

ARTÍCULO ORIGINAL

Sobreexpresión de genes en la interacción de *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh. y dos cultivares de *Solanum phureja* Juz. et. Buk

**Verónica Rodríguez Fuerte^I, Mauricio Marín Montoya^I, Juan Gonzalo Morales Osorio^{II},
José Miguel Cotes Torres^{II}, Pablo Andrés Gutiérrez Sánchez^I**

^IUniversidad Nacional de Colombia - Sede Medellín, Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias, Laboratorios de Microbiología Industrial y Biología Celular y Molecular, Calle 59A No 63-20, Medellín, Colombia.
Correo electrónico: verodriguezf@gmail.com, mamarinm@unal.edu.co, paguties@unal.edu.co.

^{II}Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ciencias Agronómicas, Laboratorio de Mejoramiento Genético de Plantas, Calle 59A No 63-20, Medellín, Colombia.
Correo electrónico: jgmoraleso@unal.edu.co, jmcotes@unal.edu.co

RESUMEN: Con el fin de contribuir a un mejor conocimiento de los mecanismos que rigen la interacción entre *Solanum phureja* Juz. et. Buk. y *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh, agente causal de la sarna polvosa de la papa, se realizó en esta investigación el análisis del transcriptoma de dos cultivares: Criolla Colombia (susceptible) y Criolla Latina (tolerante), mediante pirosecuenciación 454. Los resultados indicaron diferencias entre los genes sobreexpresados en cada cultivar ante la infección con el patógeno. En el cultivar susceptible, la respuesta ocurre a partir de la activación transcripcional de genes asociados a la integridad de la pared celular, transducción de señales y genes involucrados en la respuesta a diferentes tipos de estrés. Los genes que codifican para metalotioneína (3297 veces), fosfatasa 2C (2128 veces) y un inhibidor de pectinmetilesterasa (2127 veces) fueron los más sobreexpresados en este cultivar. Por su parte, en el cultivar tolerante los niveles de sobreexpresión de genes fueron moderados, con sólo dos genes (un gen putativo y α -Galactosidasa) siendo transcritos más de 1000 veces, con respecto a las plantas sin inocular. Estos resultados sugieren que la tolerancia a *S. subterranea* de este cultivar, incluye también mecanismos de defensa constitutivos. Finalmente, mediante ensayos de qRT-PCR se confirmó la sobreexpresión de tres de los genes identificados en el transcriptoma del cultivar Criolla Latina.

Palabras clave: NGS, PCR en tiempo real, sarna polvosa, transcriptoma.

Gene overexpression in two cultivars of *Solanum phureja* Juz. et. Buk. in interaction with *Spongospora subterranean* (Wallr.) Lagerh

ABSTRACT: For a better understanding of the molecular mechanisms involved in the interaction between *Solanum phureja* Juz. et. Buk. and *Spongospora subterranean* (Wallr.) Lagerh, the causal agent of powdery scab disease, a 454 transcriptome analysis was carried out using one susceptible (Criolla Colombia) and one tolerant (Criolla Latina) potato cultivars. The results revealed a marked difference in the overexpression pattern for each cultivar. In the susceptible cultivar, the response was based on the activation of genes associated with cell-wall integrity, signal transduction and stress-related genes. The most overexpressed genes were those coding for methalothionein (3297 times), phosphatase 2C (2128 times) and a pectin methylesterase inhibitor (2127 times). Overexpression in the tolerant cultivar was moderate with only two genes (a putative gene and α -Galactosidase) being transcribed more than 1000 times compared with the non-inoculated control suggesting an important constitutive defense response. Overexpression of three genes in the Criolla Latina transcriptome was confirmed by qRT-PCR.

Key words: NGS, powdery scab, real time PCR, transcriptome.

INTRODUCCIÓN

La sarna polvosa es una de las enfermedades más limitantes del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L. y *Solanum phureja* Juz et Buk) en Colombia y otros países del mundo (1). Esta enfermedad es causada por el protozoo *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh, un parásito obligado que se dispersa eficientemente a través de sus estructuras de resistencia (quistosoros) en los suelos. La sarna polvosa afecta tanto el sistema radicular de las plantas como la calidad de los tubérculos, reduciendo los rendimientos de los cultivos y la posibilidad de comercializar los tubérculos o de utilizarlos como semilla (2). *S. subterranea* es además el vector del virus *mop-top* de la papa (*Potato mop-top virus*, *Pomovirus*), lo que genera un mayor impacto sobre los cultivos infectados con este protozoo (3).

La sarna polvosa fue descrita por primera vez en 1841 en Alemania y desde entonces se expandió rápidamente a las zonas productoras de papa de todo el mundo (2). En Colombia, esta enfermedad fue informada en 1965 por Orjuela (4) y en la actualidad afecta cultivos en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Nariño y Antioquia, donde puede ocasionar pérdidas entre 30 y 80%, dependiendo de la susceptibilidad de los cultivares, los genotipos del patógeno y las condiciones medioambientales que rigen su interacción (5, 6).

A pesar del fuerte impacto que ocasiona este patógeno en la agroindustria de producción de papa, existen pocas alternativas efectivas para su manejo, dada la ausencia de cultivares comerciales resistentes, a la latencia en el suelo de sus quistosoros y a su difícil detección en tubérculos-semilla asintomáticos (1). El tratamiento químico de suelos infestados con el patógeno mostró ser muy poco rentable, altamente contaminante y de baja efectividad (2). Por esto, se considera que las estrategias para manejar la sarna polvosa, deben incluir la combinación de medidas como la rotación de cultivos, la siembra de tubérculo-semilla certificados en suelos no contaminados y la siembra de clones tolerantes/resistentes a *S. subterranea* (2,7). Aparentemente, la resistencia a la sarna polvosa ocurre bajo control poligénico (2), siendo identificadas algunas fuentes de resistencia en las especies silvestres *Solanum bulbocastanum* Dunal y *Solanum hougasii* Corr.(8, 9). En Colombia, recientemente Ramírez *et al.* (10), realizaron una evaluación en invernadero de la resistencia a la sarna polvosa de 105 genotipos de *S. phureja* (papa criolla), encontrando que el material más susceptible correspondió al cultivar comercial Criolla Colombia, mientras que 30 genotipos se presentaron como altamente resistentes, al no pre-

sentar síntomas de la enfermedad ni signos del patógeno después de 75 días de la inoculación. En dicho estudio también se destacó que dos de los cultivares (Criolla Paisa y Criolla Latina) fueron definidos como tolerantes a la enfermedad, al presentar niveles de incidencia de sarna polvosa inferiores al 20%, lo cual fue confirmado posteriormente en evaluaciones bajo condiciones de campo, en donde dichos cultivares presentaron un bajo número de agallas en raíces (10).

En los últimos años, se desarrollaron metodologías moleculares de alto rendimiento para obtener una gran proporción, o la totalidad, de las secuencias del genoma de un organismo o de los transcriptos que se expresan bajo diferentes condiciones de evaluación. Dichas tecnologías se conocen en forma genérica como Secuenciación de Nueva Generación (NGS), siendo algunas basadas en principios de pirosecuenciación (11). Existen diferentes formatos de NGS, incluyendo 454 *LifeSciences* (Roche, Suiza), illumina (Illumina Inc, EEUU) y Solid (Applied Biosystems, EEUU) (12).

En el campo agronómico, estas metodologías ofrecen la posibilidad de evaluar la expresión de genes en plantas sometidas a diferentes condiciones abióticas y bióticas, como por ejemplo la infección por un microorganismo fitopatógeno. Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con información sobre los genes y/o mecanismos implicados en las reacciones de defensa de los genotipos de *S. phureja* a *S. subterranea*, a pesar de que, dos cultivares de esta especie (Criolla Colombia y Criolla Latina), mostraron fenotipos contrastantes por su resistencia al patógeno. El objetivo de este estudio fue evaluar la sobreexpresión de genes en ambas variedades como resultado de la infección por *S. subterranea* utilizando el sistema NGS 454 *LifeSciences* y la posterior confirmación de dicha sobreexpresión en seis genes, mediante RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para este estudio se utilizaron dos cultivares de la especie *S. phureja*: Criolla Latina y Criolla Colombia, identificadas previamente en bioensayos como tolerante y susceptible a *S. subterranea*, respectivamente (10). Las plántulas evaluadas se obtuvieron a partir de esquejes de tallo lateral, siguiendo el procedimiento de Cotes y Ñustez (13). Para ello, se sembraron los tubérculos-semilla de cada cultivar y dos semanas después de la germinación se indujo la producción de esquejes de tallo lateral por corte del meristemo apical. Luego de 15 días, se extrajeron los esquejes producidos, haciendo un corte transversal en su base y poste-

riormente se indujo el enraizamiento con aplicación de hormonas vegetales (Hormonagro No. 1; Colinagro, Colombia), sembrándose en bandejas con arena estéril.

El ensayo se realizó bajo condiciones de casa-malla en el Laboratorio de Mejoramiento Genético de Plantas en la Estación Agraria Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, corregimiento de Santa Elena (Medellín, Antioquia), ubicado a una altitud de 2550 msnm y con una temperatura media 14°C. El riego de las plántulas se realizó manualmente, hasta la capacidad de campo con una periodicidad de 3 días.

Inoculación y colección de tejidos infectados

Se obtuvo una solución de zoosporas de *S. subterranea* al inducir su liberación a partir de quistosoros procedentes del municipio de La Unión (Antioquia) presentes en agallas de raíces sumergidas en 150 ml de agua destilada a 20°C durante 4 días. Después de este tiempo, se introdujeron las plántulas de ambos cultivares en la solución de zoosporas y se tomaron muestras de raíz de cada planta de forma aleatoria en diferentes tiempos después de la inoculación (1 hora post-inoculación (hpi), 3 hpi, 6 hpi, 12 hpi, 24 hpi y 48 hpi). Después de 48 hpi, las plantas se retiraron de la solución de zoosporas y se mantuvieron en solución nutritiva de Hoagland hasta el final del ensayo para evaluar la presencia de la enfermedad (30 días post-inoculación -dpi).

Para cada material, se utilizaron tres réplicas inoculadas y un testigo sometido a las mismas condiciones de crecimiento, pero sin inoculación de zoosporas. Las muestras y sus testigos fueron divididas en dos, la primera parte se tiñó con azul de tripano al 0,05% para la observación por microscopía óptica de estructuras y monitoreo del proceso de infección. La segunda parte se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso posterior en las pruebas moleculares.

Aislamiento de ARNm y generación de librerías de ADNc

La extracción del ARN total se realizó utilizando el método del trizol-cloroformo (14), a partir de un conjunto de raíces seleccionadas para los diferentes tiempos de post-inoculación, generándose una librería para cada material inoculado y su respectivo testigo. Para esto, se pesó aproximadamente 1 g de raíz, se maceró con un mortero utilizando nitrógeno líquido y por cada 100 mg de tejido macerado se adicionó 1 ml de trizol (Invitrogen, EEUU). Luego se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4°C, se tomó el sobrenadante y se le adicionaron 200 µl de cloroformo por cada ml de trizol utilizado. Se agitó por 15 s, se incubó a temperatura am-

biente durante 3 min y posteriormente se centrifugó por 15 min a 12000g y 4°C. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo y el ARN fue precipitado con 500 µl de isopropanol por cada ml de trizol. La mezcla anterior fue incubada a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4°C. El ARN total fue lavado con etanol al 75%, utilizando 1ml por cada ml de trizol. El ARNm fue purificado con el kit *Oligotex Direct mRNA* (Qiagen, EEUU) y utilizado para la síntesis de ADNc con el kit *DNA Synthesis System* (Roche, Alemania), para así proceder a la preparación de las librerías con el sistema *GS Rapid Library Prep* (Roche, Alemania).

Cada librería para cada material inoculado con *S. subterranea* y su testigo no inoculado, fue marcado con adaptadores diferentes mediante el kit *GS FLX Titanium Rapid Library MID* (Roche, Alemania). Las librerías se titularon por fluorimetría utilizando el estándar del kit *Library Prep-Rapid y Library Rgt/adaptors*. El tamaño de los fragmentos se estimó con un equipo Bioanalyzer con el sistema *Chip High Sensitivity DNA* (Agilent, EEUU).

Pirosecuenciación

La amplificación de la librería genómica se llevó a cabo en fase sólida individualizando cada esfera y uniendo sólo una molécula de la librería. El ADN unido a las esferas fue amplificado por PCR en emulsión y sólo fueron utilizadas aquellas que hibridaron con el cebador de secuenciación. Para la carga de las esferas en el PTP (*PicoTiter Plate*) se utilizó centrifugación y el dispositivo BDD (*Bead Deposition Device*). El PTP se cargó en tres fases: primero se cargaron esferas recubiertas de las enzimas necesarias para la reacción de pirosecuenciación, en la segunda fase se cargaron las esferas con el ADN amplificado de la librería y finalmente se cargaron esferas recubiertas de pirofosfatasa. Para la secuenciación se utilizó un equipo GS FLX 454 (Roche, Alemania) y los reactivos TITANIUM (Roche, Alemania), haciendo 200 ciclos de los cuatro nucleótidos (nt).

Análisis bioinformático

Previo al ensamblaje de las secuencias, se eliminaron los adaptadores, el ARN ribosomal y las secuencias que presentaron una longitud inferior a 50 nucleótidos (nt), utilizando rutinas programadas en el lenguaje informático Perl, diseñadas específicamente para este fin. Las lecturas seleccionadas fueron ensambladas empleando el programa CAP3 usando los parámetros preestablecidos por defecto (15). Para la determinación de los niveles de sobreexpresión se construyó una base de datos no redundante con todas las secuencias de proteínas de papa depositadas en

GenBank. Esta base de datos fue utilizada para cuantificar el número de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) asociados a cada secuencia de proteína putativa mediante BLASTX y para contabilizar el número de lecturas que presentaron resultados significativos (*hits*) con las secuencias obtenidas en esta investigación. La información anterior fue utilizada para establecer los niveles relativos de abundancia de cada ARNm como se explica a continuación. En una librería de ADNc, la probabilidad de que un fragmento seleccionado corresponda al transcrito de un gen particular es:

$$p = \frac{nL}{T}$$

donde: L corresponde a la longitud media de los fragmentos de la librería (lecturas), l a la longitud del CDS (*Coding DNA Sequence*), n es el número de copias de cada transcrito y T es el tamaño del transcriptoma definido como la sumatoria del número de copias, n_i , copias, n_i ($i=1,2,\dots,N$), de todas las N secuencias de ARNm presentes. Si p es lo suficientemente pequeño, la probabilidad de que una secuencia de la librería sea muestreada k veces en un total de N fragmentos de la librería, se aproxima con una distribución de *Poisson*:

$$P(k; \mu) = \frac{\mu^k}{k!} e^{-\mu}$$

donde: $P(k, \mu)$ corresponde a la probabilidad de que un fragmento sea muestreado k veces y $\mu = N \times g$. Experimentalmente, el valor de g para un gen determinado se puede calcular a través del conteo del número de *hits* de BLAST para dicho gen dividido por N , lo cual resulta en la siguiente expresión:

$$g = \frac{k_i}{N} = \frac{(LNl_i \alpha_i)^{k_i}}{k_i!} e^{-(LNl_i \alpha_i)}$$

donde: α_i corresponde a la razón n_i/T para el gen i ; el valor de α puede ser determinado numéricamente a partir de la ecuación anterior utilizando procedimientos clásicos como el método Newton-Raphson (16). Si se asume que el valor de T es igual para dos librerías con subíndices i y j , la razón entre los valores de α permite establecer el nivel relativo de sobreexpresión, R_{ij} , de cualquier gen, así:

$$R_{ij} = \frac{n_i}{n_j} = \frac{\alpha_i}{\alpha_j}$$

RT-PCR en tiempo real

Con el fin de confirmar la sobreexpresión de seis de los genes identificados en los resultados de la pirosecuenciación, se realizaron pruebas de qRT-PCR.

Para esto, se generaron nuevos brotes de plantas de los cultivares Criolla Colombia y Criolla Latina, realizándose inoculaciones con *S. subterranea*, tal como se describió anteriormente, pero en este caso obteniéndose ARN total en forma individual luego de 0, 1, 2 y 12 hpi.

Los cebadores utilizados fueron diseñados a partir de las secuencias obtenidas en el estudio para los genes que codifican para metalotioneína (MET), inhibidor de la pectinmetilesterasa (PM), α -galactosidasa (ALP), proteína putativa de resistencia a tizón tardío (LBR), fitolquinasa (Fitol), y una proteína putativa con función desconocida (C572). Además, se diseñaron cebadores específicos para una porción del gen del factor de elongación 1α de *S. phureja*, para su utilización como control interno de expresión (17). Para el diseño de los cebadores se empleó el software *primer3* (18) y se comprobó su especificidad con la herramienta *PrimerBlast* (19). Las secuencias de los cebadores se presentan en la Tabla 1.

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en dos pasos. Para la síntesis de ADNc se utilizaron 2 μ l del cebador oligo-dT (10mM), 2 μ l de ARN y 7,5 μ l de agua tratada con DEPC, incubándose a 65°C durante 5 min, para continuar con la adición de 4 μ l de buffer de reacción 5X, 0,5 μ l de inhibidor de ARNasa (40U/ μ l), 2 μ l de dNTPs (10mM) y 2 μ l de la enzima M-MuLV Transcriptasa Reversa (20 U/ μ l) (Fermentas, Lituania). Se incubó a 37°C durante 30 min y posteriormente se detuvo la reacción a 70°C por 10 min. El ADNc se cuantificó utilizando un equipo Nanodrop 2000C (Thermo, EEUU). Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo con el kit *Maxima SYBR Green/RoxqPCR Master Mix* (Thermo, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante, en un equipo Rotor-Gene Q-5plex Platform (Qiagen, EEUU), con un programa de amplificación que consistió en una desnaturalización inicial de 95°C durante 10 min, seguida por 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 s, y anillamiento/extensión a 60°C durante 1 min. Los niveles de expresión fueron determinados por el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, reportado por Livak y Schmittgen (20). Se establecieron para cada uno de los pares de cebadores diseñados, curvas estándar a partir de diluciones seriadas con base 10 del ADNc, iniciando con 1,6 μ g hasta 1×10^{-4} . El valor de C_t se estableció empleando los parámetros por defecto del equipo; mientras que para la determinación del cambio en la expresión de genes se realizó la normalización de los datos de C_t en el tiempo 0 y con relación al gen de referencia Factor de elongación 1α (*EF1 α*) para cada muestra en cada tiempo evaluado.

TABLA 1. Cebadores diseñados para la amplificación por PCR tiempo real de genes sobreexpresados en la interacción entre *S. phureja* y *S. subterranea*./ *Primers used for Real-time PCR amplification of overexpressed genes in the interaction S. phureja and S. subterranea.*

Gen	Cebador	Secuencia 5' - 3'	Tamaño amplicon	Tm*
<i>Contig 572</i>	Contig572F	TTTCTGCTTGGACTGGGAAG	100 pb	54
	Contig572R	ATTTCAACGCCTTCTTGAGC		53,4
<i>Alfa-galactosidasa</i>	alpha-galactosidase F1	CAATGAGCGGTAGAAGCAAG	106	52,5
	alpha-galactosidase R1	TGGACCGGAACATAATGGAAG		53,7
<i>Proteína putativa de resistencia a tizón tardío</i>	late_bresist F1	TCATCGTCGACAGTCCATTC	97	52,8
	late_bresist F2	ATGCAAAATGGGAAGTGAGG		53,7
<i>Fitolquinasa</i>	phytolkinase F	GTCAACAAGGAGCAATTCTAGC	110	52,3
	phytolkinase R	GGCTCATAGACTTGACAGTTGC		52,9
<i>Inhibidor de pectinmetilesterasa</i>	PectinMetil_InhF	CGCCGCAGCCTCTACCAGTT	105	61,1
	PectinMetil_InhR	AGGCTCACGGACAGAGCCGT		60,6
<i>Metalotioneina</i>	MetallotF1	CAAGTGCGGCAGTGGCTGTG	110	62,1
	MetallotF2	CAGGTCCCAACCAAGCACC		63,1
<i>Factor de elongación 1-alfa</i>	EF1QF	ACCCAGCAAAGGGTGCTGCC	115	62,9
	EF1QR	GGGAGGTGTGGCAGTCGAGC		61,4

*Temperatura de fusión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pirosecuenciación

Se confirmó la infección de *S. subterranea* en los dos cultivares de *S. phureja* evaluados, al encontrarse estructuras del patógeno (plasmidios y quistosoros en formación) luego de 24 días de la inoculación (Fig. 1).

En total se obtuvieron 47,5 Mpb de datos de secuencias, con una longitud promedio de 318 pb. Para el caso del cultivar Criolla Colombia sin inocular, luego del ensamblaje, se obtuvieron 3956 secuencias únicas (810 *contigs*, 3146 *singlets*), 936 (23,7%) de estas secuencias tuvieron por lo menos un *hit* de BLASTX.

En las plantas de este cultivar inoculadas con *S. subterranea*, se obtuvieron 8407 secuencias únicas (2106 *contigs*, 6301 *singlets*), presentándose 2913 (34,8%) con al menos un *hit* de BLASTX. Además, se identificaron un total de 1168 secuencias codificantes expresados en el transcriptoma de raíz de Criolla Colombia, siendo identificadas 53 proteínas exclusivamente en las plantas no inoculadas y 683 en las plantas inoculadas.

Genes sobreexpresados en el cultivar Criolla Colombia

En la Tabla 2 se presenta la lista de las 50 proteínas putativas con valores más altos de expresión, iden-

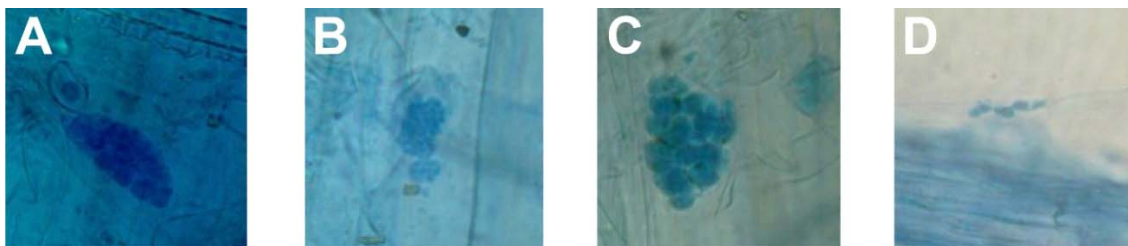


FIGURA 1. Estructuras de *S. subterranea* observadas al microscopio óptico en raíces de dos cultivares de *S. phureja*. A) Plasmodio en Criolla Latina, 24 dpi. B) Quistosoro en formación en Criolla Latina, 30 dpi. C) Plasmodio en Criolla Colombia, 24 dpi. D) Plasmodio en Criolla Colombia, 72 hpi./ *S. subterranea* structures in roots from two cultivars of *S. phureja* observed by optical microscopy. A) Plasmodium in Criolla Latina, 24 hpi. B) Cystosori in formation in Criolla Latina, 30 dpi. C) Plasmodium in Criolla Colombia, 24 dpi. D) Plasmodium in Criolla Colombia, 72 hpi.

TABLA 2. Genes sobreexpresados en la interacción de *S. phureja* cultivar Criolla Colombia y *S. subterranea*.
Overexpressed genes in the interaction of S. phureja cv. Criolla Colombia and S. subterranea.

Sobreexpresión	Descripción	Hít de BLAST (GI)
3297	Metalotioneína	1122419
2128	Proteína fosfatasa 2C	74474911
2127	Inhibidor de pectinmetilesterasa	110083943
1480	Ascorbato oxidasa	257671782
1275	Xiloglucanoendotransglucosilasa	257637858
1078	Proteína de extensión de la ubiquitina	321149957
1078	Proteína universal de estrés ER6	5669654
1077	Cinnamil-alcohol deshidrogenasa	7430935
891	Alfa-glucosidasa 08	197260357
889	Proteína de unión a calcio	169481
889	Calmodulina putativa	21616055
888	4-cumarato-CoA ligasa	56713950
888	Proteína ribosomal L13e	76573319
845	Proteína ribosomal S23	77999293
845	GADPH	81074359
739	Proteína de respuesta a sales y baja temperatura	24745954
711	Proteína ribosomal L11	78191444
710	Tirosina fosfatasa	82623389
709	S-adenosilmetionadecarboxilasa 2	164431178
709	Proteína asociada al estrés de maduración	166204101
708	13-lipoxigenasa	1495804
636	S-adenosilmetionadecarboxilasa	21485
545	Decarboxilasa de aminoácidos aromáticos 1B	92429385
545	Aminoácidopermeasa2	218409102
543	Proteína asociada al estrés de maduración	4098250
543	Transportador de péptidos	218406026
542	Proteína ribosomal L27a	76160933
444	Proteína ribosomal L3	82623411
444	Proteína Ras similar a RABD2a	227247902
444	Tioredoxina	89258107
392	Peroxidasa	296910
391	Fenilalanina amonio-liasa 1	400725
391	Factor de transcripción bZIP	170773912
391	Histona H3 variante H3.3	1435157
391	Guanina deamidasa	76160949
390	Proteína PCNT115 inducida por auxinas	321149987
390	Glutation S-transferasa	24745884
390	UDP-glucosa	77416931
390	Receptor de etileno	4877653
390	Proteína ribosomal L37	483586
390	Factor de unión a repeticiones C	114432126
390	Proteína ribosomal L10	1902894
389	Proteína transmembranal MIP	77999265
355	Proteína con dedo de zinc C2H2	150406379
272	Proteína ribosomal L14	76161008
272	Proteína con dominio cremallera de leucina	211853240
272	Nucleasa putativa HARBI1	195549553
271	Fosfolipasa A1	6691519
271	Erg-1	31074969
256	Factor de transcripción ABR1 (respuesta etileno)	164458462

tificadas en el cultivar Criolla Colombia, luego de la inoculación con *S. subterranea*. Los genes con mayores niveles de sobreexpresión respecto a la planta sin inocular fueron la metalotioneína (3297 veces), el gen de proteína fosfatasa 2C (2128 veces) y el inhibidor de pectinmetilesterasa (2127 veces). Un análisis gráfico de los perfiles de expresión según la función y ponderado según los niveles de sobreexpresión sugiere que Criolla Colombia responde frente a la infección con *S. subterranea* mediante la activación transcripcional de genes asociados a la integridad de la pared celular, transducción de señales y genes involucrados en la respuesta a diferentes tipos de estrés (Fig. 2).

Con relación al estrés oxidativo, se identificaron ARNm codificantes para metalotioneína, tioredoxina, peroxidasa y glutatión-S-transferasa. Esta es una de las principales respuestas de defensa de las plantas frente al ataque de los fitopatógenos y consiste en la rápida liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el peróxido de hidrógeno y radicales superóxido (21). Las ROS pueden afectar directamente a los microorganismos patógenos, actuar como agentes modificadores de la pared celular e incluso servir como moléculas señaladoras (22). Como se indicó anteriormente, el gen más sobreexpresado en este cultivar fue el que codifica para un homólogo de la

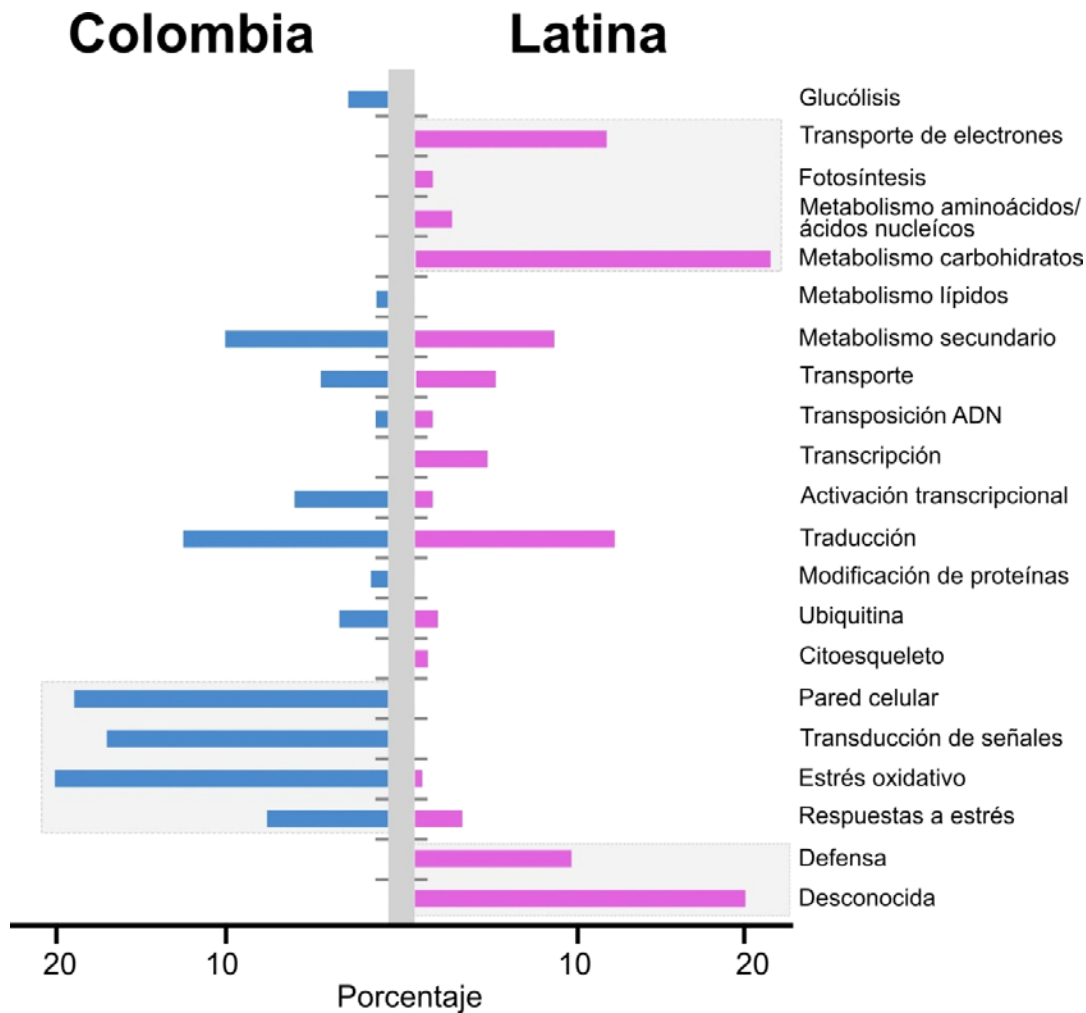


FIGURA 2. Principales funciones de genes sobreexpresados en la interacción de dos cultivares de *S. phureja* y *S. subterranea*. Cada barra representa el porcentaje de genes sobreexpresados asociados a cada función molecular (derecha). La abundancia relativa de cada grupo fue ponderada con los valores de sobreexpresión. Con la sombra se resaltan los conjuntos de genes con mayores diferencias cualitativas entre ambos cultivares. / *Main functions of overexpressed genes from two cultivars in the interaction between S. phureja and S. subterranea.* Bars represent the percentage of genes associated with each function on the right. Relative abundance was weighted with their corresponding overexpression values. Shading highlights major differences in expression patterns between both varieties.

metalotioneína, una proteína de bajo peso molecular rica en cisteína implicada en la liberación de ROS y homeostasis de metales. Ya que trabajos previos informaron acerca de la sobreexpresión de esta proteína en presencia de diferentes fitopatógenos(23), el presente estudio permite postular la participación activa de ROS como una de las respuestas más importantes ante el inicio de la infección de *S. subterranea* en Criolla Colombia; sin embargo, es claro que la producción masiva de estas sustancias no logra contener el proceso de colonización de las raíces por parte del patógeno, por cuanto este cultivar es altamente susceptible a la sarna polvosa de la papa (10).

Por otra parte, los genes asociados a procesos de señalización celular fueron identificados en este estudio como otro importante grupo de respuesta frente a la infección con *S. subterranea*, destacándose la sobreexpresión de la fosfatasa 2C, además de una proteína tipo Ras-RABd2a, una tirosina fosfatasa, un homólogo del receptor de etileno, calmodulina y una proteína de unión a calcio (Tabla 2). La fosfatasa 2C resulta fundamental en el desarrollo y crecimiento de las plantas, a través de su acción en rutas de señalización de ácido abscísico y adaptación al estrés biótico y abiótico (24). Recientemente, Widjaja *et al.* (25) identificaron en *A. thaliana* una fosfatasa 2C que se acumula después de la infección con *Pseudomonas syringae* y activa la proteína de resistencia NB-LRR RPM1. Por otra parte, Hu *et al.* (24) encontraron que la expresión del gen de la proteína fosfatasa 2C de arroz en plantas de tabaco, puede mejorar la resistencia a enfermedades y es inducida por moléculas señal relacionadas con defensa en plantas. Sin embargo, no se encontraron evidencias que sugieran la presencia de un ARNm codificante para un homólogo de este gen en Criolla Latina, por lo que su acción aparentemente no es fundamental para desencadenar la reacción de resistencia en *S. phureja* ante *S. subterranea*.

Otro grupo importante de genes sobreexpresados en este cultivar corresponde a proteínas relacionadas con la integridad de la pared celular; cuatro de estos genes se encuentran entre los 10 con mayores niveles de sobreexpresión en Criolla Colombia, e incluyen un inhibidor de pectinmetilesterasa (PMEIs), xiloglucanendotransglucosilasa, cinamil alcohol deshidrogenasa y una β -glucosidasa tipo 8. Las PMEIs son enzimas que permiten que la pectina sea susceptible a la hidrólisis por endopoligalacturonasas y su regulación por parte de proteínas inhibitoras específicas (PMEIs) desempeñan una importante función en el desarrollo de las plantas, así como en la defensa ante patógenos que degradan la pared celular durante su proceso de ingreso al hospedante (26). Los altos niveles de sobreexpresión detectados en este estudio

para este gen (2127 veces) son un claro indicativo de que en *S. phureja*, se activan rápidamente PMEIs que buscan contener la degradación de la pared celular ante endopoligalacturonasas microbianas, como las putativamente producidas por *S. subterranea*. Sin embargo, ya que hasta el momento no hay informes de la producción de estas enzimas en *S. subterranea*, en el futuro será necesario evaluar las características de las PMEIs de este patógeno y su participación en los eventos tempranos de infección en papa.

Finalmente, en el estudio se encontró que la producción de metabolitos secundarios es otra importante línea de defensa de las plantas de Criolla Colombia ante la infección de *S. subterranea*, al detectarse la sobreexpresión de dos tipos de S-adenosilmetionina de carboxilasa, de una decarboxilasa de aminoácidos aromáticos, de Guanina deamidasa y de fenilalanina amoniliasa, ésta última una enzima clave en la síntesis de fenilpropanoides y responsable del incremento de los niveles ácido salicílico, dos aspectos bien conocidos como respuestas generales de defensa de las plantas ante el ataque de fitopatógenos (27).

Genes sobreexpresados en el cultivar Criolla Latina

Para el caso de Criolla Latina, el total de secuencias únicas para las plantas con y sin inocular con *S. subterranea*, fue de 8246 (1985 *contigs*, 6261 *singlets*) y 5253 (1280 *contigs*, 3973 *singlets*), respectivamente. De éstas, 2796 (33,6%) tuvieron un *hit* de BLASTX en las plantas sin inocular y 1044 (19,9%) en las plantas inoculadas; 735 genes fueron transcritos únicamente en las plantas no inoculadas y 107 en las plantas inoculadas. Contrario a lo encontrado en el cultivar susceptible Criolla Colombia, los niveles de sobreexpresión en el cultivar resistente fueron moderados, ya que tan sólo dos genes fueron transcritos más de mil veces respecto a la planta sin inocular, mientras que de los primeros 50 genes evaluados, sólo 12 presentaron niveles de entre 100 y 1000 veces (Tabla 3). Esta situación conduce a plantear la hipótesis de que la respuesta de Criolla Latina frente a la infección con *S. subterranea*, podría presentar un importante componente constitutivo, siendo necesario realizar estudios histológicos en las raíces de este cultivar, que permitan definir si esta reacción se debe a la presencia de barreras físicas preestablecidas, a la síntesis de compuestos antimicrobiales o a una combinación de ambos mecanismos. Sin embargo, la participación de genes inducidos, como los encontrados en el presente estudio, hacen parte integral de la defensa de este cultivar ante la infección de *S. subterranea* y su análisis individual y en conjunto con los otros mecanismos preestablecidos debe ser abordado en estu-

dios posteriores.

Los análisis de sobreexpresión de genes en Criolla Latina identificaron a la sobreactivación del metabolismo central, en particular del metabolismo de

carbohidratos y de la cadena transportadora de electrones, como componente clave de la interacción temprana de estas plantas con *S. subterranea* (Fig. 2). Es bien conocido que la respiración y la síntesis de carbohidratos son estimuladas como parte de la res-

TABLA 3. Genes sobreexpresados en la interacción *S. phureja* cultivar Criolla Latina y *S. subterranea*. / *Overexpressed genes in the interaction of S. phureja* cv. *Criolla Latina* and *S. subterranea*.

Sobreexpresión	Descripción	Hit de BLAST (GI)
1377	Proteína hipotética (C572)	91176610
1377	Galactosidasa alcalina	23452226
823	Proteína de Resistencia a tizón tardío	48057662
816	Proteína ribosomal S19	89241711
379	Translocador Oxoglutarato/malato	68449758
379	ARN polymerasa	89241663
378	Fitol quinasa	325516266
378	NADH-ubiquinona oxidoreductasa	55584170
273	Citocromo oxidasa III	21325920
127	Semialdehído succinato deshidrogenasa	171854593
127	NADH deshidrogenasa	668985
126	Proteína de respuesta a sales y baja temperatura	24745954
126	Proteína asociada al estrés de maduración	4098250
126	Producto de proteína desconocido	15984222
97	Alcohol deshidrogenasa	228359
96	Transcriptasa reversa	113205137
96	Proteína bZIP de unión al ADN	5901747
96	Galactinol sintasa	256542214
96	Aspartato carbamoil transferasa	15796550
96	Desconocida	16933569
96	Factor de elongación EF1A	29892963
96	NADH deshidrogenasa (sub. 1)	89241727
96	Exonucleasa V	4782005
96	Flavonoide hidroxilasa (P450)	395261
96	Giberelina 2-oxidasa	126843214
96	Proteína ribosomal S7	4688656
96	2-oxoglutarato oxigenasa	76573363
96	Oxidasa alternativa 1a	29465622
96	Proteína Ycf1	82754681
96	Fotosistema II (subunidad R)	21491
96	Ser/Thr quinasa	13620226
95	Enzima de conjugación de ubiquitina	83283973
32	Transportador de aminoácidos	218409102
32	NAD(P)H:quinona oxidoreductasa	24745889
32	RuBisCO	219902427
32	Formato deshidrogenasa	11991527
32	Enzima de conjugación de ubiquitina	76573335
32	Xilosa sintasa	85718018
32	Tubulina	76573337
32	Glutation peroxidasa	2388885
32	S-adenosil metionadecarboxilasa	21485
32	Proteína de interacción a bomba de protones	292806707
32	Apirasa	1381633
32	Profilina	17224229
32	Proteína ribosomal L27a	76160933

puesta ante procesos infectivos microbianos, al estar relacionadas íntimamente con la generación de esqueletos de carbono necesarios para la síntesis de varios metabolitos, así como para brindar una fuente de energía adicional que permita abastecer todas las necesidades de la célula, incluyendo aquellas de defensa física y química (28). Además, en el estudio se encontraron diferentes genes de función desconocida, que abren una puerta importante de análisis moleculares y funcionales, que requieren ser abordados próximamente, para lograr obtener un panorama más completo de la reacción de defensa inducida a *S. subterranea* en este cultivar de *S. phureja*. En este sentido, el gen más sobreexpresado en Criolla Latina codifica una proteína no caracterizada de 114 aminoácidos y de la cual no se encontraron homólogos en otras plantas. Dados los altos niveles de sobreexpresión detectados (1377 veces), será de gran interés realizar una caracterización molecular del gen que codifica para esta proteína y de sus posibles funciones en la interacción de *S. phureja*-*S. subterranea*.

El segundo gen más sobreexpresado en este cultivar, fue el que codifica para α -Galactosidasa, una proteína que es parte de una serie de enzimas glicosilhidrolasas (GH) o carbohidratasas y que tienen la capacidad de hidrolizar el enlace glicosídico de los azúcares. Debido a esto, desarrollan una función importante en el metabolismo de la pared celular, y por lo tanto, en el crecimiento y desarrollo de las células vegetales. Las GH fueron aisladas generalmente de semillas, donde están involucradas en el clivaje hidrolítico de residuos de α -Galactosa de polisacáridos, glicoproteínas, glicolípidos y oligosacáridos almacenados durante la germinación (29). También fueron frecuentemente asociadas a los mecanismos de defensa de las plantas, ya que los polisacáridos conforman alrededor del 90% del apoplasto y de la pared celular, participando en las interacciones célula-célula y de respuestas de defensa (30). Así por ejemplo, en un estudio realizado por Cheng *et al.* (31), se observó que proteínas como la α y β -Galactosidasa, se sobreexpresaron en presencia del factor de transcripción NtWIF, normalmente inducido bajo condiciones de estrés bióticos. Por otra parte, en un estudio realizado por Goodenough y Kempton (32), se evidenció la sobreexpresión de enzimas degradadoras de la pared celular, como la α -Galactosidasa, en raíces de tomate después de la infección con el hongo *Pyrenochaeta lycopersici* Schneider & Gerlach.

El tercer gen con mayores niveles de sobreexpresión en Criolla Latina codifica para una proteína putativa de resistencia al tizón tardío. Esta proteína, cuya función

específica aún se desconoce, contiene un dominio ATPasa y confiere resistencia a razas de *Phytophthora infestans* (Mont.) de. Bary conteniendo el gen de avirulencia *Avr1*.

Finalmente, a pesar de presentar un nivel moderado de sobreexpresión (378), resulta llamativo la activación del gen codificante para fitol quinasa, una enzima que participa en el metabolismo del fitol, y que hace parte de las rutas biosintéticas de la clorofila, ésteres de lípidos y tocoferol (33). Este último es un antioxidante lipofílico sintetizado exclusivamente en organismos fotosintéticos y cuya acumulación sirve como uno de los mecanismos para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo ocasionado por la liberación de ROS en condiciones de estrés biótico o abiótico (34). En este sentido, Keles y Oncel (35), encontraron, en plántulas de trigo, que los niveles de α -tocoferol se incrementaron notablemente con el estrés por tratamientos con productos químicos, concentración salina y altas temperaturas. Asimismo, se encontró que el cambio diferencial en los niveles de α -tocoferol en respuesta a limitaciones ambientales, depende de la magnitud del estrés y de la sensibilidad de la especie vegetal a esta condición, siendo planteado que el incremento del α -tocoferol contribuye con la tolerancia de las plantas al estrés, mientras que su disminución favorece el daño oxidativo (36). Por esto, aparentemente en Criolla Latina, la regulación del efecto deletéreo de ROS sobre las células donde comienza la infección de *S. subterranea*, es un factor a considerar en los eventos tempranos de la reacción de defensa de *S. phureja*.

RT-PCR en tiempo real

Con el fin de verificar algunos de los resultados presentados anteriormente, se eligieron seis genes sobreexpresados en uno de los dos cultivares y presentes en ambos transcriptomas. Los genes seleccionados fueron metalotioneína (MET), inhibidor de la pectinmetilesterasa (PM), α -galactosidasa (ALP), proteína putativa de resistencia a tizón tardío (LBR), el gen hipotético correspondiente al *contig* 572 (C572) y fitolquinasa (PHYTOL). En este análisis no se incluyó la fosfatasa 2C, al no encontrarse evidencia de su transcripción en el cultivar tolerante.

El diseño de los cebadores resultó efectivo, al lograrse en las reacciones de qPCR productos específicos únicos y del tamaño esperado para los seis genes evaluados en el estudio, lo que resultó evidente en las curvas de fusión y en las corridas electroforéticas de los amplicones que se realizaron a modo confirmatorio. Previo al análisis cuantitativo de expresión de los genes con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, se calcularon las eficiencias para cada gen amplificado y para el gen de referencia

EF1 α , encontrándose que dichos valores se presentaban en el rango de 1 a 1,07.

Los resultados de la qRT-PCR indicaron que en tres de los genes evaluados (*PM*, *MET* y *C572*) no se presentaban diferencias en los niveles de expresión de las plantas inoculadas con *S. subterranea*, independientemente del cultivar y de los tiempos de evaluación (Tabla 4). Por el contrario, los genes *ALP* y *PHYTOL*, se presentaron sobreexpresados en las plantas inoculadas del cultivar Criolla Latina en los tres

tiempos de evaluación (1,2 y 12 hpi) (Fig. 3), mientras que del gen que codifica para una proteína putativa de resistencia a tizón tardío (*LBR*), fue detectada la sobreexpresión sólo después de 12 hpi. Estos resultados confirman la validez de los resultados de la pirosecuenciación del transcriptoma obtenidos en el presente estudio y permiten plantear la utilidad de dichos genes como marcadores de selección en programas de mejoramiento genético de *S. phureja* por resistencia a *S. subterranea*; siendo además necesario

TABLA 4. Valores de Ct obtenidos en las reacciones de qRT-PCR para la expresión de seis genes evaluados en cuatro tiempos durante la interacción de dos cultivares de *S. phureja* y *S. subterranea*. Los valores de ΔE expresan el cambio en el nivel de expresión de los genes utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se subrayan aquellos valores de ΔE superiores a 10./ *qRT-PCR Ct values of six genes evaluated at four different times in the interaction between two S. phureja cultivars and S. subterranea. ΔE represents the change in expression level using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method; values higher than 10 are underlined.*

Cultivar	Tiempo (h)	<i>PM</i> *		<i>MET</i>		<i>C572</i>		<i>ALP</i>		<i>LBR</i>		<i>FITOL</i>	
		Ct	ΔE	Ct	ΔE	Ct	ΔE	Ct	ΔE	Ct	ΔE	Ct	ΔE
Cv. Colombia	0	24,5	**	27,2		29,1		23,1		23,4		20,5	
Cv. Colombia	1	25,3	1,29	30,2	0,04	28,0	0,27	24,0	4,76	22,5	1,17	26,2	4,14
Cv. Colombia	2	25,8	0,30	28,3	0,07	27,0	0,36	23,4	3,18	23,5	0,60	24,0	0,71
Cv. Colombia	12	25,4	0,76	26,3	2,51	27,1	2,59	23,4	5,54	22,7	1,13	19,6	2,36
Cv. Latina	0	21,8		23,4		29,6		23,5		24,9		16,3	
Cv. Latina	1	25,6	0,76	28,5	0,05	29,2	0,31	24,4	<u>15,14</u>	23,7	6,00	23,9	<u>25,11</u>
Cv. Latina	2	23,6	1,25	27,3	0,29	27,5	0,30	22,8	<u>19,43</u>	22,4	6,90	20,2	<u>25,11</u>
Cv. Latina	12	26,1	0,60	29,6	0,04	27,7	0,17	22,3	<u>45,254</u>	22,6	<u>28,84</u>	24,6	<u>59,71</u>

*: *PM*: Inhibidor de pectinmetilesterasa, *MET*: metalotioneína, *C572*: proteína putativa no identificada, *ALP*: α -galactosidasa, *LBR*: proteína putativa de resistencia a tizón tardío, *Fitol*: fitolquinasa. / **PM*: Pectinmethylesterase inhibitor; *MET*: Methalotionein; *C572*: unidentified protein; *ALP*: α -galactosidase; *LBR*: Putative late-blight resistance protein; *Fitol*: Phytolkinase.

**_ : denota la ausencia en la detección por qRT-PCR del transcripto en el tiempo de lectura 0. / **_ : no detection of the transcript by qRT-PCR at time zero

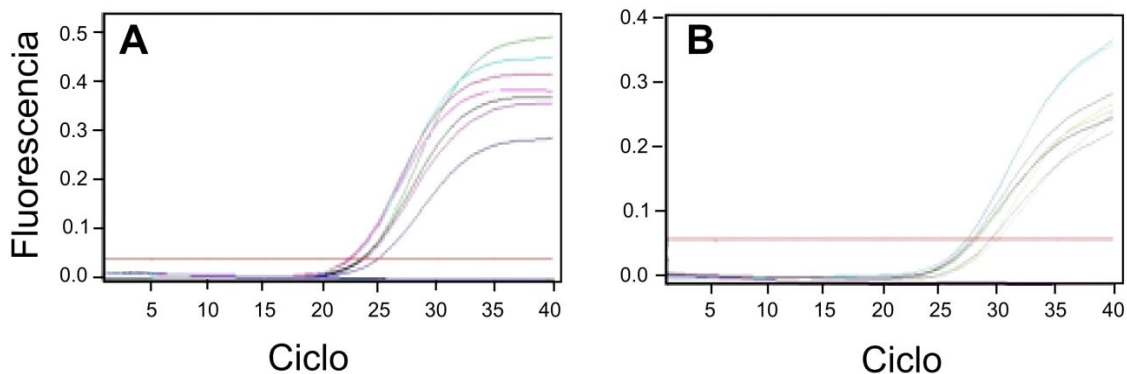


FIGURA 3. Curvas de amplificación por qRT-PCR de dos genes sobreexpresados en la interacción de *S. phureja* y *S. subterranea*. A: Fitolquinasa. B: α -Galactosidasa./ *qRT-PCR amplification curves of two overexpressed genes in the S. phureja / S. subterranea interaction. A: phytolkinase; B: α -Galactosidase.*

continuar el estudio de la expresión de dichos genes en otros cultivares de papa, incluyendo aquellos de *S. tuberosum*, bajo diferentes niveles de infección de *S. subterranea*, etapas fenológicas del cultivo y condiciones ambientales.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó a través del proyecto 220101007287- Evaluación fenotípica y genotípica de la colección colombiana de *Solanum phureja* por resistencia a *Spongospora subterranea* cofinanciado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), Fondo Nacional de Fomento Hortofrutícola (FNHF), Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Federación Colombiana de Productores de Papa (FEDEPAPA) y Universidad Nacional de Colombia Sedes Bogotá y Medellín. Los autores expresan sus agradecimientos a los integrantes de los grupos de investigación de Mejoramiento y Producción de Especies Andinas y Tropicales (COL0039484) y al Grupo de Investigación en papa (COL0010065), que aportaron el material vegetal y el conocimiento previo sobre los cultivares evaluados.

REFERENCIAS

- Osorio I, Gutiérrez P, Marín M. Revisión: *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea* y su virus asociado *Potato mop-top virus* (PMTV), dos patógenos reemergentes en los cultivos de papa de Colombia. *Rev Fac Nal Agr.* 2012;65:6361-6378.
- Merz U, Falloon RE. Review: Powdery scab of potato - Increased knowledge of pathogen biology and disease epidemiology for effective disease management. *Potato Res.* 2009;52:17-37.
- Latvala-Kilby S, Aura JM, Pupola N, Hannukkala A, Valkonen JP. Detection of *Potato mop-top virus* in potato tubers and sprouts: combinations of RNA2 and RNA3 variants and incidence of symptomless infections. *Phytopathology.* 2009;99:519-531.
- Orjuela J. Índice de Enfermedades de plantas cultivadas en Colombia. Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. Boletín Técnico N° 11. Bogotá, Colombia. 1965.
- Osorio I, Orozco M, Gutiérrez P, González EP, Marín M. Variabilidad genética de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en Colombia. *Bioagro.* 2013;25:91-100.
- Gilchrist RE. Alternativas para el manejo integrado de la sarna polvosa de la papa. (*Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*). [Tesis de Doctor en Ciencias] Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. 2009. 95 p.
- Houser AJ, Davidson RD. Development of a greenhouse assay to evaluate potato germplasm for susceptibility to powdery scab. *Am J Potato Res.* 2010;87:285-298.
- Nitzan N, Cummings TF, Johnson DA, Miller JS, Batchelor DL, Olsen C, et al. Resistance to root galling caused by the powdery scab pathogen *Spongospora subterranea* in potato. *Plant Dis.* 2008;92:1643-1649.
- Nitzan N, Haynes K, Miller J, Johnson D, Cummings T, Batchelor D, et al. Genetic stability in potato germoplasm for resistance to root galling caused by the pathogen *Spongospora subterranea*. *Am J Potato Res.* 2010;87:497-501.
- Ramírez L, Zuluaga C, González EP, Marín M, Morales JG, Nústez CE, et al. Uso de esquejes de tallo lateral para evaluar la resistencia de genotipos de *Solanum phureja* a *Spongospora subterranea* f.sp. *subterranea*. *Trop Plant Pathol.* 2013;38: 303-312.
- Adams IP, Glover RH, Monger WA, Mumford R, Jackeviciene E, Navalinskiene M, et al. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Mol Plant Pathol.* 2009;10:537-545.
- Kobayashi K, Atsumi G, Yamaoka N, Sekine K. Review: Sequencing-based virus hunting and virus detection. *Jpn Agric Res Q.* 2012;46:123-128.
- Cotes J, Nústez CE. Evaluación de dos tipos de esquejes en la producción de semilla prebásica de papa criolla (*Solanum phureja* Juz et Buck) variedad yema de huevo. *Agron Colomb.* 2001;18:7-13.
- Chomczynski P, Mackey K. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques.* 1995;19:942-945.
- Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 1999;9:868-877.
- Press WH, Flannery BP, Teukolsky SA, Vetterling WT. *Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing.* Cambridge University Press. 1992. 1020 p.

17. Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot.* 2005;56:2907-2914.
18. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-386.
19. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
20. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001;25:402-408.
21. Bolwell GP, Daudi A. Reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. *In: Reactive oxygen species in plant signaling, Signaling and communication in plants.* Rio LA, Puppó A (eds). Springer, Berlin. 2009;113-133 p.
22. Almagro L, Gómez-Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros-Barceló A, Pedreño MA. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot.* 2009;60:377-390.
23. Meyer Y, Siala W, Bashandy T, Riondet C, Vignols F, Reichheld JP. Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783:589-600.
24. Hu X, Zhang H, Li G, Yang Y, Zheng Z, Song F. Ectopic expression of a rice protein phosphatase 2C gene *OsBIPP2C2* in tobacco improves disease resistance. *Plant Cell Rep.* 2009;28:985-995.
25. Widjaja I, Lassowskat I, Bethke G, Eschen-Lippold L, Long Hh, Naumann K, et al. A protein phosphatase 2C, responsive to the bacterial effector AvrRpm1 but not to the AvrB effector, regulates defense responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 2010;61:249-258.
26. Lionetti V, Raiola A, Camardella L, Giovane A, Obel N, Pauly M, et al. Overexpression of Pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* 2007;143:1871-1880.
27. Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopatol.* 2009;47:177-206.
28. Bolton MD. Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009;22:487-497.
29. da Mata G, de Lima E, de Carvalho JF, Monteze V, Monteze E, Vasconcelos A. Activities of α -galactosidase and polygalacturonase during hydration of *Dalbergia nigra* ((Vell.) Fr All. ex Benth.) seeds at different temperatures. *J Seed Sci.* 2013;35:92-98.
30. Taji T, Ohsumi C, Luchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, et al. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2002;29:417-426.
31. Chung KM, Kim YS, Sano H. Control of seed and root development by WIPK-activated transcription factor, NtWIF in tobacco plants. *Plant Biotechnol.* 2007;24:307-314.
32. Goodenough PW, Kempton RJ. The activity of cell-wall degrading enzymes in tomato roots infected with *Pyrenochaeta lycopersici* and the effect of sugar concentrations in these roots on disease development. *Physiol Plant Pathol.* 1976;9:313-320.
33. Ischebeck T, Zbierzak AM, Kanwischer M, Dörmann PA. A salvage pathway for Phytol metabolism in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 2006;281:2470-2477.
34. Abbasi AR, Hajirezaei M, Hofius D, Sonnewald U, Voll L. Specific Roles of α - and β -Tocopherol A biotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 2007;143:1720-1738.
35. Keles Y, Öncel I. Response of antioxidative defence system to temperature and water stress combinations in wheat seedlings. *Plant Sci.* 2002;163:783-790.
36. Munné-Bosch S. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J Plant Physiol.* 2005;162:743-748.

Recibido: 2-9-2013.
Aceptado: 7-11-2013.