mecanismo de defensa en una interacción incompatible (Allen y col., 1999).

emb|CAB43882.1| proton pump interactor [*Arabidopsis thaliana*]

ENERGÍA

Las H⁺-ATPasas de membrana plasmática (PM H⁺-ATPase) son esenciales para establecer un gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática; lo que es esencial en múltiples procesos como la importación y exportación de solutos, homeostasis de pH y crecimiento celular. La actividad de las PM H⁺-ATPasas se ve influenciada por distintas señales como hormonas, luz, potencial hídrico y patógenos. La proteína interactora de la bomba de protones PPI1 (proton pump interactor) es una proteína que puede modular la actividad de PM H⁺-ATPase en un intento por mantener la integridad celular (Morandini y col., 2002; Viotti y col., 2005; Anzi y col., 2008).

gb|EEF42045.1| amino acid binding protein, putative

METABOLISMO

El nitrógeno inorgánico es asimilado por las plantas en los aminoácidos glutamina, glutamato, asparagina y aspartato, sin embargo, en respuesta a una infección, la demanda de fuentes de carbono moviliza los aminoácidos hacia rutas generadoras de energía como la de los ácidos tricarboxílicos (TCA), ya que los 20 aminoácidos pueden ser metabolizados a intermediarios, como α -ketoglutarato, acetoacetato, acetyl-CoA, fumarato, oxaloacetato, piruvato, y succinyl-CoA. Por otro lado, el nitrógeno puede participar directamente en las respuestas de defensa a como óxido nítrico (NO), que puede ser tóxico para

los fitopatógenos invasores, afectar el balance redox celular, y junto con las especies reactivas de oxígeno (ROS) desencadenar la respuesta hipersensible (HR) (Bolton, 2009).

ref|XP_002310574.1| AP2/ERF domain-containing transcription factor

SEÑALIZACIÓN

Los factores de transcripción AP2/ERF son conocidos por regular diversos procesos del desarrollo y respuestas a estrés en plantas. Los factores de transcripción ERF integran rutas de señalización, como las rutas de transducción de señales de etileno (ET) y ácido salicílico (SA). La señalización por SA puede ser antagónica con la señalización por ET/JA (jasmonato), mientras que algunos ERF pueden ser inducidos por SA, ET y JA. Estos resultados indican que los ERF logran integrar las rutas de SA y ET/JA, para modular las respuestas de defensa apropiadamente durante el proceso de infección de un fitopatógeno. La sobreexpresión en plantas de algunos ERF ha conferido resistencia a múltiples patógenos bacterianos y fúngicos. Un análisis filogenético de estos genes, con un enfoque en *Arabidopsis*, arroz y tomate, sugiere que a pesar de su amplia conservación de función en monocotiledóneas y dicotiledóneas, algunos elementos estructurales les confieren funciones especializadas en cada linaje (Gutterson y Reuber, 2004; Xu y col., 2011).

11.3. Análisis de UniGenes diferencialmente expresados en *S. habrochaites* 2128

gb|EEF35920.1| protein transport protein sec23, putative [*Ricinus communis*]

TRANSPORTE/SECRECIÓN DE PROTEÍNAS

Descrita anteriormente.

ref|YP_001837389.1| photosystem II phosphoprotein PSII [*Guizotia abyssinica*]

ENERGÍA

Se ha sugerido que la reducción de los componentes del PSII y la interrupción de la cadena de transporte de electrones resulta en una fuga de electrones lo que conlleva a la formación de ROS y el establecimiento de un estrés oxidativo,

también es posible que la reducción en los procesos fotosintéticos reduzca la producción de azúcares limitando la fuente de alimento del patógeno (Seo y col., 2000; Jantasuriyarat y col., 2005; Zou y col., 2005; Fofana y col., 2007).

gb|EEH50839.1| senescence-associated protein [*Micromonas pusilla* CCMP1545]

METABOLISMO

Descrita anteriormente.

gb|AAD33072.1|AF149251_1 secretory peroxidase [*Nicotiana tabacum*]

METABOLISMO OXIDATIVO/DEFENSA

Descrita anteriormente.

sp|P93213.2|14338_SOLLC RecName: Full=14-3-3 protein 8

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Todos los procesos biológicos son controlados por una apropiada transducción de señales que implica la fosforilación de proteínas específicas. En varios casos las proteínas fosforiladas deben interactuar con otras proteínas especializadas conocidas como proteínas 14-3-3 de unión a fosfoserina/treonina. Los miembros de la familia de proteínas 14-3-3 representan nodos de integración de una multitud de señales de rutas metabólicas en células eucariotes. Las proteínas 14-3-3 tienen una función ya bien definida en la regulación de H⁺-ATPasas de membrana, y otras enzimas como la enzima nitrato reductasa (NR) y la sacarosa fosfato sintasa (SPS), y tienen una participación en la floración. Además existe evidencia indirecta de que las proteínas 14-3-3 actúan como reguladores de proteínas involucradas en respuestas a estrés biótico y abiótico con funciones en señalización, activación de la transcripción y defensa (Mayfield y col., 2007; Chen y col., 2006; Chevalier, y col., 2009; Roberts y Bowles, 1999).

sp|Q05538.1|CHIC_SOLLC RecName: Full=Basic 30 kDa endochitinase

DEFENSA

Descrita anteriormente.

gb|EEF32044.1| signal recognition particle protein, putative [*Ricinus communis*]

TRANSPORTE

La partícula de reconocimiento de señal (signal recognition particle SRP) es una ribonucleoproteína que reconoce y transporta proteínas secretorias recién sintetizadas específicas al retículo endoplásmico (ER) en eucariotes. SRP se une a la señal hidrofóbica de las proteínas nacientes en el complejo del ribosoma y las dirige al receptor de SRP en la membrana del ER. Subsecuentemente, SRP es liberado y el complejo del ribosoma es entregado al canal de translocación del ER. Por lo que la translocación al interior del ER es simultánea a la traducción (Grosshans y col., 2001).

sp|Q76CU2.1|PDR1_TOBAC RecName: Full=Pleiotropic drug resistance protein 1

METABOLISMO/ DETOXIFICACIÓN

Las proteínas de resistencia a drogas pleiotrópicas (PDR) pertenecen a la familia de las ABC (ATP-binding cassette) transportadores, cuya función principal es la relacionada al transporte de iones, lípidos y péptidos. Las PDR han sido poco caracterizadas, sin embargo existe evidencia que sugiere que en *Nicotiana plumbaginifolia* NpPDR1 tiene un papel importante en las respuestas de defensa a patógenos, particularmente en la secreción de metabolitos relacionados a defensa y que actúan tanto como una barrera constitutiva o inducible, en las respuestas de defensa asociadas a jasmonato (Stukkens y col., 2005).

_gb|ACC66148.3| cell division cycle protein [Dimocarpus longan]

METABOLISMO

El estrés ambiental puede afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas; hormonas como el ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA), y el etileno, que tienen un papel crucial en alterar la morfología de las plantas y en la respuesta ante el estrés. En células BY2 de tabaco, JA y ABA inhibió la replicación del ADN manteniendo a las células en la fase G1 justo antes de la transición G1/S. En *Arabidopsis* el JA inhibió el crecimiento de los meristemas de raíz, lo que indica que estas señales sistémicas que se encuentran elevadas en situaciones de estrés pueden regular negativamente el crecimiento vegetativo. Esto ocurre, posiblemente porque la respuesta de defensa moviliza el metabolismo a diferentes rutas preferencialmente para la

reestructuración de los tejidos dañados que para el crecimiento vegetativo (Swiatek y col., 2003).

dbj|BAA10929.1| cytochrome P450 like_TBP

DEFENSE

Descrita anteriormente

emb|CAK24966.1| chlorophyll a/b binding protein

gb|ACH54085.1| putative chlorophyll b reductase

gb|ABY21255.1| Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit

gb|ABB90047.1| ATP synthase CF1 epsilon chain

ENERGÍA

La relación entre fotosíntesis y respuestas de defensa, fue abordada anteriormente

dbj|BAG80553.1| UDP- glucose:glucosyltransferase

METABOLISMO

Las glicosiltransferasas (GT) catalizan la reacción de una o múltiples glicosilaciones de diferentes metabolitos de la planta. Las moléculas hidroxiladas son los aceptores más comunes, mientras que UDP-Glucosa es el grupo donador más común. Diversos estudios han demostrado un papel de la glicosilación en las respuestas de defensa, la glicosilación de la escopoletina (una hidroxycumarina implicada en el establecimiento de HR), potencia la resistencia a patógenos por mecanismos aún desconocidos; a su vez, las GT permiten la detoxificación de compuestos exógenos, como herbicidas, insecticidas o incluso, efectores microbianos. Además, están involucradas en la biosíntesis de diversos metabolitos secundarios como lignina, flavonoides, monoterpenos y ácidos hidroxibenzoicos (Wang y Hou, 2009).

emb|CAA63432.1| D12 oleate desaturase

METABOLISM

La enzima oleato desaturasa es la enzima clave para la generación de ácido linoleico (18:2) a partir del oleico (18:1), ácidos grasos insaturados que son componentes estructurales de las membranas, los cuales son una fuente potencial de energía y son precursores para la biosíntesis de segundos mensajeros en la transducción de señales durante el crecimiento, desarrollo y

respuestas a estímulos ambientales. En la mutante *ssi* de *Arabidopsis* se demostró que cambios en los niveles del ácido oleico, resultan en la alteración de las respuestas mediadas por SA y JA (Kachroo y col., 2005; Wu y col., 2009).

11.4 Análisis bibliográfico de UniGenes diferencialmente expresados en *S. lycopersicum*

EU161982.1 RNA ribosomal *Solanum lycopersicum*

AF479180.1 26s RNA *Exacum affine*

TRADUCCIÓN

Descrita anteriormente.

gb|AAB37246.1| calmodulin-binding protein *Nicotiana tabacum*

SEÑALIZACIÓN

La señalización por calcio es un aspecto importante de las respuestas de defensa específicas y robustas mediadas por genes R y de las respuestas de defensa amplias y no específicas desencadenadas por la percepción de patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (microbe- or pathogen-associated molecular patterns, MAMPs or PAMPs). Las señales de calcio pueden ser transducidas por la unión de calcio a calmodulina (CaM), una pequeña proteína receptora de calcio. La unión de CaM a diversas proteínas puede modular sus respectivas actividades (Wang y col., 2009). Existe cierto número de proteínas de unión a CaM que son inducibles por patógenos, como la familia CBP60 y AtBAG6 en *Arabidopsis*; lo que sugiere una participación importante en respuestas de defensa (Wang y col., 2009). Existe evidencia que indica que las proteínas de unión a CaM son necesarias para la acumulación de ácido salicílico (SA) y la muerte celular programada, necesarios para las respuestas de resistencia a enfermedades (Kang y col., 2006; Du y col., 2009).

gb|EEF35920.1| protein transport protein sec23, putative [*Ricinus communis*]

TRANSPORTE/SECRECIÓN DE PROTEÍNAS

Descrita anteriormente.

sp|Q05538.1|CHIC_SOLLC RecName: Full=Basic 30 kDa endochitinase

DEFENSA

Descrita anteriormente.

gb|ACH68563.1| alpha-tubulin [*Solanum tuberosum*]

DEFENSA

El citoesqueleto es una estructura intracelular altamente dinámica y versátil compuesta de microtúbulos y microfilamentos de actina, con un papel importante en el crecimiento celular, desarrollo, división celular, motilidad y organización intracelular. La penetración de la pared celular es uno de los primeros pasos para la infección por patógenos filamentosos como hongos y oomicetos, las deposiciones de la pared celular o papila, son importantes barreras físicas que impiden la invasión de la célula por el patógeno. Antes de la formación de la papila, el citosol y los componentes subcelulares son translocados al sitio de penetración. Esta agregación citoplasmática depende de la acción de los componentes del citoesqueleto como los microfilamentos de actina y los microtúbulos, la acumulación de material celular alrededor del sitio de invasión sugiere que se relaciona con el grado de resistencia de la planta. Sin embargo, hay casos en los que la intensidad de los microfilamentos de actina no correlaciona con el grado de resistencia. Los microfilamentos de actina son consistentemente observados en el sitio de invasión, incluso cuando fallan en detener al patógeno, pero los microtúbulos tienen un comportamiento más variado cuando ocurre el ataque de un patógeno, lo que sugiere un papel menos importante que el de los microfilamentos de actina (Takemoto y col., 2006; Takemoto y Hardham, 2004).

gb|ABK41200.1| transcriptional coactivator multiprotein bridging factor [*Solanum lycopersicum*]

REGULACIÓN GÉNICA

Las respuestas de defensa contra un patógeno consisten de una vasta y compleja red de estrategias dirigidas a detener el avance del patógeno; el entendimiento de cómo los genes relacionados a defensa son regulados espacial y temporalmente, recae en el proceso de activación transcripcional. En este sentido los coactivadores son una nueva clase de factores de transcripción capaces de interconectar factores de transcripción y/o otros componentes regulatorios con la maquinaria basal de transcripción, lo que permite la activación transcripcional. En papa, el coactivador de la

transcripción denominado StMBF1 fue inducido por *Fusarium* y por herida; lo que implica que diferentes rutas de señalización desencadenadas por herida o infección operan para activar las respuestas de defensa en papa (Godoy y col., 2001). En *Arabidopsis*, la sobreexpresión constitutiva de MBF1c (coactivador multiprotein bridging factor 1c) potenció la tolerancia a la infección de *Pseudomonas syringae* cv tomato, calor y estrés osmótico, lo que sugiere que MBF1c se une a promotores específicos asociados principalmente con respuestas a estrés ambiental y respuestas a patógeno, y preferencialmente aumenta las respuestas de defensa durante el estrés más que activarlas constitutivamente (Suzuki y col., 2005).

gb|ABB72805.1| Per1-like family protein [*Solanum tuberosum*]

DEFENSA

La protección contra el daño por desecación y ROS es un componente necesario durante el desarrollo de la semilla. Muchas semillas entran a un estado fisiológico conocido como latencia en el que no se permite la germinación aun cuando hay condiciones favorables, en este estado la respiración resulta en la producción de subproductos, como ROS, que pueden provocar la peroxidación de lípidos y la de-esterificación de fosfolípidos. Las proteínas LEA (Late embryogenesis abundant) tienen la función de proteger los componentes celulares contra los daños por desecación. En *Arabidopsis* el gen relacionado a latencia AtPER1, es expresado únicamente en la embriogénesis tardía y en el embrión y en la capa de aleurona, basado en estas características Per1 es un gen LEA atípico, posee una actividad de peroxiredoxin anti-oxidante, por lo que se ha propuesto que su función es la de proteger los componentes celulares de los radicales libres durante la desecación, lo que es esencial durante la transición de la vida embrionaria a la vegetativa (Stacy y col., 1999).

Por otro lado, en el genotipo Mp420 de maíz (*Zea mays*) resistente a *Aspergillus flavus*, la expresión de *per1* fue significativamente mayor que en el genotipo susceptible B73 en la etapa final del desarrollo del grano, y fue inducida significativamente después de la infección por *A. flavus*, lo que sugiere un papel importante en potenciar la tolerancia del grano al estrés y a la aflatoxina (Chen y col., 2007).

gb|ABB86276.1| mitochondrial processing peptidase-like [*Solanum tuberosum*]

TRANSPORTE

Muchas de las proteínas mitocondriales son codificadas en el núcleo, traducidas en el citosol y deben cruzar la membrana mitocondrial antes de llegar a su compartimento. Estas proteínas son sintetizadas como precursores, y son importadas a la matriz mitocondrial por medio de translocasas ubicadas en el exterior y en el interior de la membrana mitocondrial, y después, la presecuencia es cortada del precursor por la peptidasa de procesamiento mitocondrial (MPP). La MPP es una enzima integrada en el citocromo *bc1*, a pesar de la integración de MPP en *bc1*, la transferencia de electrones y la translocación del precursor son independientes de la actividad de procesamiento (Dessi y col., 2000; Glaser y Dessi, 1999). En arroz un incremento en la capacidad de importar se correlaciona con un incremento en la abundancia del complejo citocromo *bc1*, que es dependiente de la presencia de oxígeno; lo que proporciona una relación entre la cadena respiratoria y el aparato de importación de proteínas (Howell y col., 2007).

ref|YP_001837389.1| photosystem II phosphoprotein

sp|O49074.1| Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase

ENERGIA

La relación entre fotosíntesis y las respuestas de defensa ha sido descrita anteriormente

gb|EEH50839.1| senescence-associated protein

METABOLISMO

La relación entre senescencia y respuestas de defensa fue descrita anteriormente

**12. Anexo II. Artículo aceptado para publicación en Plant Molecular
Biology Reporter**

Gene Expression Analysis during Interaction of Tomato and Related Wild Species with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

José Pablo Lara-Ávila · María Isabel Isordia-Jasso ·
Rosalba Castillo-Collazo · June Simpson ·
Ángel Gabriel Alpuche-Solís

© Springer-Verlag 2011

Abstract *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a Gram-positive bacterial pathogen causing bacterial wilt and canker of tomato (*Solanum lycopersicum*), producing economic losses worldwide. In this study, gene expression analysis was conducted using several resistant tomato-related wild species, including *Solanum peruvianum* LA2157, *S. peruvianum* LA2172, and *Solanum habrochaites* LA2128, and a tomato susceptible species, to identify genes involved in disease response. Using cDNA-amplified fragment length polymorphism (AFLP), 403 differentially expressed transcripts were identified. Among those, several genes showed contrasting expression patterns among resistant and susceptible species, including genes involved in the ubiquitin-mediated protein degradation pathway and secretory peroxidase. These genes were up-

regulated in resistant species, but down-regulated in susceptible species, suggesting their likely involvement in early plant defense responses following *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* infection. These identified genes would serve as new candidate bacterial wilt disease resistance genes and should be subjected to further functional analyses to determine the molecular basis of incompatibility between wild species of tomato and *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. This would then contribute to the development of more effective and sustainable *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* control methods.

Keywords Compatible interaction · Gene expression profiling · Incompatible interaction

J. P. Lara-Ávila · M. I. Isordia-Jasso · R. Castillo-Collazo ·
Á. G. Alpuche-Solís (✉)
IPICYT, División de Biología Molecular,
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.,
Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4ta. Sección,
78216 San Luis Potosí, SLP, México
e-mail: alpuche@ipicyt.edu.mx

J. P. Lara-Ávila
e-mail: jplara@ira.cinvestav.mx

J. Simpson
Departamento de Ingeniería Genética,
Cinvestav Campus Irapuato,
Km 9.6 Libramiento Norte, Apartado Postal 629,
35500 Irapuato, Guanajuato, México

J. P. Lara-Ávila
Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad,
Cinvestav Campus Irapuato,
Km 9.6 Libramiento Norte, Apartado Postal 629,
35500 Irapuato, Guanajuato, México

Introduction

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* is a plant pathogenic actinomycete that causes bacterial wilt and canker of tomato (*Solanum lycopersicum*), an economically important disease causing yield losses worldwide. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* infection initiates through wounds and natural openings such as stomata and hydathodes (Carlton et al. 1998) to establish an endophytic interaction, which in most cases eventually leads to invasion of the xylem vessels and development of the symptoms typical of a systemic vascular disease in tomato plants. This has been illustrated recently by a study using a bioluminescent *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* strain (Xu et al. 2010). *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* is considered to be a biotroph, but can survive in soil for long periods of time when associated with plant debris, serving as a source of infection when the next crop cycle

13. ANEXO III. PROTOCOLOS

13.1. SÍNTESIS DE cDNA DE DOBLE CADENA (ds cDNA)

1) Síntesis de cDNA primera cadena (fs cDNA) (Protocolo Invitrogen)

1.- Preparar la siguiente Mezcla 1

| | |
|---------------------------|------------|
| oligo dT | 1 μ L |
| dNTP | 1 μ L |
| ARN | 1 μ g |
| H ₂ O DEPC cbp | 13 μ L |

2.- Incubar 65° C por 5 min.

3.- Preparar la siguiente Mezcla 2

| | |
|------------------------|-----------|
| 5X First Strand Buffer | 4 μ L |
| DTT | 2 μ L |

4.- Incubar a 42° C por 2 min.

5.- Añadir 1 μ l SuperScript II (200 U)

6.- Incubar 42° C por 50 min.

7.- Inactivar a 70° C por 15 min. Volumen final 20 μ L

2) Síntesis de ds cDNA

8.- Preparar la siguiente Mezcla

| | |
|-------------------------------------------|--------------|
| Buffer 10x DNA polimerasa I | 8 μ L |
| DNA polimerasa I de <i>E. coli</i> (30 U) | 3 μ L |
| Rnasa H de <i>E. coli</i> (2 U) | 0.4 μ L |
| dNTP | 3 μ L |
| H ₂ O DEPC | 45.6 μ L |
| fs cDNA | 20 μ L |
| Vol Final | 80 μ L |

9.- Incubar 2h a 16° C.

10.- Agregar 2 μ l de T4 DNA ligasa (10 U).

11.- Incubar 5 min a 16° C.

12.- Agregar 10 μ L EDTA 0.5 M

13.- Agregar 1 vol. De Fenol: Cloroformo: Isoamílico 25:24:1 (92 μ L).

14.- Centrifugar 5 min a 14 000 g.

- 15.- Separar la fase acuosa y transferir a un nuevo tubo.
- 16.- Agregar 0.5 vol de acetato de amonio 7.5 M (46 μ L).
- 17.- Agregar 500 μ L de EtOH abs frío. Incubar 15 min. A -80° C.
- 18.- Centrifugar 20 min. 14 000 g a 4° C
- 19.- Descartar sobrenadante con pipeta.
- 20.- Agregar 500 μ L EtOH 70% frío.
- 21.- Centrifugar 10 min a 14 000 g
- 22.- Descartar sobrenadante con pipeta.
- 23.- Dejar secar ds cDNA a 37° C.
- 24.- Resuspender en 40 μ L de H₂O DEPC.
- 25.- Cuantificar en Nanodrop.

13.2. PROTOCOLO DE AFLP

Para los análisis de AFLP, se siguió el protocolo descrito por Vos y col. (1995) con algunas modificaciones.

Digestión del ADN. Se utilizaron 500 ng de ADN genómico y se colocaron en un tubo con 20 U de *MseI* (Roche), y 2.5 μ L de amortiguador RL 1X (Tris-HCl 10 mM, Mg 10 mM, K 50 mM, DTT 5 mM, pH 5.7), en un volumen final de 25 μ L, la mezcla se incubó a 37° C por 3 h; posteriormente se añadieron 20 U de *TaqI* (Roche) y se incubó a 60° C por 3 h. Transcurrido el tiempo, las enzimas se inactivaron por incubación a 70° C por 15 min y luego las muestras se colocaron inmediatamente en hielo.

Ligación de adaptadores. A cada muestra, se le agregó la mezcla de ligación que contenía el adaptador doble cadena *TaqI* 5 pmol; adaptador *MseI* 50 pmol; ATP 10 mM pH 7.5; amortiguador RL 1x; T4 DNA ligasa 1 U (Roche) y agua milli "Q" estéril (Alineación de adaptadores ver Apéndice) para llegar a un volumen de 35 μ L. Se incubaron las muestras a 16° C durante toda la noche.

Pre-amplificación selectiva. Para la pre-amplificación se utilizaron 5 μ L de DNA molde proveniente de la ligación, y se le agregaron 25 μ L de la mezcla de reacción 1 que contenía: oligo *TaqI*+0 50 ng/ μ L; oligo *MseI*+A 50 ng/ μ L; dNTP, 10 mM; y agua milli "Q" estéril. También se le agregaron 20 μ L de la mezcla de reacción 2 que contenía: Taq polimerasa 1U (Roche); PCR-Buffer 1X (Roche) y agua milli "Q" estéril. En un volumen total de 50 μ L. Las condiciones del

termociclador (TECHNE TC 412) fueron: 5 min para la desnaturalización inicial a 94° C seguido de 20 ciclos a 94° C por 30 s 56° C por 60 s 72° C por 60 s con 7 min a 72° C de extensión final.

Tabla S1. Secuencia de oligonucleótidos +1 utilizados para cDNA-AFLP

| Nombre | Secuencia |
|-----------------|---------------------------------|
| <i>MseI</i> + A | 5' GAT GAG TCC TGA GTA AA 3' |
| <i>TaqI</i> + 0 | 5' GAC GAT GAG TCC TGA CCG A 3' |

Amplificación selectiva. Se probaron 6 combinaciones de oligos+2 +3, para la amplificación selectiva; se realizó una dilución 1:150 de la preamplificación, se tomaron 3 µL de esta dilución y se le agregaron 5 µL de la mezcla de reacción 1 que contenía: oligo *TaqI*+2 50 ng/µL; oligo *MseI*+3 50 ng/µL; dNTP 10 mM; y agua milli "Q" estéril. A lo anterior se le agregaron 10 µL de la mezcla de reacción 2 que contenía: *Taq* Polimerasa, 1 U (Roche); PCR-Buffer 1X (Roche); y agua milli "Q" estéril. En un volumen total de 20 µL. Las condiciones del termociclador (TECHNE TC 412), fueron: 5 min para la desnaturalización inicial a 94° C; 6 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 65° C, 60 s a 72° C; 6 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 60° C, 60 s a 72° C; 23 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 56° C, 60 s a 72° C; y 5 min a 72° C para la extensión final.

Tabla S2. Secuencia de oligonucleótidos +2 y +3 utilizados para cDNA-AFLP

| Nombre | Secuencia |
|------------------|-----------------------------------|
| <i>TaqI</i> +TC | 5' GAC GAT GAG TCC TGA CCG ATC 3' |
| <i>TaqI</i> +GA | 5' GAC GAT GAG TCC TGA CCG AGA 3' |
| <i>MseI</i> +ACA | 5' GAT GAG TCC TGA GTA AAC A 3' |
| <i>MseI</i> +AAC | 5' GAT GAG TCC TGA GTA AA AC 3' |
| <i>MseI</i> +AGA | 5' GAT GAG TCC TGA GTA AAG A 3' |

Un aspecto importante es seleccionar la combinación de oligos +3 que den el mayor número de bandas diferenciales, en esta etapa se utilizaron geles de poliacrilamida (PAGE) para secuenciación. Los productos de amplificación fueron corridos en cámara de secuenciación (BioRad). Se agregó a los productos de amplificación selectiva, 10 µL de Buffer de carga (Formamida 98%, Azul de bromofenol 0.05%, Xilen cianol 0.05%, EDTA 10 mM), fueron desnaturalizadas durante 5 min a 95° C y luego colocadas en hielo. Se

cargaron en el gel de poliacrilamida al 6% con condiciones desnaturalizantes, 6 μ L de cada muestra y 4 μ L del marcador de peso molecular de 25 pb (Invitrogen), y se corrieron en Buffer TBE 1x (Tris-Base 0.9 M, Ácido Bórico 0.9 M, EDTA 25 mM) a 90 Watts constantes por aproximadamente 3 horas. Para la detección de las bandas se utilizo la tinción de nitrato de plata.

13.3 ELECTROFORESIS DE POLIACRILAMIDA EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.

1.- Preparar stock de poliacrilamida 30% (19:1).

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Acrilamida | 28.5 g |
| Bis- acrilamida | 1.5 g |
| Aforar a 100 mL con H ₂ O | |

2.- Pesar 2 g de Resina y añadirselos al stock de poliacrilamida 30 %.

3.- Dejar 35 min en agitación

4.- Filtrar el stock en aparato de filtración con papel Millipore No. 22 μ m

5.- Almacenar a 4° C.

6.- Preparación de solución de poliacrilamida al 6% (150 mL) en condiciones desnaturalizantes (urea 8 M)

Pesar 72 g de urea.

Disolverlos en 55 mL de agua a 50° C.

Pesar 3 g de resina y agregárselos a la urea una ves que ya esté disuelta.

Dejar 35 min en agitación a temperatura ambiente.

Filtrar en aparato de filtración Millipore.

Agregar 15 mL de Buffer TBE 10 X

Agregar 30 mL del stock poliacrilamida 30 % (19:1)

Desgasificar con la bomba de vacío. Evitar mover bruscamente la solución.

NOTA: No dejar que la urea se precipite, para impedirlo hay que calentar.

Limpieza y montaje de las placas de la cámara de secuenciación Bio-Rad.

1.- Limpiar cada placa 6 veces con windex, Etanol 70 % y al final con agua.

Para cada placa cambiarse de guantes.

2.- Preparar solución de Bind Silane.

995 μL Etanol 95 %

5 μL Ácido acético glacial.

3 μL Bind silane

3.- Aplicar toda la solución de Bind Silane al cristal individual.

4.- Aplicar 1 mL de Sigmacote al cristal de la cámara en campana. Cambiarse de guantes al hacer esto.

5.- Armar la cámara.

Aplicar vaselina por ambos lados a las bandas laterales.

Colocar encima el cristal individual.

Colocar las pinzas laterales cuidando que los cristales estén al mismo nivel.

Insertar entre los cristales solo la punta del peine por la parte superior de la cámara.

6.- Preparar Persulfato de amonio (APS) al 25% en un tubo Eppendorf:

0.25 g APS

1 mL agua

7.- Agregar 150 μL de APS y 150 μL de TEMED a la solución de poliacrilamida al 6 %.

8.- Conectar una jeringa al orificio de llenado en la base de la cámara, y vaciar por ahí la solución de poliacrilamida 6 %, lo más rápido posible. Cuando se tire por el peine no dejar que pase más solución e introducir bien el peine.

9.- Esperar a que polimerice por 1 h.

10. - Montar el gel en la base de la cámara.

11.- Calentar el TBE 1 X a 65° C y poner 800 mL en la base y 1200 mL en el resto de la cámara.

12.- Precorrer el gel a 90 W hasta alcanzar 48° C.

13.- Cargar muestras:

Agregar 10 μL de amortiguador de carga (LB) a cada una.

Desnaturalizar a 95° C por 5 min en termociclador.

Pasar a hielo inmediatamente.

Cargar en el gel 6 μL muestra + LB y 4 μL de marcador.

NOTA: Al momento de cargar ir lavando los siguientes 5 pozos con pipeta para evitar que la urea precipite.

14.- Correr el gel a 90 W aproximadamente por 2:30 h

13.4. PROTOCOLO DE TINCIÓN DE PLATA

Basado en el instructivo de Promega Corporation, 2000. Silver sequence, DNA sequencig system. Technical Manual No. 023

En un agitador orbital colocar la placa que contiene al gel, en la solución de fijación (Ácido Acético glacial 10 %) por 20 min. o se puede dejar toda la noche.

- 1.- Realizar 3 enjuagues con agua destilada al gel, cada uno de 2 min.
- 2.- Introducir la placa con el gel, a la solución de teñido y colocar en agitación por 30 min.

Solución de teñido.

- Nitrato de plata 1g/L
- Formaldehído (HCHO) (1.5 mL de 37 % HCHO/Litro) 0.056%

- 3.- Realizar un lavado de 10 s con agua destilada e inmediatamente después introducir a la primera parte de la solución de revelado.

Solución de revelado.

Esta solución se utiliza a 10° C y al momento de usar se agrega el formaldehído y el tiosulfato. De esta solución se preparan 2 L y se divide en dos partes para su uso.

- Carbonato de sodio 30 g/L
- Formaldehído (HCHO) (1.5 mL de 37 % HCHO/Litro) 0.056%
- Tiosulfato de sodio 2 mg/L

- 4.- Agitar hasta que aparezcan las primeras bandas.
- 5.- Introducir a la segunda mitad de la solución de revelado por espacio de 2 a 3 min. hasta que aparezcan todas las bandas y entonces detener la reacción agregando 1 L de la solución de fijación (Ácido Acético glacial 10 %).
- 6.- Realizar 2 lavados de 2 min con agua destilada.

13.5. ALINEACION DE ADAPTADORES

Ejemplo de alineación de adaptadores doble cadena para AFLP (Adaptadores EcoRI, MseI).

Alineación de adaptadores.

MseI – A cantidad: 65 µg longitud: 16 bases

MseI 1- B cantidad: 203 µg longitud: 14 bases

EcoRI – A cantidad: 109 µg longitud: 17 bases

EcoRI- B cantidad: 77 µg longitud: 15 bases

Tabla S3. Tabla de adaptadores de AFLP.

| Nombre | Secuencia | Peso molecular (g/mol) / Long. | µL para 100 pmolµL |
|-----------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| <i>EcoRI</i> -B | 5'-AAT TGG TAC GCA GTC-3' | 4592 / 15 mer. | 167 |
| <i>EcoRI</i> -A | 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3' | 5146 / 17 mer. | 212 |
| <i>MseI</i> - A | 5'-GAC GAT GAG TCC TGA g-3' | 4946 / 16 mer. | 132 |
| <i>MseI</i> - B | 5'-TAC TCA GCA CTC AT-3' | 4223 / 14 mer. | 481 |

Agregar 100 µL de TE estéril en campana, a cada tubo, la concentración resultante en ng / µL es:

MseI - A : 650 ng / µL

MseI - B : 2030 ng / µL

EcoRI - A: 1090 ng / µL

EcoRI - B: 770 ng / µL

El peso molecular de las 4 bases del ADN es: 650 pg / mol. Multiplicar el peso promedio de las cuatro bases por la mitad de la longitud de cada oligo (obtener peso molecular):

MseI -A: 650 pg / pmol x 8 = 5200 pg / pmol

MseI -B: 650 pg / pmol x 7 = 7550 pg / pmol

EcoRI - A: 650 pg / pmol x 8.5 = 5525 pg / pmol

EcoRI - B: 650 pg / pmol x 7.5 = 4875 pg / pmol

Preparar 100 µL del adaptador a 50 pmol / µL:

50 pmol / µL x 100 µL = 5000 pmol

Entonces:

MseI - A: 5200 pg / pmol x 5000 pmol = 26 000 000 pg

MseI 1 -B: 7550 pg / pmol x 5000 pmol = 37 750 000 pg

EcoRI - A: 5525 pg / pmol x 5000 pmol = 27 625 000 pg

EcoRI - B: 4875 pg / pmol x 5000 pmol = 24 375 000 pg

Convertir a ng:

Msel - A: 26 000 ng

Msel - B: 37 375 ng

EcoRI - A: 27 625 ng

EcoRI - B: 24 375 ng

Calcular volumen a tomar del oligo:

Msel - A: 26 000 ng / 650 ng/μL = 40 μL

Msel - B: 37 375 ng / 2030 ng/μL = 18.41 μL

EcoRI - A: 27 625 ng / 1090 ng/μL = 25.34 μL

EcoRI - B: 24 375 ng / 770 ng/μL = 31.65 μL

Tabla S4. Adaptador *Msel*.

| Nombre | Cantidad (μL) |
|----------------------------------|---------------|
| Oligo <i>Msel</i> - A | 40 |
| Oligo <i>Msel</i> - B | 18.41 |
| Buffer H10X | 10 |
| H ₂ O milli Q estéril | 41.58 |
| Volumen total | 100 |

Tabla S5. Adaptador *EcoRI*

| Nombre | Cantidad (μL) |
|----------------------------------|---------------|
| Oligo <i>EcoRI</i> - A | 25.34 |
| Oligo <i>EcoRI</i> - B | 31.65 |
| Buffer H10X | 10 |
| H ₂ O milli Q estéril | 33.01 |
| Volumen total | 100 |

Colocar los tubos bajo las siguientes temperaturas:

| Temperatura | Tiempo |
|----------------------|---------|
| 65 ° C | 10 min. |
| 56 ° C | 60 min. |
| Temperatura ambiente | 15 min. |
| Almacenar a – 20 ° C | |

Buffer H10X

- Tris HCl 0.5 M
- MgCl₂ 0.1 M
- Espermidina 10 mM
- DTT 0.05 M

12.6. Oligonucleótidos usados para qRT-PCR

Tabla S6. Oligonucleótidos utilizados para la confirmación de expresión diferencial por qRT-PCR.

| UniGen | Secuencia de oligos (5' a 3') | Tm | Fragmento amplificado (pb) |
|----------------------|----------------------------------|------|-------------------------------|
| Secretory peroxidase | F: CCTAGCAAGGCAACAACTCC | 60°C | 168 |
| | R: TCTAGGAGGGCCACACATTC | 60°C | |
| SCE1 | F: TCCTCAATGAAGACAGTGGTTGG | 60°C | 159 |
| | R: CACCCTCTTTCGGTACTCCA | 60°C | |
| PBC1 | F: GACCTTTGCCAGCCTTGTA | 60°C | 174 |
| | R: TCAGATGCAGTGCCAGAAAC | 60°C | |
| Endochitinase 30 kDa | F: ACTGCCACGACCACATTCTA | 60°C | 156 |
| | R: TTCTGGATGACCCCTCAATC | 60°C | |
| MRP1 | F: CATAATTGAGGGCAGTCGT | 60°C | 168 |
| | R: CCAGCTCTAGTCCTGCCAAC | 60°C | |