UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Identificación de moléculas candidatas a proteínas efectoras de *Microcyclus ulei* presentes en la interacción con *Hevea brasiliensis*

María Elizabeth Méndez Tibambre

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Bogotá, Colombia
2017

Identificación de moléculas candidatas a proteínas efectoras de *Microcyclus ulei* presentes en la interacción con *Hevea brasiliensis*

María Elizabeth Méndez Tibambre

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Microbiología

Directora

Ph.D, MSc, QF, Ibonne Aydee García Romero

Codirector

Ph.D, Fabio Ancizar Aristizábal

Línea de Investigación:

Caucho Natural – Fitopatología

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Bioprospección del Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2017

Dedicatoria

A mis padres, porque la culminación de esta etapa es un logro que debo al amor y al apoyo que me ofrecen todos los días.

A Vinchi, porque gracias a ella tuve la oportunidad de realizar un sueño que creí inalcanzable. Gracias a ella puedo decir que conocí parte del mundo.

A Julito quien es mi Amor, mi Sol, mi Luna y mis Estrellas.

"Cada fracaso le enseña al hombre algo de lo que necesitaba aprender."

Charles Dickens

Agradecimientos

Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia, al Instituto de Biotecnología y a la Maestría en Ciencias – Microbiología, por brindarme la oportunidad de crecer a nivel profesional y personal.

A la Corporación Centro de Investigación en Caucho CENICAUCHO por su apoyo económico, el cual me permitió dedicarme exclusivamente al desarrollo de mi maestría.

Agradezco especialmente a la Doctora Ibonne Aydee García Romero mi directora, por convertirse en mi maestra y amiga. Porque gracias a sus concejos y oportunidades he logrado cumplir muchas metas de mi vida. Por orientarme en la realización de este proyecto, agradezco su paciencia, constancia, enseñanza, apoyo, orientación y acompañamiento no solo durante el desarrollo del proceso investigativo sino durante mi formación a nivel personal.

Al profesor Fabio Ancizar Aristizabal coordinador del laboratorio de Caracterización molecular y la línea en investigación en caucho natural, mi codirector, por brindarme la oportunidad de hacer parte del grupo de investigación, por la confianza otorgada para la realización del proyecto, así mismo por su apoyo y enseñanza.

A la doctora Patricia Martínez del departamento de química por su asesoría en el desarrollo del componente de infiltración.

A la Doctora Alexandra Sepúlveda del Instituto de Biotecnología por su asesoría en el planteamiento del componente electroforético.

Al profesor Mauricio Bernal del Instituto de Biotecnología por su orientación, apoyo y disposición de insumos y equipos para el desarrollo de la parte práctica durante el componente de electroforesis. Su apoyo fue esencial para el desarrollo de este proyecto.

A mis amigas Diana Vinchira, Viviana Ariza y Jeimy Macias por sus consejos y apoyo incondicional en la superación de momentos difíciles y mil sonrisas en los buenos tiempos.

A mi compañera y amiga Luz Adriana Pedraza quien ha sido un gran ejemplo de vida y me ha enseñado a no rendirme sin pelear.

A Socorro Prieto Asistente de la Maestría por sus buenos consejos durante este largo proceso de formación.

A mis amigos y compañeros Daniela Pórtela, Sandra Sayer, Guillermo Torres, Andrés Peraza, Camilo Ruiz, Laura Lesmes y Jacqueline Ramírez por su colaboración, consejos, apoyo y amabilidad.

A todo el personal que trabaja en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, pues prácticamente todos pusieron un granito de arena para la construcción de este proyecto.

Resumen

El mal suramericano de la hoja del caucho, es una de las enfermedades más degenerativas del cultivo de *Hevea spp*, causada por la infección del hongo *Microcyclus ulei* provoca caída prematura de las hojas y limita la actividad fotosintética, causando pérdidas millonarias en los cultivos heveicolas latinoamericanos. Actualmente no se tiene conocimiento de los factores de patogenicidad de *M. ulei* que permiten la colonización de *H. brasiliensis.* El objetivo de este trabajo fue identificar moléculas candidatas a proteínas efectoras extracelulares del hongo *M. ulei* en interacción con *H. brasiliensis* 9 días posinfección, mediante la caracterización del proteoma del fluido apoplástico de *H. brasiliensis* y la búsqueda de genes codificantes de proteínas efectoras que presentan homólogia en su secuencia a otras proteínas efectoras descritas en hongos fitopatógenos de la clase de los Dothideomycetes. Se estandarizó la técnica de infiltración-centrifugación para la extracción del fluido apoplástico de foliolos de *H. brasiliensis* con síntomas de la enfermedad, el cual fue visualizado y analizado mediante 2D-PAGE. Se evaluó en el DNA del hongo y en el cDNA obtenido a partir de los foliolos infectados la presencia de los genes *Ecp6* y *Ecp7*. Como resultado del análisis proteico, se observó en el fluido de la interacción la presencia de 8 spots de bajo peso molecular (9,2 a 9,7 kDa), que se constituyen en candidatos a posibles efectores o proteínas de respuesta de la planta, adicionalmente como producto de la amplificación del gen *Ecp7* se obtuvo un amplímero en el DNA del hongo y el cDNA de la interacción, el cual al ser secuenciado y comparado contra la base de datos del GeneBank no presentó semejanza con ninguna secuencia publicada, resultado que indica que el amplímero podría corresponder a un gen ortólogo de *Ecp7* hasta ahora no descrito en *M. ulei.*

Palabras clave: *Microcyclus ulei, Hevea brasiliensis*, SALB, Dothideomycetes, fluido apoplástico, proteína, interacción molecular.

Abstract

The South American disease of the rubber leaf or SALB, is one of the most degenerative diseases of the crop of *Hevea spp*, caused by the infection of the *Microcyclus ulei*. Causes premature fall of the leaves and limits the photosynthetic activity, causing millionaire losses in Latin American heveicola crops. At present, the pathogenicity factors of *M. ulei* that allow the colonization of *H. brasiliensis* are not known. The objective of this work was to identify candidate molecules of extracellular effector proteins of the *M. ulei* fungus in interaction with *H. brasiliensis*, 9 days after infection, by characterizing the proteome of the apoplastic fluid of *H. brasiliensis* and the search for homologous proteins to effectors described in phytopathogenic fungi of Dothideomycetes class. The technique of infiltration-centrifugation was standardized for the extraction of apoplastic fluid from *H. brasiliensis* leaf with symptoms of SALB, it was visualized and analyzed by 2D-PAGE. The presence of the selected genes was evaluated from cDNA obtained from infected leaflets. As a result of the protein analysis, the presence of 8 spots of low molecular weight (9.2 to 9.7 kDa), which are candidates for potential effectors or response proteins of the plant. Additionally an amplified was obtained in the DNA of the fungus and the cDNA of the interaction, such that it did not present homology when sequencing, which could correspond with an orthologous gene of the gene *Ecp7* not described yet in *M. ulei.*

Keywords: *Microcyclus ulei, Hevea brasiliensis*, Dothideomycetes, apoplastic fluid, protein, molecular interaction.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIV**

Lista de tablas ..... **XVI**

Lista de abreviaturas ..... **XVII**
Pseudomonas syringae effector XVII

Introducción **1**

1. Capítulo 1 ..... **5**

Marco Teórico **5**

Primera Parte **5**
1.1 El caucho natural 5
1.2 Mayores cultivadores de caucho natural en el mundo 8
1.3 Historia y comportamiento actual del caucho natural en Colombia 9
1.4 Plagas y enfermedades del cultivo de caucho de importancia económica 11
1.4.1 Enfermedades del cultivo 11
1.4.2 Plagas del cultivo 12
1.5 Mal suramericano de la hoja del caucho 13
1.6 Morfología y fisiología de *M. ulei* 14
1.7 Ciclo de vida de *M. ulei* 15
1.8 Manejo integrado del SALB 16

Segunda Parte **20**
1.9 Sistema inmune de las plantas 20
1.10 Importancia del fluido apoplástico en la interacción con patógenos 23
1.11 Efectores patogénicos bacterianos 26
1.12 Efectores patogénicos de hongos 28

2. Capítulo 2 ..... **33**

Metodología **33**
2.1 Objetivo 1. Estandarizar una metodología para la extracción de fluido apoplástico de foliolos de *H. brasiliensis* 33
2.1.1 Identificación del material vegetal 33

2.1.2 Estandarización de la extracción del fluido apoplástico a partir de foliolos de *H. brasiliensis*.....35
2.2 Objetivo 2 Identificar moléculas candidatas a proteínas efectoras de *M. ulei* en el fluido apoplástico de *H. brasiliensis* posinfección.....43
2.2.1 Aislamiento e identificación de *M. ulei*.....43
2.2.2 Pruebas de patogenicidad en condiciones controladas.....44
2.2.3 Aislamiento del Fluido Apoplástico de *H. brasiliensis* Posinfección.....45
2.2.4 Visualización de las proteínas presentes en el fluido apoplástico.....46
2.3 Objetivo 3 Identificar mediante función putativa genes codificantes de proteínas efectoras descritas en fitopatógenos de la clase de los Dothideomycetes, en la interacción *H. brasiliensis* - *M. ulei*.....48
2.3.1 Extracción y Cuantificación de RNA total.....48
2.3.2 Tratamiento del RNA con la Enzima DNasa.....48
2.3.3 Síntesis de cDNA.....48
2.3.4 Verificación del cDNA.....49
2.3.5 Amplificación de genes codificantes de proteínas efectoras descritos en fitopatógenos de la clase de los Dothideomycetes presentes en la interacción *H. brasiliensis* - *M. ulei*.....49

Resultados y discusión.....51

3. Capítulo 3.....51
3.1 Objetivo 1. Estandarizar una metodología para la extracción de fluido apoplástico de foliolos de *Hevea brasiliensis*.....51
3.1.1 Identificación varietal del material vegetal.....51
3.1.2 Estandarización de la extracción del Fluido Apoplástico a partir de foliolos de *H. brasiliensis*.....53

Discusión.....72

4. Capítulo 4.....77
4.1 Objetivo 2. Identificar moléculas candidatas a proteínas efectoras de *M. ulei* en el fluido apoplástico de *H. brasiliensis* posinfección.....77
4.1.1 Identificación de *M. ulei*.....77
4.1.2 Desarrollo de la enfermedad.....80
4.1.3 Aislamiento del fluido apoplástico de *H. brasiliensis* posinfección.....81
4.1.4 Cambio de buffer y concentración del fluido.....82
4.1.5 Visualización de las proteínas presentes en el fluido apoplástico.....82

Discusión.....90

5. Capitulo 5.....93
5.1 Objetivo 3. Identificar mediante función putativa genes codificantes de proteínas efectoras descritas en fitopatógenos de la clase de los Dothideomycetes, en la interacción *H. brasiliensis* - *M. ulei*.....93
5.1.1 Extracción de RNA.....93
5.1.2 Verificación del cDNA.....94
5.1.3 PCR de los genes codificantes de proteínas efectoras seleccionados.95

Discusión.....99

6. Conclusiones generales 101

A. Anexo: Medios de cultivo para trabajo in vitro de *M. ulei* 103

B. Anexo: Escala de Intensidad de esporulación (IE) 105

C. Anexo: Producto de secuenciación de ITS 107

D. Anexo: Protocolo de Extracción de RNA total con CTAB 109

E. Anexo: Productos de secuenciación 111

F. Anexo: Productos académicos 113

Bibliografía 117

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Estadíos foliares de *H. brasiliensis*.....6
Figura 1-2: Extracción de látex. Sangrado del árbol *H brasiliensis*.....8
Figura 1-3: Modelo de zigzag.....22
Figura 1-4: Diagrama de vías de transporte al interior de la célula vegetal.. 24
Figura 1-5: Modelo gen guardián. 28
Figura 2-1: Observación estereoscópica de insecto plaga. 35
Figura 2-2 Aditamentos de los sistemas de Infiltración evaluados.....38
Figura 2-3: Inmersión de foliolos en buffer de infiltración.. 41
Figura 2-4: Sistemas de centrifugación. 42
Figura 3-1: Perfil electroforético obtenido con el microsatélite AY486754 amplificado en los clones FX 3864 y RRIM 600, electroforesis capilar.....52
Figura 3-2: Perfil electroforético obtenido con el microsatélite AY486866 amplificado en el clon RRIM 600, electroforesis en gel de poliacrilamida 7%. 52
Figura 3-3: Perfil electroforético obtenido con el microsatélite AY486866 amplificado en el clon FX 3864, electroforesis en gel de poliacrilamida 7%.....53
Figura 3-4: Sistema de infiltración final.....62
Figura 3-5: Infiltración. 63
Figura 3-6: Sistemas de centrifugación.. 65
Figura 3-7: SDS PAGE Perfiles proteicos. 71
Figura 3-8: Esquema de metodología de infiltración estandarizada para extracción de fluido apolastico de foliolos de *H. brasiliensis* en estadio C.....76
Figura 4-1: Estructuras macro y microscópicas de *M. ulei* in vitro. 78
Figura 4-2: Amplímeros de la región ITS.....79
Figura 4-3: Formato de salida Blastn. 79
Figura 4-4: Síntomas de la infección. Foliolos del Clon RRIM 600 a los 9 y 12 días posinoculación con el aislamiento de *M. ulei* GCL08112014.....80
Figura 4-5: Síntomas de la infección. Foliolos del Clon RRIM 600 a los 15 días pos inoculación con el aislamiento de *M. ulei* GCL08112014. 81
Figura 4-6: Gel bidimensional Proteínas presentes en el fluido apoplástico de *H. brasiliensis*. IEF (pH 4-7). SDS-PAGE al 16%. Teñido con Azul de Coomassie.....84
Figura 4-7: Gel bidimensional Proteínas presentes en el fluido apoplástico de *H. brasiliensis*. IEF (pH 3-10). SDS-PAGE al 16%. Teñido con Azul de Coomassie.....85

Figura 4-8: Gel bidimensional de fluido apoplástico de la hoja de *H. brasiliensis.* IEF (pH 6-10). SDS-PAGE al 16%. Teñido con Azul de Coomassie.. 87
Figura 5-1: Visualización de RNA. 93
Figura 5-2: Amplificación del factor de elongación en cDNA y DNA de *H. brasiliensis*.... 94
Figura 5-3: Amplificación de los genes *ECP6*, *ECP7* y TDFMu1 95
Figura 5-4: Alineamientos significativos de la secuencia de nucleótidos de CD12EP. 97
Figura 5-5: Alineamientos significativos de la secuencia peptídica de CD12EP. 98
Figura 6-1: Escala de evaluación de intensidad de esporulación (IE). 106

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2-1: Primers usados para la evaluación de la identidad de los clones de caucho natural. **34**
Tabla 2-2: Secuencias de primers utilizados para la evaluación del cDNA. **50**
Tabla 3-1: Parámetros de peso y largo de hojas de *H. brasiliensis.* **54**
Tabla 3-2: Parámetros reportados para extracción de fluido apoplástico en diferentes especies vegetales. **55**
Tabla 3-3: Cálculo de presión de vacío I. **60**
Tabla 3-4: Cálculo de presión de vacío II. **62**
Tabla 3-5: Gravedades evaluadas para *H. brasiliensis.* **66**
Tabla 3-6: Gravedades de centrifugación evaluadas para *H. brasiliensis.* **68**
Tabla 4-1: Concentración de fluido apoplástico obtenido. **81**
Tabla 4-2: Cambio de buffer y concentración de fluido apoplástico. **82**
Tabla 4-3: Características de los spots observados en los fluidos apoplásticos evaluados. **88**

Lista de abreviaturas

Abreviatura	**Término**
AFLPs	*Amplified fragment length polimorphism*
ASTM	American Society for Testing and Materials
Avr	Avirulence
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bulked segregant analysis
CCC	Confederación Cauchera Colombiana
cDNA	Deoxyribonucleic acid copy / complementary DNA
CDC 32	Clon de *Hevea brasiliensis*
CfCE	*C. fulvum* Candidate Effector
CIRAD	Centre de Cooperation Internationale en Researche Agronomique pour le Développement
CORPOICA	Corporación colombiana de Investigación Agropecuaria
DE	Densidad de estromas
DEG	Degenerado primer
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DL	Diámetro de la lesión
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNasa	Desoxirribonucleasa Enzyme
dNTPs	Deoxynucleotides
Ecp	Extracellular protein
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
EFR	EFR
ET	Etileno
ETI	Effector triggered immunity
FLS2	Flagellin sensing 2
F	Material vegetal de la empresa Firestone, serie F (Ford)
FE	Factor de elongación
FDR	Material vegetal producto de cruces de la serie F con clones asiáticos (Firestone Dothidella Resistant)
FX 2784	Material vegetal producto de cruces de clones asiáticos y material de la serie F
g	Gravedad
GCL	Clon GT1-Corpoica La libertad
G6PDH	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
GenBank	Database of gene
ha	Hectáreas
HR	Hypersensitive response
HopAI1	Pseudomonas syringae effector
IA	Intensidad de ataque

IAN	Instituto de pesquisas Agropecuarias
IBUN	Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional
INCORA	Instituto Colombiano de la Reforma Agraria
IRSG	International Rubber Study Group
IE	Intensidad de esporulación
IEF	Isoelectroenfoque
ITS	Internal transcribed spacer
IRSG	*International Rubber Grup*
kDa	kilodalton
LRR	Leucine Rich Repeat
LysM	lysin motif
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem-mass spectrometry
MAPKs	Mitogen Activated Protein Kinases
M4	Medio de cultivo para crecimiento de *M. ulei*
MAMPs	Microbe associated molecular patterns
MDF 180	Material vegetal de la plantación Madre de Dios. Perú
MDH	Malato deshidrogenasa
MgCl2	Cloruro de magnesio
Min	Minutos
NaCl	Cloruro de sodio
NaH2PO4. H2O	Sodium Dihydrogen Phosphate Monohydrate
NaH2PO4	Sodium Dihydrogen Phosphate
NBS - LRR	Nucleotide binding site *Leucine-rich repeat*
NCBI	National center for Biotechnology information
PB	Clon de *Hevea brasiliensis* Prang Besar
pH	Potencial de hidrogeniones
PCR	Polymerase chain reaction
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PDA	Potato dextrose agar
PGIPs	Poligalacturonasas
PR	Pathogensis related
PRRs	Pattern recognition receptors
PTI	PAMP triggered immunity
QTL	Quantitative trait loci
qRT-PCR	*quantitative Reverse transcription - polymerase chain reaction*
R	Resistance gene
RCF	Relative Centrifugal Force
RGAs	Resistance Gene Analogues
RIN4	Proteína de la membrana plasmática de Arabidopsis
RLP	Receptor like proteins
RNA	Acido Ribonucleico
ROS	Reactive Oxigen Species
RPM1	Resistance gene to *Pseudomonas syringae*
RPS2	*Resistance gene to Pseudomonas syringae*
RRIM	Rubber Research Institute of Malaysia
RRIM 600	Clon de *Hevea brasiliensis* Rubber Research Institute of Malaysia
RXRL	conserved motif, termed for Arg, (X) any amino acid, Leu, Arg
SALB	South american leaf blight

SDS	Sodio dodecil sulfato
SINCHI	Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas
Seg	Segundos
TDFMu1	Transcript derived fragments of *M. ulei*
TDFs	Transcript derived fragments
TE	Buffer Tris HCl, EDTA
TLE	Tris HCl, LiCL, EDTA
TTO	Tratamiento
Tris- HCl	Hidroximetil aminometano clorhidrato – ácido clorhídrico
TTSS O T3SS	Type three secretion system
TWEEN 80	monooleato de polioxietilen(20)sorbitano, opolisorbato 80
WRKY	*transcription factor*
2D	Two dimensional gel electrophoresis
µM	Micromolar
µl	Microlitro

Introducción

Hevea brasiliensis es un árbol originario del Amazonas del cual se extrae una resina líquida denominada látex, sustancia que posee características importantes tales como elasticidad y resistencia al desgaste lo cual le permite ser una materia prima de predilección en la elaboración de diversas aplicaciones industriales, siendo empleado principalmente en la producción de neumáticos (Compagnon, 1998), pinturas, jabones y biodiesel (Bello & Otu, 2015). Los mayores productores de caucho natural son los países del sureste asiático, quienes proveen el 92.2% de la producción mundial, seguidos por áfrica con un aporte del 5.7% y Latinoamérica donde países como Brasil y Guatemala siendo los mayores productores solo aportan el 2% (FAO, 2016).

Colombia a pesar de no ser un país exportador, posee una larga tradición cauchera que se remonta al año 1850 (Castellanos, Fonseca, & Barón, 2009). Según el último informe del censo nacional cauchero realizado en el 2015 existen en el país 53.223,3 ha sembradas con este cultivo, de las cuales según datos estimados 5.267,8 ha no pudieron ser censadas por dificultades en el acceso a dichas zonas, 3.263 ha se encontraban en etapa de producción y 44.692,15 ha en etapa de mantenimiento, de estas últimas 2.993 fueron sembradas en el año 2015 y se estima entren en producción para el año 2024. De las hectáreas restantes se espera que para el 2016 en condiciones ideales, 16.111,5 ha entren en etapa de aprovechamiento. La producción hasta el año 2015 de las hectáreas en aprovechamiento correspondió a 2.664,8 toneladas de caucho seco, siendo el departamento de Santander donde se registró la mayor producción nacional con 1.153,5 toneladas (Confederación Cauchera Colombiana, 2016).

En Latinoamérica el principal problema del cultivo de caucho es la enfermedad denominada Mal Suramericano de la hoja del caucho que es causada por la infección del hongo ascomycete *Microcyclus ulei* (P. Henn.) v., que únicamente infecta plantas del género *Hevea* spp. La infección sucesiva de este patógeno causa daños irreparables debido a la muerte del material vegetal. En viveros y jardines clonales la enfermedad se

disemina rápidamente produciendo la caída prematura de las hojas, reducción en el crecimiento de las plantas, y la disminución en el porcentaje de yemas que podrían ser injertadas (Gasparotto, Santos, Pereira, & Ferreira, 2012). En árboles adultos la infección puede causar la muerte regresiva de las ramas facilitando infecciones secundarias de otros patógenos. Produce pérdida de las hojas en el árbol, lo cual limita la actividad fotosintética y reduce la producción del látex (García-Romero, Castro, Aristizábal & Tapiero, 2011; Gasparotto *et al.,* 2012; Guyot & Eveno, 2015). Esta enfermedad ha ocasionado grandes pérdidas económicas que han sido reportadas a lo largo de la historia del cultivo de caucho natural en toda Latinoamérica (Gasparotto *et al.,* 2012).

Los esfuerzos científicos se han encaminado en la búsqueda de nuevas estrategias de control de la enfermedad pues las medidas de control químico efectivas en viveros y jardines clonales, representan altos costos a nivel de plantación con un impacto ambiental negativo para las zonas aledañas (Suarez, Molina, & Furtado, 2015). Alianzas internacionales como el programa CIRAD-Michelin-Brasil (CMB) creado en 1992, se encargan de realizar la selección de clones de *H. brasiliensis* resistentes al SALB con producción rentable (Chandra *et al.,* 2016), basados en el conocimiento del potencial agronómico de los parentales y la segregación de los rasgos de resistencia en la progenie (Rivano *et al.,* 2013).

Esta enfermedad se limita a América Latina y aunque nunca se ha observado en otras partes del mundo, preocupa fuertemente a los países asiáticos el ingreso de este microorganismo a dicha región, pues las variedades de caucho natural allí cultivadas son susceptibles al patógeno y su economía depende en gran parte de la exportación del caucho natural (Koop *et al.,* 2016). Para evitar la diseminación del patógeno y prevenir pérdidas económicas similares a las reportadas en Brasil, Panamá, Costa Rica y Colombia (Gasparotto *et al.,* 2012) se incluyó a *M. ulei* en la lista de armas biológicas potenciales de la UNODC (de las siglas en ingles *United Nations Office on Drugs and Crime)* (Madden & Wheelis, 2003; Lieberei, 2007).

En Colombia, instituciones nacionales como CORPOICA y SINCHI han evaluado clones promisorios de *Hevea* de origen americano y asiático que pudieran ser usados en el territorio nacional (Castellanos *et al.,* 2009). Según la evaluación de incidencia y severidad ante la infección de aislamientos nativos de *M. ulei* realizada en el Magdalena

medio Colombiano por Suarez *et al.,* (2015) clones altamente productivos de diferentes países como el CDC 312 de Guatemala, los clones FDR 4575, FDR 5597, FDR 5788 de Brasil y el clon MDF 180 de Perú, presentaron fenotipos de resistencia total al SALB (no presentaron lesiones esporuladas, limitadas zonas de infección, ausencia de defoliación), los clones FX 3864 de Brasil y CDC 32 de Guatemala, presentaron resistencia parcial (fenotipo de infección susceptible con reducidas tasas de epidemia) y los clones asiáticos RRIM 901, PB 260 y PB 235 presentaron fenotipos de susceptibilidad (todas las características propias del SALB con epidemias severas) (Sterling, Rodríguez, Quintero & Correa, 2009; Suarez *et al.,* 2015).

Sin embargo, la pérdida de la resistencia es relativamente rápida, por lo cual las perspectivas de siembra de clones resistentes no son tan alentadoras como se esperaba en un principio. Por ejemplo García-Romero y colaboradores (2011) reportaron la transición del clon FX 3864 de resistente a sensible en zonas de escape ubicadas en la altillanura Colombiana, en períodos menores a 5 años tras su expansión comercial (García-Romero *et al.,* 2011; Sterling *et al.,* 2009).

El grupo de investigación de caucho natural del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN) reportó 48 fragmentos de DNA complementario (cDNA) expresados diferencialmente durante la interacción planta patógeno, denominados fragmentos derivados de la transcripción (TDFs), basado en el estudio de los clones FX 3864, IAN 710 (resistentes) y RIMM 600 (susceptible) inoculados en condiciones controladas con el aislamiento de *M. ulei* GCL009, utilizando técnicas de cDNA-AFLPs (del inglés amplified fragment length polymorphism) y qRT-PCR (del inglés real-time polymerase chain reaction). Algunos de estos TDFs presentaron similaridad a dominios de resistencia NBS (del inglés nucleotide binding site) y LRR (del inglés leucine-rich repeat) presentes en otras especies vegetales. Uno de los TDFs expresados por el hongo y denominado TDFMu1, presentó similaridad a la proteína efectora extracelular Ecp5 de *Cladosporium fulvum* (hongo patógeno de tomate), el cual también se encontró en el DNA de *M. ulei* (García-Romero*,* 2012).

Teniendo en cuenta este último avance se hace necesario profundizar en el conocimiento de los factores asociados a patogenicidad presentes en el hongo y los genes codificantes de proteínas de resistencia presentes en la planta, que contribuyan al direccionamiento

de los programas de mejoramiento y conlleven en un futuro a implementar estrategias de control basadas en el conocimiento molecular del patógeno y la planta (Lieberei, 2007). Con este proyecto se pretende identificar moléculas candidatas a proteínas efectoras o de avirulencia (Avr) extracelulares, expresadas durante la interacción *H. brasiliensis* – *M. ulei in vivo* en condiciones controladas, para ampliar el conocimiento de los factores asociados a patogenicidad del hongo en este patosistema.

1. Capítulo 1

Marco Teórico

Primera Parte

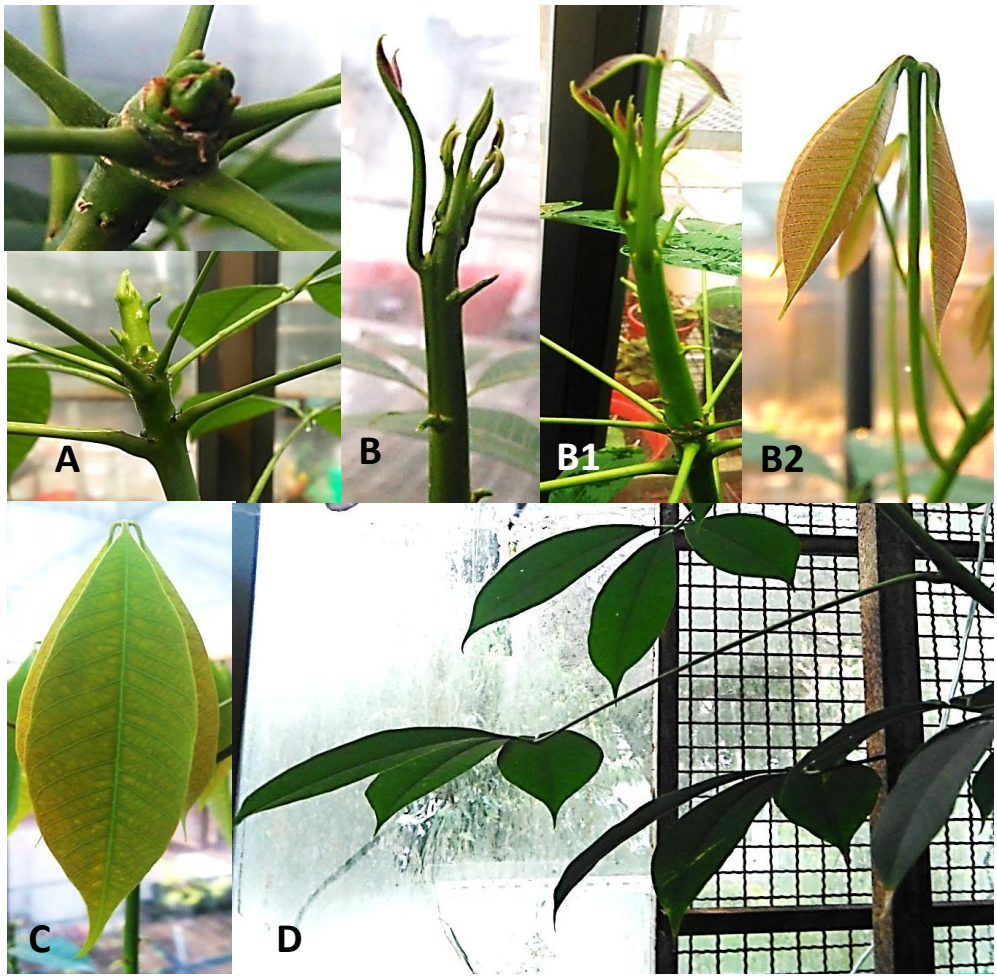
1.1 El caucho natural

El árbol de caucho natural (*Hevea* sp.) es originario de la región Amazónica, pertenece al Orden Euforbiales, familia Euphorbiácea, género *Hevea*. Dentro del género *Hevea* se destacan las especies *H. brasiliensis, H. benthamiana, H. spruceana, H. guianensis* y *H. pauciflora* entre otras (Lieberei, 2006). El principal representante es la especie *Hevea brasiliensis* (Willd. ex Adr. L Juss.) Müll.Arg que es aprovechado comercialmente (Venkatachalam, Geetha, Sangeetha & Thulaseedharan, 2013). Su cultivo se originó en la cuenca del río Amazonas y actualmente se encuentra distribuido en Asia, África, América Central y Suramérica. Es un árbol perenne que en cultivo puede alcanzar hasta 20 metros de altura, su tronco es cónico pero injertado es cilíndrico, posee hojas trifoliadas y flores, el fruto es una cápsula triceldada con una semilla en cada celda. Se siembra en altitudes que van desde los 0 a 1.200 m.s.n.m., con una precipitación entre 1.500 y 2.500 o 3.000 mm anuales, con períodos secos de 2 a 3 meses, requiere 1.500 a 1.800 horas-luz por año y humedad relativa >80% (Compagnon, 1998).

La planta de *H. brasiliensis* presenta 4 estadíos foliares (Figura 1-1) que se denominan: Fase A – brote sin hojas, escamas preformadas dentro del brote terminal, que se abren y aparece la unidad de crecimiento a los 9 días. Fase B – crecimiento, (B1) se observa una rápida elongación de los entrenudos y (B2) los foliolos tiene un color rojizo (antociáninas) con un limbo enderezado verticalmente muy reducido, esta fase dura once días (11) en los cuales el color rojo se atenúa. El anterior estadío se encuentra descrito en la literatura para desarrollo de pruebas de patogenicidad en hojas de *Hevea* spp (Mattos, García,

Pinard & Le Guen, 2003; Le Guen, Guyot, Mattos, Seguin & García, 2008), esto debido a la baja concentración de lignina y celulosa en las paredes celulares, lo cual lo convierten en un estadío foliar altamente susceptible a la penetración del hongo. Fase C – maduración foliar, rápido crecimiento de los limbos, que siguen colgantes del peciolo, son de color verde claro y flácidos. Esta fase dura diez días (10). Fase D – dormancia, los limbos se endurecen y empiezan a enderezarse (Compagnon, 1998; Sambugaro, 2007).

Figura 1-1: Estadíos foliares de *H. brasiliensis*. Crecimiento y desarrollo en condiciones de invernadero IBUN.



El árbol tiene una vida comercial de hasta 50 años, dependiendo de las condiciones de nutrición, fertilización, manejo de plagas, enfermedades y condiciones climáticas. Su principal producto es el látex, sustancia que emana de los cortes en la corteza del árbol (Figura 1-2), el cultivo se realiza en 3 etapas: vivero, jardín clonal y plantación en campo, en esta última los árboles pueden clasificarse de acuerdo a su etapa productiva como árboles en mantenimiento, menos de 6 años de crecimiento o árboles con un diámetro de tronco inferior a 45 cm y corteza de espesor inferior a 6mm y árboles productivos de 5 - 6 años de crecimiento, troncos con diámetro superior a 45 cm y corteza de espesor igual o superior a los 6 mm (García-Romero *et al.,* 2013).

El látex es utilizado a nivel industrial y artesanal, como un producto comercial llegó a conocerse en 1838 cuando Charles Goodyear desarrolló el proceso de vulcanización, pero con el invento de la llanta neumática en 1888 y en consecuencia con la producción masiva de automóviles, cobró real importancia debido al incremento de su demanda (Alvim, 1982). Sin embargo, el apoyo a las plantaciones de caucho se redujo considerablemente en las décadas de 1980 y 1990 debido a la producción de caucho sintético derivado del petróleo (Grist & Menz, 1995). Pese a ello, en los últimos años la fluctuación de los precios del petróleo así como el aumento de las materias primas derivadas de los hidrocarburos, han influido en el incremento de los precios del caucho sintético en el mercado mundial, razón por la cual, la industria trasformadora ha derivado nuevamente su interés en el caucho natural como sustituto de algunas aplicaciones sintéticas (Bello & Otu, 2015).

Actualmente el caucho natural se emplea a nivel mundial para la manufactura de preservativos y guantes quirúrgicos, así como en la producción de neumáticos de mayor seguridad debido en parte a sus características fisicoquímicas, las cuales no han podido ser remplazadas por los polímeros sintéticos (Jasso, Palma, Rojo, Vargas & Velázquez, 2003). El caucho natural es una materia prima que puede encontrarse en el mercado en cualquiera de sus dos formas básicas: líquida o látex, y sólida o caucho seco. La norma ASTM (de las siglas en ingles *American Society for Testing and Materiales*) D2227-96 (ASTM-International, 2011) estipula las especificaciones técnicas para el caucho natural, clasificándolo según la evaluación de sus características físicoquímicas, con base a esto se pueden encontrar en el mercado diferentes presentaciones de caucho: El líquido que se clasifica según el método de obtención en preservado, cremado o centrifugado y seco

del cual hay diferentes presentaciones. I) láminas secas al aire (ADES), II) láminas ahumadas (RSS), III) caucho granulado que dependiendo de la presentación puede ser laminado tipo crepe o bloques compactos (TSR-20) y tipo ripio considerado caucho de menor calidad conformado por los fondos de taza y sobrantes del proceso (Castellanos *et al.,* 2009).

Figura 1-2: Extracción de látex. Sangrado del árbol *H brasiliensis* Cortesía Procaucho Santander

1.2 Mayores cultivadores de caucho natural en el mundo

Brasil fue considerado como el mayor productor de caucho natural en el mundo solo hasta 1913 siendo desplazado posteriormente por países asiáticos, debido en parte a que en 1876 el explorador británico Henry Wickham recolectó al menos 70.000 semillas de *H. brasiliensis* de la región de Tapajós (Brasil) y las llevó al jardín botánico Real de Kew (Inglaterra), donde germinaron y sobrevivieron solo el 4%, posteriormente las plántulas fueron enviadas a la colonia inglesa Ceilán (Sri Lanka en la actualidad) donde se establecieron las primeras plantaciones de caucho natural (Alvim, 1982; Sepulveda, 1995; Rivano *et al.,* 2015). Para el año 2015 la producción mundial de caucho natural fue de 12.277.000 millones de toneladas (IRSG, 2016) generadas principalmente en el Sureste asiático con el 93% de la producción total, seguido de África con un 4,5% y un 2,5% de América Latina (IRSG, 2016; Rivano *et al.,* 2015). Países como Brasil y

Guatemala son los principales productores latinoamericanos, producen 178.500 toneladas / año y 93.600 toneladas / año, respectivamente. Bolivia, Ecuador, México y Perú tan solo producen aproximadamente 40.000 toneladas anuales de caucho natural (García-Romero *et al.,* 2013).

1.3 Historia y comportamiento actual del caucho natural en Colombia

Colombia, aunque no es un país exportador de caucho, posee una larga tradición cauchera. La explotación de caucho negro se inició hacia 1850 en las regiones cercanas a la costa Atlántica, expandiéndose en la región del Pacífico y en el interior del país en regiones como el Magdalena medio, Tolima, Caquetá y los Llanos orientales. En 1890 la explotación del caucho en zonas fronterizas con Brasil y Perú dio comienzo a los primeros tropiezos territoriales. En 1900 en el putumayo empieza la esclavización de indígenas, para 1907 se denuncian los malos tratos y condiciones de trabajo que se practicaban en la casa Arana propiedad de Julio César Arana dueño de The Peruvian Amazon Company, en 1911 se retira el apoyo económico de los inversionistas ingleses a esta compañía, a causa de las denuncias de genocidio y tortura que se practicaban en la casa Arana contra los indígenas dela región.

Sin embargo para 1920 el manejo extractivo del caucho, el derrumbamiento de árboles y el mal control del material forestal causaron el rápido deterioro de estas zonas. A ello se adicionó el decaimiento de la explotación en la región del Amazonas debido al descenso del precio internacional generado por la aparición de las plantaciones de caucho del continente asiático en los inicios del siglo XX. Entre 1960 y 1990 el Instituto Colombiano de la Reforma Agraria (INCORA) inició con cultivos de caucho en Caquetá, Meta, Guaviare y Putumayo (Sepulveda, 1995) y la empresa privada estableció algunos proyectos caucheros en los departamentos de Arauca, Casanare y Magdalena Medio (Castellanos *et al.,* 2009).

En Colombia para el 2015 se reportó la existencia de un área cultivada de 53.223,3 ha de caucho natural, el departamento con más hectáreas sembradas fue el Meta con 19.033,4 ha, seguido por los departamentos de Santander con 8.827,9 ha, Vichada con 8.486 ha, Caquetá con 4.534,9 ha y Antioquia con 4.247,2 ha (Confederación Cauchera

Colombiana, 2016) Actualmente existen 6405 pequeños productores (< 50 ha) que representan 22.715,2 ha es decir el 43% del área de cultivo nacional presente en los 17 departamentos caucheros. 126 medianos productores (50 y 500 ha) que representan 19.131,5 ha (36%) y se encuentran localizados en los departamentos del Norte de Santander, Tolima, Cundinamarca, Caquetá, Meta, Antioquia, Caldas, Vichada y Casanare. 13 grandes productores (> 500 ha) que en total poseen 11.376,6 ha (21%) de la producción nacional, ubicados en los departamentos de Meta y Vichada (Confederación Cauchera Colombiana, 2016).

De las 53.223,3 ha de caucho sembradas en el país, tan solo 3.263 ha se encuentran en etapa de producción, de ellas el producto que más se extrae es el coágulo de campo, en el 2015 se reportaron 808,6 toneladas de caucho seco, más las toneladas necesarias para la producción de materias primas a través de procesos agroindustriales como la producción de caucho TSR (387,1 toneladas) y la producción de Caucho CREPE (269,3 toneladas), de lamina de caucho se reportaron 341 toneladas, seguidas de 772,7 toneladas de látex liquido y aproximadamente 86 toneladas de coagulo de taza. Lo que puede resumirse en un total de 2.664,8 toneladas de caucho seco producidas en Colombia (Confederación Cauchera Colombiana, 2016). Sin embargo el caucho natural usado en la producción industrial nacional es importado desde países como Indonesia, Malasia y Guatemala, debido a que la producción interna no es suficiente para cubrir las necesidades propias del país que corresponden a 20,2 millones de toneladas de caucho seco (Lizarralde-Montoya, 2014).

El impulso de la heveicultura por parte de la empresa privada en el departamento del Meta y los proyectos de expansión de hectáreas en los departamentos de Antioquia, Córdoba y Santander, se basa en la alta rentabilidad que este cultivo tiene a nivel mundial (Castellanos *et al.,* 2009). Sin embargo para el establecimiento de estas áreas de cultivo, ha sido necesario considerar otros aspectos como la zonificación del área que incluye parámetros como 1500 horas de sol por año, vientos máximos de 50 km/hora, adecuadas condiciones del suelo, accesibilidad a vías, disponibilidad de mano de obra además de condiciones de zona de escape al mal suramericano de la hoja del caucho (Martínez, 2005).

Es importante resaltar el notorio desarrollo que el cultivo ha tenido en cuanto al aumento de hectáreas sembradas por año, gracias a que se ha considerado como uno de los cultivos de tardío rendimiento en la apuesta exportadora agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 2006 – 2020 (Castellanos *et al.,* 2009), lo que ha conllevado al desarrollo del programa para la búsqueda y selección de clones de *H. brasiliensis* resistentes al SALB, que sean altamente productivos y puedan mantenerse en las plantaciones de diferentes zonas del país (Suarez *et al.,* 2015).

Aunque Colombia cuenta con las condiciones naturales necesarias para incrementar la producción, satisfacer la demanda interna y exportar, es necesario aumentar el número de clones de uso comercial, mejorar las prácticas de cultivo y tecnificar los procesos de extracción y recolección, que han impedido la obtención de materias primas que cumplan con los estándares internacionales requeridos en la industria automotriz y le han restado competitividad al caucho colombiano (Castellanos *et al.,* 2009; Martínez, 2005).

1.4 Plagas y enfermedades del cultivo de caucho de importancia económica

1.4.1 Enfermedades del cultivo

En cultivos comerciales de caucho natural alrededor de doce enfermedades son catalogadas como de importancia económica tales enfermedades afectan diferentes partes del árbol (raíz, foliolos, inflorescencias, frutos, tallo y panel de sangría) y son causadas principalmente por hongos y oomicetes. Según el modelo productivo para el cultivo de caucho natural de la Orinoquía Colombiana las enfermedades foliares son las más importantes, pues se han presentado mayor número de reportes de su incidencia en Centro y Suramérica (Gasparotto *et al.,* 2012; Rivano *et al.,* 2015; Sterling & Melgarejo, 2014). En Latinoamérica la enfermedad foliar con mayor descripción encontrada debido a la gran cantidad de pérdidas ocasionadas en plantación y vivero, es el mal suramericano de la hoja del caucho o SALB (por sus siglas en inglés: South American Leaf Blight), causada por el ataque del hongo ascomyceto *Microcyclus ulei* (García-Romero, Aristizábal, & Castaño, 2006). Sin embargo en la Altillanura de la cuenca del Orinoco, Colombiano, Castro (2011) reportó que la enfermedad foliar de mayor importancia es la Antracnosis que causa lesiones, defoliación y mortalidad en ramas y gajos jóvenes del

árbol y es ocasionada por diferentes especies de los complejos *C. gloeosporioides, C. boninense* y *C. acutatum* (Castro, 2011).

Otras enfermedades foliares reportadas son: Costra negra causada por el complejo de hongos *Phyllachora hubieri* y *Rosenscheldiella* sp. que afecta foliolos maduros y en ataques severos causa defoliamiento precoz. Mancha aerolada causada por el hongo basidiomycota *Thanateporus cucumeris* que provoca la caída prematura de las hojas. La Requema o caída tardía de las hojas causada por diferentes especies del oomycete *Phytopthora* sp. La Mancha de *Corynespora* causada por el hongo imperfecto *Corynespora cassiicola* y finalmente El perdigón también denominada Mancha ojo de pájaro, esta enfermedad es causada por el hongo *Drescherela heveae* y se ha reportado en todas las regiones donde el caucho es cultivado, sin embargo solo en Asia esta enfermedad tiene importancia económica (García-Romero *et al.,* 2013).

Dentro de las enfermedades asociadas al tronco se encuentran: La raya negra ocasionada por *Phytophtora palmívora*. El mal rosado o Rubéola que puede afectar el crecimiento circular del tallo y tiene alta incidencia en los períodos de sangría, ocasionada por *Ceratocystis fimbriata* y La pudrición del tallo, Muerte descendente o Chancro de injerto ocasionado por *Lasiodiplodia theobromae.* El control de algunas de estas enfermedades del tallo se realiza mediante la aplicación de fungicidas de origen químico o mediante la implementación de métodos de control, sin embargo estas enfermedades presentan menor incidencia en América (García-Romero *et al.,* 2013).

1.4.2 Plagas del cultivo

Los principales insectos plaga corresponden al gusano cachón (*Erinnys ello*) y el chiche de encaje (*Leptopharsa heveae*). Otros considerados como secundarios son, la hormiga arriera (*Atta* sp) y el comején blanco o termitas (*Coptotermis curvignathus*). El control y manejo incluye el uso de productos químicos y en algunas ocasiones se emplean otros microorganismos como controladores biológicos (García-Romero *et al.,* 2013; Sterling *et al.,* 2009). Algunos de los productos químicos más usados son ABOTECK y NITRAXS de fabricación colombiana (Abonos Colombianos S.A), Cal Dolomita, Lorsban, Arrierafin o

Sumithion (en el caso de la hormiga arriera), Dimecron para el comején blanco (Castellanos *et al.,* 2009; García-Romero *et al.,* 2013).

1.5 Mal suramericano de la hoja del caucho

En Latinoamérica el principal problema del cultivo de caucho y la razón principal de la diferencia observada entre la productividad de los países asiáticos es la presencia del Mal Suramericano de la hoja del caucho, causado por la infección del hongo *M. ulei* (Henn.) Arx (Ascomycota) (sin. *Pseudocercospora ulei*) (da Hora *et al.,* 2014). *M. ulei* es endémico de Latinoamérica, es un hongo biotrófico especializado que infecta únicamente algunas especies del género *Hevea*, entre ellas *H. brasiliensis*, *H. benthamiana, H. spruceana, H. guianensis y H. pauciflora* (García-Romero *et al.,* 2006; Guyot & Eveno, 2015; Lieberei, 2006; Suarez *et al.,* 2015). Para el desarrollo de la enfermedad se requiere de temperaturas superiores a 25+/-2 °C y humedad relativa superior al 85% con precipitaciones de 3800 mm/año, simultáneamente debe coincidir con el período de refoliación y la presencia de fuentes de inóculo primario.

La infección del patógeno ocurre en el estadío foliar B, donde por la deficiencia de lignina el crecimiento de la pared celular y el endurecimiento de la misma se ve retardado, lo cual provoca que las hojas en fases A y B sean altamente susceptibles a la infección, mientras que hojas en fase D (correspondientes a la fase adulta) presentan resistencia a la penetración del hongo (García-Romero *et al.,* 2006; García, Troispoux, Grance, Rivano & d'Auzac, 1999; Lieberei*,* 2007; Sambugaro, 2007).

En viveros y jardines clonales éste se disemina de forma acelerada y ocasiona la caída prematura de las hojas, afectando el crecimiento de las plantas y provocando una disminución en el porcentaje usado como patrón y yemas en condiciones de ser injertadas. En árboles adultos la pérdida de las hojas limita la actividad fotosintética, y la defoliación prematura reduce la producción del látex entre un 20 a un 75% (Gasparotto *et al.,* 2012). En clones susceptibles en la cara abaxial de los foliolos y en presencia de una capa de agua las conidias o ascosporas germinan, la penetración ocurre durante las primeras horas de infección a través de un hifa infectiva, con o sin formación de apresorio (Lieberei, 2007) posteriormente se desarrolla la elongación de las hifas por el espacio

apoplástico (tercer y quinto día) con la subsecuente formación de pseudohifas (García-Romero, 2012).

A medida que el hongo coloniza el tejido, aparecen lesiones en hojas, tallos, flores y frutos jóvenes, las cuales corresponden a manchas de color café de tamaño variable, que se esparcen sobre toda la hoja y se observan sobre la cara inferior (De Araujo, Kalil, Nogrega, Sousa & dos Santos, 2001; García-Romero *et al.,* 2013; García-Romero *et al.,* 2006; Sterling *et al.,* 2009). La enfermedad devasta las plantaciones en un período de 5 a 6 años ya que los daños por defoliación sucesiva y las consecuencias por muerte descendente son difíciles de controlar, las plantaciones terminan por ser abandonadas (Gasparotto *et al.,* 2012). Con base en estimativos para árboles en etapa productiva, una defoliación superior al 20% implica además del riesgo de muerte de la planta, una reducción en producción de látex superior al 75% (Burgos, Moreno, & Rojas, 2006).

1.6 Morfología y fisiología de *M. ulei*

El hongo *M. ulei* (P. Henn.) v. Arx., pertenece al Dominio: Eukaryota Reino: Fungi Phylum: Ascomycota Subdivisión: Pezizomycotina Clase: Dothideomycetes Orden: Capnodiales Familia: Mycosphaerellaceae Género: *Microcyclus* Especie: *ulei*. La clasificación taxonómica del hongo se ha realizado con base en la forma perfecta o fase telomórfica (sexual) que es la correspondiente a *M. ulei*, ahora reportada como *Pseudocercospora ulei* en base a los estudios de relaciones filogenéticas de secuencias de DNA y rRNA (da Hora *et al.,* 2014).

La fase anamórfica o conidial (asexual) es denominada *Fusicladium heveae* (Schubert, Ritschel, & Braun, 2003), las conidias se forman de manera individual, son curvadas, lisas e hialinas, con el tiempo adquieren una coloración grisácea o verde olivo; son generalmente septadas, llegando a medir entre 15-65 x 6-11 µm. Son producidas en grandes cantidades y se diseminan a través de la lluvia o el viento siendo estas las formas de diseminación del inóculo tanto dentro de la plantación así como entre plantaciones separadas por grandes distancias (Gasparotto, Lieberei, & Trindade, 1984; Schubert *et al.,* 2003). 24 días posinfección aparecen los estromas estos son estructuras superficiales que presentan formas globosas, carbonosas, que pueden ser de color café

o negro, los cuales generalmente se encuentran en la parte adaxial de las hojas formando aros alrededor de las perforaciones de las hojas, con un tamaño aproximado entre 200 y 400 µm (Schubert *et al.,* 2003). En su interior se generan los picnidios y picnidiosporas característicos del estado anamórfico picnidial denominado *Aphosphaeria ulei* P. Henn., sin importancia en la diseminación del patógeno (Gasparotto *et al.,* 1984; Guyot & Eveno, 2015). La fase sexual se observa en hojas adultas, en el interior de los estromas se forman los peritecios y ascas, estas tienen forma claviforme y varían entre los 56-80 x 12-16 µm, con 8 ascosporas, consideradas como el inoculo primario, las ascosporas son de forma alargada y se observan tabicadas, su tamaño varia entre los 18-22 x 5-8 µm (García-Romero *et al.,* 2006; Gasparotto *et al.,* 2012; Schubert *et al.,* 2003) siendo estas las responsables de la sobrevivencia del patógeno en condiciones climáticas adversas.

1.7 Ciclo de vida de *M. ulei*

Su ciclo de vida tiene una duración de aproximadamente 5 meses, durante el cual desarrolla 3 tipos de esporas: conidias, picnidióforos y ascosporas. Comienza con la generación del inóculo primario que se origina de las ascosporas liberadas por los estromas presentes en hojas adultas a causa de una infección anterior, coincidiendo con el inicio del período de lluvias e incremento de la humedad relativa que llega a ser mayor a 85%. Las ascas son transportadas por el viento y la lluvia hacia los foliolos jóvenes, depositándose en la parte abaxial de la hoja, el tubo germinativo penetra la epidermis mediante la formación de apresorio el cual queda en contacto con el espacio apoplástico de la célula vegetal, germinando en un período de 12 a 24 horas (Gasparotto *et al.,* 2012).

La generación de conidias se da entre 6 y 12 días (Guyot, Condina, Doaré, Cilas, & Sache, 2014), las cuales son desprendidas del conidióforo por acción del viento y las lluvias. Después de 24 días aparecen las estructuras estromáticas alrededor y sobre las lesiones, los cuales son considerados como la estructura de resistencia del patógeno en donde se generan los picnidios y picnidiosporas que son considerados como una etapa de transición que aparece cuando la hoja llega a la madurez y son remplazadas rápidamente por los peritecios y ascosporas que se convierten en el inóculo primario para la próxima epidemia durante el período de lluvias (García-Romero *et al.,* 2006; García,

Cazaux, Rivano, & D´Auzac, 1995; Gasparotto *et al.,* 2012; Guyot & Eveno, 2015; Guyot *et al.,* 2014; da Hora *et al.,* 2014; Schubert *et al.,* 2003).

1.8 Manejo integrado del SALB

El manejo del SALB se ha venido realizando mediante el uso de productos químicos Benomil, Bavistin, Manzate, etc (Gasparotto *et al.,* 1984) que a pesar de ser eficientes a nivel de vivero y jardín clonal representan un costo significativo al momento de aplicarlos en plantación, también se han generado otras estrategias como la siembra en zonas de escape, control biológico, selección de clones resistentes y mejoramiento genético (Chandra *et al.,* 2016; Lieberei, 2007; Suarez *et al.,* 2015; Villarraga, Tibambre, Romero, Suarez & Moreno, 2017). Las zonas de escape, son zonas con condiciones medio ambientales desfavorables para el crecimiento del patógeno, se caracterizan por una estación seca prolongada, precipitación entre 1800-2500 mm/año, temperaturas en un rango de 23 a 30ºC y humedad relativa de 60-80%, condiciones que interrumpen el cliclo de vida del hongo evitando la aparición de epidemias (García-Romero *et al.,* 2013).

Actualmente se avanza en investigaciones sobre tratamientos biológicos para combatir a *M. ulei*, a través del uso de microorganismos antagónicos como el estudio realizado por Villarraga *et al.,* 2017 quienes demuestran que compuestos activos producidos por cepas de *Streptomyces* sp. inhiben el crecimiento de *M. ulei* y *C. gloeosporioides* interfiriendo con la formación del tubo germinal de las conidias. El hongo *Dicyma pulvinata* (Berk & M.A. Curtis) Arx (syn. *Hansfordia pulvinata*) es considerado como un eficiente agente de biocontrol, coloniza las lesiones estromáticas de *M. ulei* causando la destrucción de sus estructuras sexuales y evita la esporulación (Delmadi, Neto, & Rocha, 2009; Mello, Santos, & Silva, 2006). También existen estudios sobre nuevas alternativas para el control de enfermedad basadas en la evaluación de características fisiológicas de las plantas como la actividad fotosintética, el impacto de las variaciones climáticas estacionales sobre el crecimiento, la respuesta sobre el efecto de la aplicación del ácido 2-cloro etil fosfónico (estimula la floración) y el efecto que produce el retraso en la fecha de brotación (Sambugaro, 2007; Sterling *et al.,* 2009; Sterling & Correa, 2010).

Países como Brasil y Francia lideran investigaciones de mejoramiento genético de clones resistentes de *H. brasiliensis* ante la infección de *M. ulei* mediante programas de mejoramiento convencional (Rivano *et al.,* 2013) y evaluaciones de comportamiento ante condiciones de infección controladas, como el caso de los clones FX 2784 (Le Guen *et al.,* 2013) y MDF 180 (Le Guen *et al.,* 2011), que por sus características de resistencia han sido seleccionados para la propagación del material vegetal. A nivel molecular Lespinasse y colaboradores (2000) evaluaron el comportamiento asociado a resistencia a través de QTLs (de las siglas en ingles de Quantitative trait loci) que en conjunto con análisis BSA (de las siglas en ingles Bulked segregant analysis) les permitieron identificar 8 QTLs asociados al fenotipo de resistencia parcial y completa al SALB, a partir de la evaluación de la F1 del cruce entre el clon resistente RO38 (híbrido inter-específico entre *H. brasiliensis* x *H. benthamiana*) resistente a algunas razas del hongo y el parenteral PB 260, que se caracteriza por la susceptibilidad que presenta a la enfermedad pero que es considerado de importancia por ser un clon altamente productivo (Lespinasse *et al.,* 2000). Un ejemplo es el marcador de resistencia localizado en el locus *M2fx* del genoma de *Hevea,* que es aproximadamente de 10cm de longitud, lo que es equivalente a 7 millones de nucleótidos, lo cual dificulta el enfoque de estrategias de genética directa para la búsqueda de genes de resistencia (Lespinasse *et al.*, 2000).

La estrategia más empleada hasta el momento por el sector cauchero para controlar la enfermedad ha sido la selección de clones resistentes a cepas específicas de *M. ulei* y el cultivo en zonas de escape (Alvim, 1982; Rivano *et al.,* 2015). La selección se realiza mediante caracteres que permiten medir el grado de resistencia del clon, que incluyen el tamaño de las lesiones producidas tras la infección, la esporulación reducida del hongo en las hojas, la producción de escopoletina (que actúa como una barrera química) (García *et al.,* 1995), y la acumulación de lignina (asociada con la respuesta hipersensible) la cual es inducida rápidamente después de la infección (De Araujo *et al.,* 2001; García-Romero *et al.,* 2006; García *et al.,* 1995; García *et al.,* 1999).

Se han descrito otras reacciones de defensa del árbol *H. brasiliensis* contra *M. ulei* como es la producción de fitoalexinas (tipo de antibióticos producidos en el sitio de infección como mecanismo de defensa contra la infección de microorganismos) como la escopoletina (la cual estaría sobre expresada en la respuesta hipersensible del árbol) (García-Romero *et al.,* 2006). Koop y colaboradores (2016) evaluaron la acumulación de

H_2O_2 en el genotipo susceptible de *H. brasiliensis* (PB 314) 48 horas pos infección con *M. ulei,* e identificaron 21 genes involucrados en la producción de ROS, ROS scavenging y senescencia de la hoja. Adicionalmente describieron el nivel basal de expresión, dependiente del genotipo y su comportamiento en los genotipos susceptibles (PB 314), parcialmente resistentes (MDF 180), resistentes (FX 2784) en respuesta a la infección para obtener una visión general de la importancia de la explosión oxidativa en cada genotipo (Koop *et al.,* 2016).

En las últimas décadas la introducción de metodologías de secuenciación de alto rendimiento y el análisis de la transcriptómica han permitido desarrollar evaluaciones de los genotipos de *H. brasiliensis* en la interacción con *M. ulei*. Los análisis de expresión diferencial de los transcriptomas del clon FX 3864, resistente a la infección por *M. ulei* cepa GCL012, a las 0 y 48 horas post infección, permitieron identificar 86 genes expresados diferencialmente y asociados con vías de señalización, de los cuales 35 genes estaban sobre-expresados y relacionados con los procesos de regulación de la transcripción, respuesta a estrés, síntesis y remodelación de la pared celular y respuesta hormonal, indicando una relación entre las respuestas transcripcional de la planta ante el estrés ocasionado por la infección del hongo. Entre los genes suprimidos se reporta el *ERF1*, 7 genes putativos de la super familia dependiente de etileno (ET) y el gen putativo *CPR5*. (Páez *et al*., 2015).

Pese a los avances en el estudio de la genética de la resistencia de *Hevea* sp. aun no se generan clones con resistencia durable debido en parte a la alta variabilidad del hongo. Mattos y colaboradores (2003) a través de estudios de campo evaluaron la variabilidad de 50 aislamientos de *M. ulei* obtenidos en una plantación de caucho en Bahia – Brasil, inoculados en 12 clones diferentes de *Hevea* sp. Los resultados obtenidos permitieron reportar 36 perfiles de virulencia del hongo, el autor resalta la importancia de la alta variabilidad del patógeno y el potencial de adaptación a diferentes genotipos del huésped, convirtiéndose en una dificultad en el futuro para mantener clones con resistencia durable (Mattos *et al*., 2003).

La variabilidad del hongo puede verse reflejada en los reportes de caracterización de susceptibilidad y resistencia de clones de *H. brasiliensis.* Suarez y colaboradores (2015),

realizarón ensayos de inoculación controlada en el jardín clonal de la Hacienda la Vorágine, localizada en el municipio de Cimitarra – Colombia y reportaron los clones FX 3864 y CDC 32 como clones de resistencia parcial, recomendando sembrarlos en zonas con restricción para el cultivo y al clon FDR 5788 como clon con resistencia total. Contrario a los resultados obtenidos en estudios, realizados en la estación de Santo Domingo Ecuador donde reportan una resistencia total para el clon CDC 32 y parcial para el clon FDR 5788 por lo cual no se recomienda para zonas de escape (Rivano, Martinez, Cevallos & Cilas, 2010). La variabilidad del hongo y los reportes contradictorios en las diferentes zonas aptas para el cultivo sobre el comportamiento de un mismo clon, demuestran la necesidad de generación de nuevo conocimiento, la descripción de la interacción molecular planta patógeno, los factores asociados a patogenicidad presentes en el hongo y los genes codificantes de proteínas de resistencia presentes en la planta, mecanismos y factores que hoy en día se desconocen.

Segunda Parte

1.9 Sistema inmune de las plantas

Las plantas han evolucionado desarrollando sofisticados sistemas de inmunidad para protegerse de los patógenos o cualquier agente causal. Ante la infección de un patógeno las plantas responden mediante alguna de las dos ramas del sistema de defensa de la inmunidad innata, el cual se basa en el sistema de defensa de cada célula y en las señales sistémicas que emanan del sitio de la infección (Ojito & Portal, 2010; Tsuda & Somssich, 2015). La primera rama reconoce las moléculas comunes de muchas clases de microorganismos y se activa tras el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos PAMPs (de las siglas en inglés Pathogen-associated molecular patterns) (Silva-Gomesa *et al.,* 2014), se consideran entre ellos moléculas tales como: los lipopolisacáridos, la flagelina, los β-glucanos, la invertasa, la quitina, el ergosterol, la xilanasa y otros compuestos de bajo peso molecular (de Jonge *et al.,* 2010; Jones & Dangl, 2006). El reconocimiento lo realizan receptores de membrana denominados PRRs (de las siglas en inglés pattern recognition receptors), que se encuentran en la superficie de las células vegetales y censan estos patrones, este mecanismo se denomina PTI (de las siglas en inglés PAMP-triggered immunity) (Chisholm, Coaker, Day, & Staskawicz, 2006; De Wit, 2007; Jones & Dangl, 2006; Ojito & Portal, 2010; Tiffin & Moeller, 2006; Silva *et al.,* 2014;Tsuda & Somssich, 2015).

El reconocimiento induce respuestas de defensa tales como la deposición de callosa, la necrosis celular en el sitio de infección y la acumulación de fitoalexinas, que son respuestas inducidas solo en interacciones de tipo incompatible (De Wit, 1977). Varias proteínas PR (de las siglas en inglés Pathogensis related) como 1,3-β-Glucanasas y quitinasas han sido aisladas del fluido apoplástico de hojas de tomate inoculadas con *C. fulvum* (Joosten & De Wit, 1989), algunas de las cuales presentan homología con proteínas de resistencia de la familia PR-1 de *Nicotiana tabacum* (Joosten, Bergmans, Meulenhoff, Cornelissen & De Wit, 1990; Silva- Gomesa *et al.,* 2014).

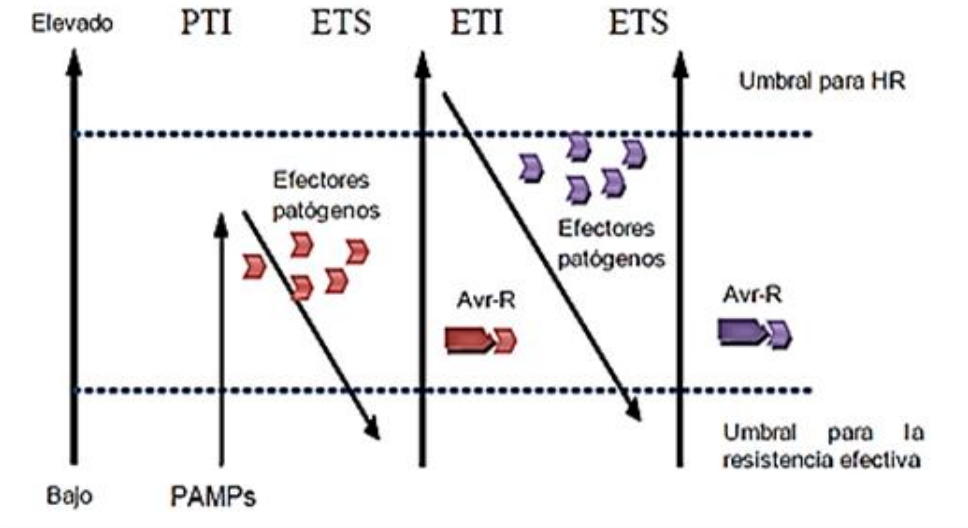
La segunda rama responde a factores de virulencia o proteínas efectoras de patógenos, estas son proteínas de bajo peso molecular (Mesarich *et al.,* 2017), secretadas por

bacterias, oomicetos y hongos, para suprimir los mecanismos de defensa del hospedero, con diferentes funciones que contribuyen a la virulencia del patógeno y permiten manipular y adaptarse a su huésped (Guzmán–Guzmán *et al.,* 2017; Stergiopoulos *et al.,* 2012; Sonah *et al .,* 2016; Shindo *et al.,* 2016), un claro ejemplo son los efectores que *C. fulvum* secreta al apoplasto de *Lycopersicum esculentum* durante la interacción (Joosten & de Wit, 1999; De Wit, Mehrabi, van den Burg & Stergiopoulos, 2009), estos a su ves burlan la PTI (Boller & He, 2009) como es el caso de la proteína efectora Ecp6 de *C. fulvum* que previene la elicitación de la inmunidad del hospedero, a través de la unión de su dominio LysM a los oligosacáridos de quitina que son liberados de las paredes celulares de la hifa invasora, previniendo su detección, suprimiendo así la inmunidad activada por PAMPs y favoreciendo la infección (de Jonge *et al.,* 2010).

Otras proteínas efectoras activan la respuesta ETI (de las siglas en inglés Effector-triggered immunity) (Giraldo & Valent, 2013), al ser reconocidos por receptores intracelulares directa o indirectamente, por medio de proteínas de resistencia que poseen dominios conservados tipo NB-LRR (de las siglas en inglés nucleotide-binding site leucine-rich repeat) que son codificadas por genes de resistencia (*R*) (Jones & Dangl, 2006; Tsuda & Somssich, 2015). Los receptores NB-LRR median la inmunidad activada por efectores ETI, desencadenan una respuesta de defensa más rápida y mejorada, denominada HR (respuesta hipersensible), que constituye la segunda forma de inmunidad innata y junto con PTI forma parte del modelo del sistema inmune de las plantas denominado “zig-zag” (Figura 1-3) (Chisholm *et al.,* 2006; De Wit, 2007; Jones & Dangl, 2006; Ojito & Portal, 2010; Tiffin & Moeller, 2006).

La especialización de los patógenos ha resultado en la evolución y adaptación de varias formas especiales de hongos y bacterias que son capaces de colonizar un huésped específico, y evadir o suprimir el reconocimiento de PTI para colonizar la planta satisfactoriamente (He, Shan & Sheen, 2007). En el caso de los hongos se puede hablar de razas como formas especiales que pueden ser virulentas o avirulentas en algunos cultivares del huésped. La avirulencia es causada por el reconocimiento del patógeno por parte del huésped resultando en una respuesta de defensa de tipo HR.

Figura 1-3: Modelo de zigzag. Ilustra la respuesta cuantitativa del sistema inmune en plantas ante el reconocimiento de PAMPs y Efectores Tomado de (Ojito & Portal, 2010).



Las proteínas R con dominios conservados de tipo NBS-LRR son codificadas por una de las familias más grandes de genes *R* conocidos en las plantas, *Arabidopsis thaliana* tiene aproximadamente 120 genes y en *Oryza sativa* se han descrito más de 400 (Jones & Dangl, 2006; Sarris *et al.,* 2015; Shiu & Bleecker, 2003) La presencia de estos dominios ha permitido buscar genes R candidatos en otras especies vegetales mediante detección de RGAs (de las siglas en inglés Resistance Gene Analogues), utilizando PCR (de las siglas en inglés Polymerase chain reaction) y cebadores degenerados partiendo del alineamiento de secuencias de los dominios conservados de genes como *RPS2* y *RPM1* de *A. thaliana* contra *Pseudomonas syringae*, entre otros (García-Romero, 2012; Kruijt, de Kock & de Wit, 2005; Meyers *et al.,* 1999).

Las proteínas NB-LRR son efectivas contra patógenos que pueden crecer solo dentro del tejido vivo del huésped (biótrofos obligados o hemibiótrofos), pero no contra patógenos que degradan los tejidos del huésped mientras lo colonizan (necrótrofos) (Cui, Tsuda, & Parker, 2015; Jones & Dangl, 2006). Dentro de sus funciones se encuentran, mediar la inmunidad activada por efectores ETI, activación de MAPK (de las siglas en inglés Mitogen-Activated Protein Kinases) para inducir la transcripción de los factores de transcripción que conllevan a la muerte celular y formación de radicales de oxígeno para

la HR (Cui *et al.,* 2015; Dangl & Jones, 2001; He *et al.,* 2007; Jones & Dangl, 2006; Tiffin & Moeller, 2006).

Un ejemplo de la respuesta de defensa mediada por las proteínas NB-LRR, es el reportado por Zhang y colaboradores (2012) donde demuestran que la cascada de quinasas MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 regula negativamente a la proteína SUMM2 (una proteína con dominio NB-LRR), y positivamente la defensa basal activada por el efector HopAI1 de *Pseudomonas syringae*. Cuando el efector HopAI1 inhibe la actividad de la quinasa MPK4, conduce a la activación de una respuesta de defensa mediada por SUMM2, que se activa cuando la cascada de quinasas es interrumpida por el efector. Algunas proteínas NB-LRR poseen dominios de unión a factores de transcripción como la proteína RRS1-R NB-LRR de *Arabidopsis* que tiene en su C-terminal un dominio de unión a DNA tipo WRKY (transcription factor family) y forma un complejo con el receptor RPS4 otra proteína NB-LRR, ese complejo funciona como un señuelo ´´decoy´´ que permite la deteccción de proteínas efectoras que tienen como target proteínas tipo WRKY, como lo son los efectores bacterianos AvrRps4 y PopP2, que interactúan con el dominio tipo WRKY del complejo RPS4/RRS1-R (Zhang *et al.,* 2012; Sarris *et al.,* 2015).

1.10 Importancia del fluido apoplástico en la interacción con patógenos

Los nutrientes y el agua pueden ser transportados al interior de la célula vegetal mediante dos vías de transporte, la vía A o vía simplástica y la vía B o vía apoplástica. El simplasto es el sistema de protoplastos interconectados que forma un citoplasma continuo y que permite el paso del agua y solutos mediante ósmosis y transporte activo a través de la endodermis. El apoplasto es el compartimento intercelular, y esta conformado por las paredes celulares y los espacios intercelulares, ocupa el 5% o menos del volumen de tejido de los órganos aéreos (Figura 1-4) (Regalado & Ricardo, 1996; O'Leary, Rico, McCraw, Fones, & Preston, 2014; Witzel, Shahzad, Matros, Mock, & Mühling, 2011). En el se desarrollan varios procesos metabólicos y de transporte en estado de acidez, incluyendo la formación de la pared celular, nutrición, absorción de agua y transporte de minerales, aminoácidos, azúcares y otros nutrientes que por difusión simple viajan hasta las células de la endodermis donde el agua entra por

ósmosis para seguir hasta el xilema (Regalado & Ricardo, 1996; Felle, 2006; Sattelmacher, 2001; O'Leary *et al.,* 2014).

El apoplasto en algunos patosistemas, es el primer compartimento donde muchos patógenos se establecen para multiplicarse y desarrollar su estilo de vida parasítica (Rico, Jones, & Preston, 2009; Witzel *et al.,* 2011). La concentración de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados presentes en el fluido apoplástico, son suficiente para satisfacer las necesidades nutricionales de bacterias y hongos patógenos, cuyo crecimiento produce cambios en las reacciones metabólicas, disminución de nutrientes disponibles y producción de solutos apoplásticos (O'Leary *et al.,* 2014).

Figura 1-4: Diagrama de vías de transporte al interior de la célula vegetal. Rojo Simplasto. Negro Apoplasto. . Tomado de: http://www.euita.upv.es/varios/biologia/images/Figuras_tema12/Figura12_6.jpg.

Sin embargo también en el apoplasto se da lugar al reconocimiento de los patógenos y se desencadena la respuesta de defensa en las primeras etapas de la infección (Ndimba, Chivasa, Hamilton, Simon, & Slabas, 2003; Witzel *et al.,* 2011; Bolton *et al.,* 2008), estos mecanismos involucran la inducción de numerosos genes de la planta que codifican proteínas de defensa que contribuyen al confinamiento del patógeno (Regalado & Ricardo, 1996), la producción de especies reactivas de oxígeno ROS (estallido oxidativo) y de NO (óxido nítrico) por acción de las peroxidasas y oxidasas extracelulares que son segundos mensajeros importantes en rutas específicas de señalización (Palomares, 2009). Adicionalmente se da el fortalecimiento de la pared celular a través de la

reticulación y la deposición de callosa o la presencia de forma constitutiva o inducible en el apoplasto de proteínas inhibidoras específicas como poligalacturonasas (PGIPs) y serin proteasas (Olivieri, Godoy, Escande, & Casalongué, 1998) que inhiben la actividad poligalacturonasa de hongos fitopatógenos (De Lorenzo, D'Ovidio, & Cervone, 2001).
En la planta de arroz, la infección con *Xanthomonas oryzae* induce la acumulación de peroxidasas en el apoplasto (Young, Guo, Guikema, White, & Leach, 1995), mientras que las plantas de tomate y trigo infectadas con *Cladosporium fulvum* y *Septoria tritici* que penetran el apoplasto de la hoja, responden mediante el aumento de quitinasas y 1,3-ß-glucanasas (Joosten & De Wit, 1989). Sin embargo, *C. fulvum*, a la vez expresa la proteína AVR4 que inactiva las quitinasas de la planta para proteger sus paredes celulares de la degradación (van den Burg, Harrison, Joosten, Vervoort & de Wit, 2006) demostrando con este ejemplo como los hongos han desarrollado medidas específicas para desarticular las defensas de las plantas (Ojito & Portal, 2010; Tsuda & Somssich, 2015).

El fluido apoplástico puede ser obtenido a partir de tallos, raíces y hojas de plantas sanas e infectadas con algún patógeno de interés, a partir de éste se han realizado diversos estudios de interacción planta-patógeno (De Lorenzo *et al.,* 2001; De Wit *et al.,* 2009; Rico *et al.,* 2009; Witzel *et al.,* 2011; Zhang *et al.,* 2009). De los hallazgos realizados a partir del estudio del fluido apoplástico obtenido de hojas cabe resaltar la detección de fitoalexinas en hojas de avena infectadas con *Puccinia coronata* f. sp,*avenae* (Mayama, Matsuura, Iida, & Tani, 1982), la función de las quitinasas y β-1,3-glucanasas extracelulares en hojas de avena durante una respuesta tipo HR (Fink, Liefland, & Mendgen, 1988), la comparación de las proteínas involucradas en los procesos de patogénesis en el modelo *Musa-Mycosphaerella fijiensis* (Mendoza-Rodríguez *et al.,* 2006). Adicionalmente la identificación y el cambio en la abundancia de 3 proteínas de dominio DUF26 después de 12 horas de inoculación en el análisis proteómico realizado en hojas de arroz infectadas con *Magnaporthe oryzae* (Shenton *et al.,* 2012). En 2016 se describió el nuevo efector de *C. fulvum* Ecp11-1, el cual presenta homología con el efector AvrLm3 y AvrLmJ1 de *Leptosphaeria* maculans, mediante la caracterización del secretoma apoplástico, usando LC-MS/MS. Inicialmente se identificaron 141 proteínas secretadas, presentes en el fluido apoplástico de la interacción con tomate, de las cuales 70 fueron caracterizadas como nuevas proteínas efectoras denominadas como CfCE (del ingles *C. fulvum* candidate effector). Mediante análisis en sistemas de expresión se

demostró que 9 de estas CfCE, inducen muerte celular, demostrando como el estudio del secretoma apoplástico permite identificar también nuevas fuentes de resistencia contra el patógeno (Mesarich *et al.,* 2016).

La metodología más empleada para realizar la obtención de fluido apoplástico es la infiltración – centrifugación (O'Leary *et al.,* 2014). El primer paso consiste en conectar un sistema cerrado (que contiene un buffer de infiltración de determinadas características en el cual se encuentra sumergido el material vegetal de interés) a una bomba de vacío y someterlo a varios ciclos de presión, una vez terminado el ciclo se permite la entrada lentamente de aire al sistema para que empuje el buffer dentro de los espacios extracelulares, como resultado se observan áreas de color oscuro sobre la cara abaxial del material de estudio. En el segundo paso se coloca el material infiltrado sobre un sistema de recolección que será sometido a un ciclo de centrifugación a determinada gravedad, para finalmente recuperar el producto de la infiltración y realizar los correspondientes análisis con técnicas analíticas como electroforesis en (2D) o cromatografía líquida acoplada a masas (LC-MS) (O'Leary *et al.,* 2014; Shenton *et al.,* 2012).

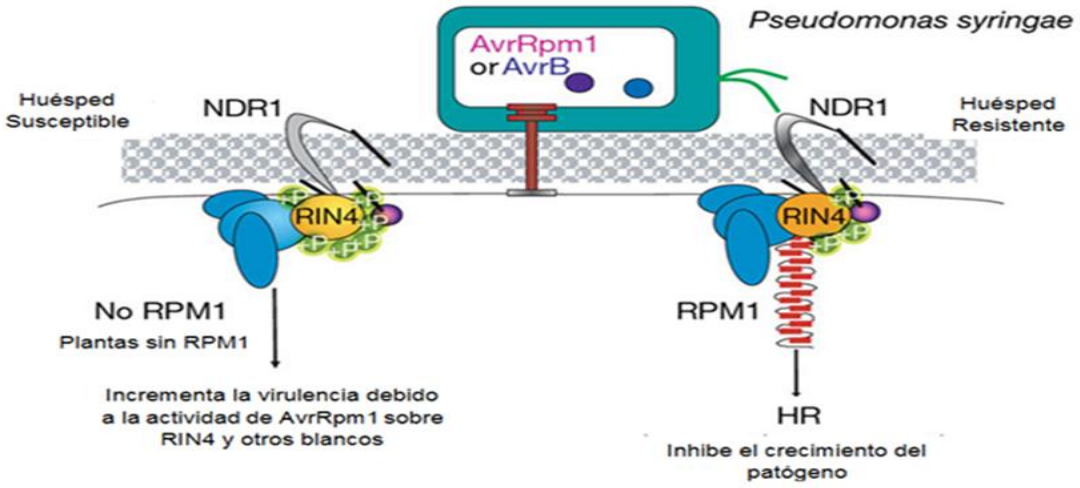
1.11 Efectores patogénicos bacterianos

Las proteínas efectoras contribuyen a la virulencia mediante una variedad de mecanismos, muchos efectores bacterianos imitan, inhiben o bloquean la función de las proteínas del huésped, alterando las funciones del anfitrión para su propio beneficio. Generalmente son proteínas pequeñas secretadas al apoplasto o pueden ser introducidos al citoplasma de la célula mediante estructuras especializadas que penetran la pared celular, como es el caso del sistema de secreción tipo III denominado TTSS o T3SS (Macho & Zipfel, 2015). Algunas bacterias pueden introducir entre 15 a 30 efectores en las células del huésped usando este sistema (Boller & He, 2009; Chisholm *et al.,* 2006; He P *et al.,* 2007; Ojito & Portal, 2010; Tsuda & Somssich, 2015).

Dichos efectores tienen actividades enzimáticas, tales como el Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) y cysteine proteases, ubiquitin-like protease, E3 ubiquitin ligase, tyrosine phosphatases, y ADP-ribosyltransferases. Unos pocos efectores tales como

HrpZ y HrpW de *P. syringae*, HrpF de *X. campestris* pv. vesicatoria, y PopA de *R. solanacearum* pueden activar una respuesta tipo HR (Tampakaki *et al.,* 2009). Los efectores secretados por *P. syringae,* AvrPto y AvrPtoB en la planta del tomate, bloquean el dominio quinasa del receptor FLS2 evitando la formación del complejo FLS2-BAK1 que induce la fosforilación de la cascada de las MAPK quinasas para que se induzca la activación de factores de transcripción que activan genes *R* cuyos productos desencadenan una HR (Boller & He, 2009; Cui *et al.,* 2015; Jones & Dangl, 2006; Tsuda & Somssich, 2015). Otros efectores ampliamente descritos y que representan un claro ejemplo del modelo del gen guardian, son AvrRpm1 y AvrRpt2 de *P. syringae,* que interactúan directamente con la proteína RIN4 localizada en la membrana plasmática. AvrRpm1 se une a RIN4 y provoca su fosforilación, lo que conduce a la activación de la proteína RPM1 (CC-NB-LRR R) que monitorea a RIN4 y media la respuesta HR en la planta inhibiendo el crecimiento bacteriano (Figura 1-5). El efector AvrRpt2 es una cysteine proteasa que cliva en dos sitios a RIN4, el cual actua como regulador negativo de la proteína RPS2 (CC-NB-LRR R), al producirse la disociación de RIN4 y RPS2 este ultimo induce la ETI. En plantas susceptibles que no poseen proteínas de resistencia como RPM1 y RPS2, el patógeno continúa con el proceso de infección e interfiere e inhibe la defensa basal PTI (Boller & He, 2009; Chisholm *et al.,* 2006; He P *et al.,* 2007; Ojito & Portal, 2010).

Figura 1-5: Modelo gen guardián. Las proteínas efectoras AvrRpm y AvrB, son liberados en el apoplasto de la célula vegetal, por el sistema de secreción tipo III (flecha roja de la bacteria), se dirigen a la membrana plasmática, donde interactúan con la proteína RIN4, induciendo su fosforilación. Esta modificación es detectada por la proteína RPM1, que conduce una respuesta tipo HR. En ausencia de RPM1, la acción de las proteínas efectoras contribuye a la virulencia. Tomado de (Jones & Dangl, 2006).



1.12 Efectores patogénicos de hongos

Una de las características de las proteínas efectoras de hongos hasta ahora ha sido su alta divergencia de secuencia y especificidad de especie (Stergiopoulos & de Wit, 2009; Lo Presti *et al.,* 2015). En su mayoría corresponden a proteínas pequeñas que pueden ser citoplasmáticas porque son translocados dentro de la pared de la célula vegetal o extracelulares, porque son secretadas dentro del apoplasto, o al xilema de la planta, (Guzmán–Guzmán *et al.,* 2017; Sonah *et al.,* 2016). Aún no se conoce un sistema similar al de secreción como el tipo III de las bacterias en los hongos, pero ya que estos poseen la capacidad de formar haustorios o apresorios, es a partir de estas estructuras como sus efectores pueden liberarse en el espacio intercelular o el apoplasto de la planta (Lo Presti *et al.,* 2015; Garnica *et al.,* 2014; Ojito & Portal, 2010; De Wit *et al.,* 2009; Van Esse, Thomma, van't Klooster & de Wit, 2006).

A la fecha se han identificado 13 proteínas efectoras de *C. fulvum,* que son secretadas extracelularmente al apoplasto durante su interacción con *L. esculentum*, denominadas Avr2, Avr4, Avr4E, y Avr9 (Van den Ackerveken *et al.,* 1993) que son reconocidas por receptores RLP (de las siglas en ingles Receptor like proteins) de tomate llamados Cf-2,

Cf-4, Cf-5 y Cf-9, y Ecp1, Ecp2, Ecp4, Ecp5, Ecp 6, y Ecp7 que son reconocidas específicamente por producto de los genes de resistencia *Cf-ECP*, cumpliendo con lo propuesto en el modelo gen por gen (Joosten & de Wit, 1999; De Wit *et al.,* 2009; Ackerveken & De Wit, 1992).

El efector Avr2 inhibe proteasas secretadas por el hospedero (Rooney *et al.,* 2005), que son importantes para la defensa basal de la planta y facilita la virulencia de otros hongos patógenos tales como *Botrytis cinerea* y *Verticillium dahliae* en la planta de tomate (De Wit *et al.,* 2009). El efector Avr4 contiene un dominio funcional de unión a quitina que se une a las quitinasas de la planta para evadir el reconocimiento y la activación de la respuesta inducida por la quitina de la pared del hongo (De Wit *et al.,* 2009; Stergiopoulos *et al.,* 2010; Dangl & Jones, 2001; He P *et al.,* 2007; Joosten & de Wit, 1999). Se ha planteado la hipótesis de que la función intrínseca del efector Ecp2 durante la patogénesis es interactuar como blanco de virulencia del huésped para inducir necrosis y liberación de nutrientes de las células huésped durante la infección (Stergiopoulos *et al.,* 2010). El efector Ecp6 de *C. fulvum,* es el único efector fúngico conocido con homólogos en otras especies de hongos de la clase de los Dothideomycetes, en este caso la homología se debe a la presencia de motivos LysM en esta proteína, cuya función está implicada en la unión a carbohidratos como la quitina (Bolton *et al.,* 2008).

A diferencia de las bacterias y los oomicetos de los que se han descrito varias familias de efectores, se conocen muy pocas proteínas efectoras que presenten homología en los hongos, la existencia de efectores centrales con funciones biológicas conservadas en otros hongos o pertenecientes a la misma clase podría soportar la hipótesis propuesta por Stergiopolus *et al*, (2010) de un ancestro común antes de la especiación que explique la evolución divergente de las proteínas efectoras de hongos patógenos de plantas. Las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento han facilitado la disponibilidad de varios genomas fúngicos en bases de datos y el acceso a las herramientas computacionales y servidores wed, han permitido identificar proteínas candicatas a efectores mediante la identificación del péptido señal y el analisis de homología de secuencias presentes en otros hongos como es el caso de los ortólogos funcionales del efector Ecp6 encontrados en otras especies de hongos como *Mycosphaerella fijiensis, Mycosphaerella graminícola, Zymoseptoria tritici* y *Magnaporthe oryzae* (Bolton *et al.,* 2008; de Jonge *et al*., 2010;

Marshall *et al.,* 2011), o el efector Pep1 de *Ustilago maydis* que tiene un gen ortólogo en *U. hordei* (Hemetsberger *et al* ., 2015).

La comparación del genoma de *C. fulvum* hongo biotrófico que infecta plantas de tomate y el genoma de *Dothistroma septorium*, hemibiotrófico que infecta plantas de pino pertenecientes a la clase de los Dothideomycetes reveló que el 70% de los genes que contienen ambos genomas son homólogos incluyendo las proteínas efectoras Avr4, Ecp2 y Ecp6. La comparación de sus genomas y sus genes concervados, sugiere que ambos patógenos tenían un hospedero ancestral común, como se deduce del hallazgo de que muchos PCWDE (plant cell Wall degrading enzymes) no se expresan durante la colonización del tomate, la adaptación a diferentes estilos de vida y diferente hospedero fue debido a una combinación de pseudogenes y regulación génica (De Wit *et al.,* 2012; Lo Presti *et al.,* 2015).

La predicción de proteínas efectoras también se ha desarrollado mediante criterios computacionales, con los que se han identificado motivos conservados, péptido señal y características estructurales de las proteínas (Sonah, H., Deshmukh, R. K., & Bélanger, R. R., 2016). Se sabe que las proteínas efectoras presentan secuencias cortas ente 300 – 400 aminoácidos y presentan en el extremo N terminal un péptido señal dentro de los primeros 60 aminoácidos, poseen dominios no transmembranales y tienen pesos moleculares menores a 20 kDa, poseen regiones ricas en residuos de cisteína que están relacionados con la formación de puentes disulfuro, los cuales proveen estabilidad a la proteína, en ambientes ricos en proteasas como lo es el apoplasto del hospedero, además de caracterizarse por ser proteínas específicas de especie (Bolton *et al.,* 2008; Joosten & de Wit, 1999; Luderer, De Kock, Dees, De Wit & Joosten, 2002; De Wit *et al.,* 2009; Van Esse *et al.,* 2006; Lo Presti *et al.,* 2015; Lyu Ket al., 2016; Sonah *et al.,* 2016; Guzman-Guzman *et al.,* 2017; Mesarich *et al.,* 2017).

Otro ejemplo de proteína efectora con estas características además de los efectores Avr2, Avr9, Avr4 y Ecp2 de *C. fulvum,* es El efector ToxA de *Pyrenophora tritici-repentis,* es un HSTs (Host selective toxins), este efector induce necrosis en cultivares de trigo suscptibles, tiene un péptido señal de 23 aminoacidos y una proteína de 13.2 kDa que contiene dos reciduos de cisteína y un motivo RGD (Arg-Gly-Asp) esencial para la

internalización (Liu *et al.,* 2012). Se ha descrito una región de ADN genómico muy similar de 11 kb que contiene ToxA en otro hongo patógeno de trigo *Stagonospora nodorum*. El efector necrotrófico SnTox1 del hongo *S. nodorum* afecta cultivos de trigo, y fue identificado mediante el uso de herramientas computacionales, este efector posee una secuencia de 117 aminoácidos, cuyo péptido señal se encuentra entre los primeros 17 y la proteína madura de 16 residuos de cisteína Se ha demostrado que ToxA interactua con una proteina localizada en el cloroplasto llamada ToxABP1, la alteración de su función induce la acumulación de ROS, estrés oxidativo e inhibición del desarrollo de los cloroplastos (Ciuffetti *et al.,* 2010).

Marshall y colaboradores (2011) analizaron el genoma del hongo *Mycospherella graminicola* en búsqueda de efectores con motivos LysM, y comprobaron mediante análisis *in silico* la función del efector Mg3LysM. El uso de herramientas bioinformáticas también permitió que Guyon *et al* (2014) identificaran 78 genes del fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum,* que codifican para proteínas candidatas a efectores, basándose en características como: aspectos filogenéticos, predicción de la estructura tridimensional de la proteína y posible función. Adicionalmente la identificación de genes codificantes de proteínas efectoras, se puede realizar mediante el análisis de modificaciones a nivel transcripcional del patógeno durante la interacción con el hospedero, permitiendo definir un catalogo de posibles genes putativos codificantes de proteínas efectoras. Guzmán–Guzmán y colaboradores (2017) validaron la expresión de 16 genes que codifican para proteínas efectoras en *Trichoderma virens* y *T. atroviride* (ampliamente utilizados en la industria y como agentes de biocontrol debido a su capacidad micoparasítica, que les permite ser antagónicos de hongos fitopatógenos), durante la interacción con *A. thaliana,* que presentaron modificaciones a nivel transcripcional. Como el gen *tvmp1* que deja de regularse en las etapas de contacto entre los dos hongos y no se expresa en presencia de *A. thaliana*. Además describen la proteína efectora identificada como TVHYDII1 que favorece la colonización de las raíces de la planta y participa en la actividad antagónica contra *Rhizoctonia solani*.

La presencia de motivos conservados también ha sido una de las herramientas empleadas para la búsqueda de posibles proteínas efectoras, motivos observados en oomycetos como RxLR y DEER, han sido encontrados en 11 diferentes genomas de hongos, entre ellos *L. maculans, U. maydis, C. fulvum, M. graminícola, Alternaria*

brassicola y Fusarium oxysporum. Sin embargo la presencia de un motivo RxRL funcional en el genoma de los hongos ha sido debatido, ya que no son abundantes como en los oomycetes. En el genoma de *C. fulvum se encontraron 17 motivos RXRL,* mientras que en el genoma de *Phytophthora infestans* se reportaron 74 motivos (Sonah *et al.,* 2016).

2. Capítulo 2

Metodología

El presente proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Caracterización Molecular del Instituto de Biotecnología IBUN, de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

2.1 Objetivo 1. Estandarizar una metodología para la extracción de fluido apoplástico de foliolos de *H. brasiliensis*

2.1.1 Identificación del material vegetal

Las plantas de caucho utilizadas en este estudio correspondieron a la variedad vegetal RRIM 600, considerado como altamente susceptible a cualquier aislamiento de *M. ulei* (García-Romero*,* 2012), fueron obtenidas del jardín clonal Colombia látex (Marquetalia, Caldas) y mantenidas en condiciones de humedad relativa superior al 85% y temperaturas entre los 24 +/- 2 °C en el invernadero del IBUN durante 6 meses. Fueron fertilizadas cada dos meses con fertilizante edáfico triple 15 y fertilizante foliar quincenalmente. La extracción de DNA de las plantas se realizó empleando la metodología descrita por (Varghese, Knaak, Sethuraj, & Ecke, 1997). El DNA obtenido fue cuantificado por fluorometría (Quant-iT ds BR Assay Kit. Invitrogen) y empleado para la amplificación por PCR de dos microsatélites específicos AY486866 y AY486754 utilizando los primers (Tabla 2-1), como patrón de referencia se utilizó material vegetal del mismo clon previamente identificado y certificado por el equipo de caracterización molecular del IBUN (proveniente de la plantación de Tres Pancadas de Michelin en Bahía-Brasil) (García-Romero, González, Montoya, & Aristizabal., 2011; Saha, Roy & Nazeer, 2005). Las condiciones de PCR se realizaron de acuerdo a lo descrito por (García-Romero *et al.,* 2011). Los amplímeros obtenidos fueron analizados mediante

geles digitales de electroforesis capilar, en el equipo MCE®-202 MultiNA Microchip Electrophoresis System Shimadzu®.

Tabla 2-1: Primers usados para la evaluación de la identidad de los clones de caucho natural.

ID del GenBank	Microsatélites	Secuencia de primers
AY486866	SSRH103 F	5'-TCCTCTCCTCGTCAACATCC-3'
	SSRH103 R	5'-TGTCATTCGAACTCCGTCAA-3'
AY486754	SSRH358 F	5'-TCCGCTCTAGCTTCTTCCTG-3'
	SSRH358 R	5'-GCCGCATAAGAGTGAACGA-3'

Para el segundo año de estudio se adquirieron 20 plántulas de *H. brasiliensis*, cuya presunta identidad correspondiera a la variedad RRIM 600 y 20 plántulas del clon FX 3864, provenientes del mismo jardín clonal, con previa aplicación en campo de productos químicos como acaricidas, insecticidas y fungicidas. Tras ser adaptadas a las condiciones de invernadero anteriormente mencionadas, se realizó la extracción de DNA y amplificación por PCR de los microsatélites AY486754 y AY486866, la visualización se realizó mediante geles de poliacrilamida al 7% (Figura 2-2) y tinción con nitrato de plata (García-Romero *et al.,* 2011).

Tras confirmar la identidad del material vegetal como clones RRIM 600, se dio espera al período de brotación de yemas de las plantas para desarrollar la metodología de extracción de fluido apoplástico (estadío foliar C) y las pruebas de patogenicidad en condiciones controladas en foliolos (estadío B2) (Le Guen *et al.,* 2008). Adicionalmente se utilizaron foliolos de las especies *Phaseolus vulgaris y Solanum lycopersicum* como controles para la estandarización del proceso de infiltración.

Resultados y discusión

Capítulo 2

Figura 2-1: Observación estereoscópica de insecto plaga.

2.1.2 Estandarización de la extracción del fluido apoplástico a partir de foliolos de *H. brasiliensis*

La estandarización de la extracción del fluido apoplástico se realizó en foliolos de *H. brasiliensis* en estadío foliar C, teniendo en cuenta que es el estado de desarrollo fenológico en el que se encuentran los foliolos después de 9 días de inoculación, tiempo seleccionado para el estudio del contenido proteico del apoplasto porque es el tiempo en el que se han reportado mayores niveles de expresión de los genes que codifican para las proteínas efectoras expresadas en el apoplasto (Bolton *et al.,* 2008). Se establecieron las variables que debían ser consideradas como indispensables y que determinarían la reproducibilidad de la técnica. Las variables evaluadas fueron:

- Peso de los foliolos

- Sistema de infiltración (equipo y aditamentos)
- Número de foliolos a infiltrar
- Ciclos de vacío
- Sistema de centrifugación
- Gravedades de centrifugación
- Buffer de infiltración y SDS – PAGE
- Cambio de buffer para el isoelectroenfoque
- Isoelectroenfoque
- Separación de proteínas en SDS-PAGE

- **Peso de los foliolos**

Se evaluó el peso de los foliolos en estadío C para tener un valor en gramos aproximado a lo reportado en la literatura para el proceso de infiltración.

- **Sistema de infiltración (equipo y aditamentos)**

Se evaluaron en total 6 sistemas diferentes de infiltración, inicialmente se evaluó la metodología de infiltración mediante aplicación de presión usando jeringa sin aguja (Husted, Hebbern, Mattsson & Schjoerring, 2000; Witzel *et al.,* 2011; O'Leary *et al.,* 2014), la cual consistió en separar la hoja del peciolo (1 foliolo de *S. lycopersicum* o 1 foliolo de *H. brasiliensis*), enjuagar el foliolo en agua desionizada, secarlo con papel absorbente, colocarlo dentro de una jeringa de 20 ml, llenar la jeringa con 15 ml de agua desionizada, colocar el émbolo en la jeringa y empujarlo sin generar pérdida del agua hasta expulsar todo el aire dentro de la jeringa, cubrir la punta de la jeringa con un trozo de papel parafilm, halar el émbolo hacia afuera de la jeringa para crear una presión negativa y soltar lentamente el émbolo.

Se repitieron los pasos hasta que se observara la aparición de áreas oscuras en la cara abaxial de los foliolos, esta metodología ha sido descrita en foliolos de *S. lycopersicum* las cuales se emplearon como control (Almeida & Huber, 1999; Lohaus, Pennewis, Sattelmacher, Hussmann & Hermann, 2001; O'Leary *et al.,* 2014).

Los 5 sistemas restantes acoplaron a la metodología de infiltración – centrifugación (O'Leary *et al.,* 2014). La Infiltración se evaluó mediante el uso de un desecador de vidrio

Resultados y discusión

Capítulo 2

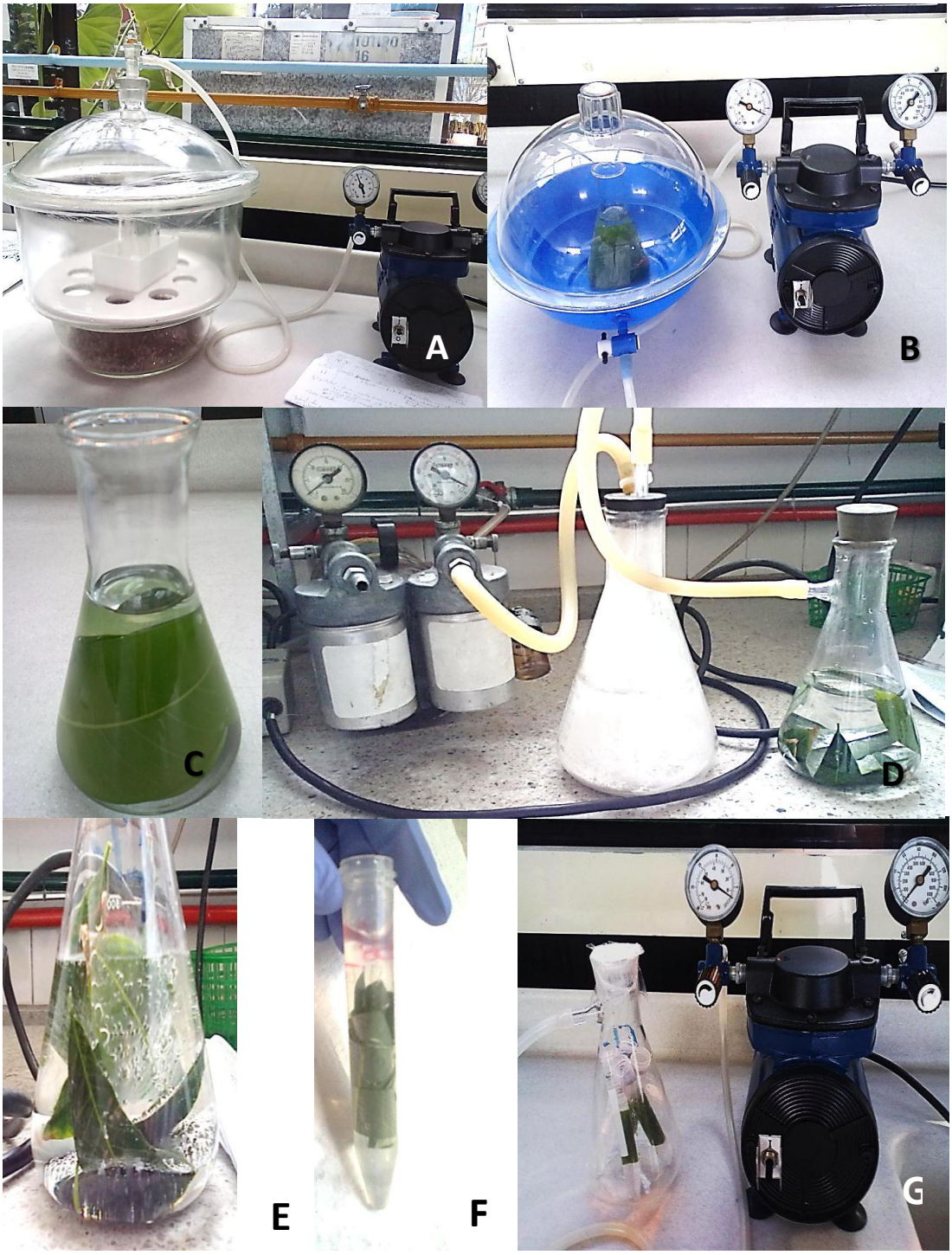
(Figura 2-2A) y un desecador de plástico (Figura 2-2B), en cuyo interior se encontraba un matraz erlenmeyer que contenía 1 o hasta 3 foliolos de *H. brasiliensis* (Figura 2-2C) o de *S. lycopersicum* y *P. vulgaris*. También se empleó un matraz erlenmeyer con desprendimiento lateral (Figura 2-2D) y un equipo liofilizador. Los desecadores y el matraz, fueron conectados individualmente a una bomba de vacío, para evitar que los foliolos de *H. brasiliensis* flotaran (Figura 2-2E) (Joosten, 2012), foliolos individuales fueron enrollados y colocados dentro de tubos falcón de 15ml (Figura 2-2F), los tubos se colocaron dentro del sistema conectado al matraz erlenmeyer con desprendimiento lateral (Figura 2-2G), adicionalmente se evaluó el uso de un equipo liofilizador, que contaba con su propia bomba de vacío. Se evaluaron 2 formas para sumergir totalmente los foliolos e incrementar el área que estaría en contacto con el buffer de infiltración, para ello se emplearon canicas (Figura 2-3A) y tubos de vidrio (Figura 2-3B).

A partir de los sistemas de infiltración evaluados se estableció el número de foliolos a infiltrar, el valor de presión de vacío necesario para realizar la infiltración, la cantidad de ciclos de vacío y tiempo de cada uno para lograr la infiltración de más del 90 % del área de los foliolos sometidos al proceso, el cual fue evaluado visualmente.

Figura 2-2 Aditamentos de los sistemas de Infiltración evaluados. A, desecador de vidrio, **B**. desecador plástico. **C**. foliolos de *H. brasiliensis*, **D**, matraz erlenmeyer con desprendimiento lateral. **E.** foliolos flotando. **F.** foliolos enrollados en tubos falcón. **G.** sistema de tubos falcón y matraz.

Resultados y discusión

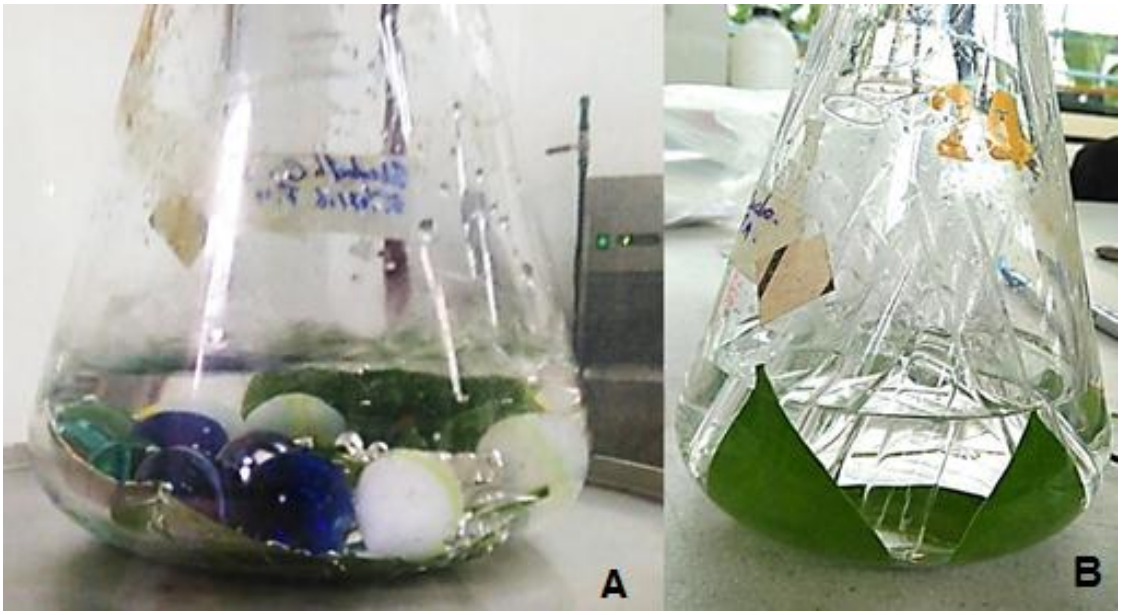
Capítulo 2


A
B
C
D
E
F
G

Resultados y discusión

Capítulo 2

Figura 2-3: Inmersión de foliolos en buffer de infiltración. A. canicas. **B**. tubos de vidrio.



- **Sistema de Centrifugación**

Para el desarrollo de este paso se diseñaron 3 sistemas para la centrifugación de los foliolos infiltrados, se emplearon tubos falcón de 50 ml dentro de los cuales se colocaron algunos aditamentos para separar el material foliar del líquido obtenido durante la centrifugación:

- Cortes de 20 cm^2 de malla de hilos de polímeros plásticos blandos (ANJEO), dentro de los cuales se enrollaban 3 foliolos de *H. brasiliensis* (Figura 2-4A).
- Discos plásticos con aberturas (Figura 2-4B).
- El sistema de papel Parafilm (O'Leary *et al.,* 2014), consistió en colocar 1 foliolo con la base hacia arriba, sobre papel Parafilm enrollado con ayuda de una punta

de pipeta de 1 ml e insertado dentro de una jeringa sin émbolo de 20 ml, la cual fue insertada dentro de un tubo falcón de 50 ml (Butcher *et al.,* 2016) (asegurándose que la base quedara hacia la parte superior del tubo) (Figura 2-4). Esta consideración es de gran importancia ya que evita que al momento de la centrifugación lo primero que salga sea el látex producto de los vasos laticíferos y se contamine el fluido apoplástico, adicionalmente permite conservar la integridad del material vegetal y se evita la presencia de componentes citoplasmáticos a causa de la fragmentación de la hoja durante el paso de centrifugación.

Los sistemas descritos fueron sometidos a diferentes gravedades de centrifugación en distintos intervalos de tiempo, después del proceso se comparó la integridad del material foliar, la cantidad de fluido obtenido y la concentración de proteínas obtenidas.

Figura 2-4: Sistemas de centrifugación.

- **Buffers de infiltración evaluados y SDS – PAGE**

El buffer de infiltración debe mantener la presión osmótica para evitar el colapso de la membrana plasmática, los buffers que se evaluaron fueron:

- Agua desionizada (Joosten, 2012).
- Tris-HCl 50 mM pH 8,0 / Nacl 0,6M / β-mercaptoetanol 0.1% (v/v) (Olivieri *et al.,*1998)
- NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 0,1 M pH 6,5 / NaCl 50mM (Witzel *et al.,* 2011).

Resultados y discusión

Capítulo 2

El contenido proteico de los fluidos apoplásticos obtenidos fue cuantificado por fluorometría empleando el kit Qubit® Protein Assay Kit Fluorometer y por absorbancia usando el equipo NanoDrop 2000®. Los extractos fueron analizados mediante SDS-PAGE al 16% en condiciones denaturantes (Laemmli, 1970). Cada carril se cargó con 40 µg de proteína (Calderan-Rodrigues *et al.,* 2016), más 5 µl de buffer carga (5 ml 50% de glicerol, 2 ml 10% de SDS, 0.5 ml de β-mercaptoethanol, 1 ml 1% de Azul de bromofenol, 0.6 1M Tris-HCl (pH 6.8) y 0.9 ml de H_2O) los cuales fueron calentados a 100°C por 5 min y 1 min en hielo, antes de ser cargados en el gel. La electroforesis se realizó en mini-geles de 0,75 mm de espesor, en el equipo XCell SureLock® Mini-Cell, Life technologies™ a 100 V por 60 min. (Bollag, Rozycki & Edelstein, 1996). El marcador de peso utilizado fue PageRuler Unstained Low Range Protein Ladder (10 µl). Los geles fueron teñidos con azul de coomassie, en agitación suave durante 20 min y desteñidos durante 12 horas.

2.2 Objetivo 2 Identificar moléculas candidatas a proteínas efectoras de *M. ulei* en el fluido apoplástico de *H. brasiliensis* posinfección

2.2.1 Aislamiento e identificación de *M. ulei*

El aislamiento del hongo se realizó a partir de lesiones conidiales, de color oliváceo oscuro presentes en hojas infectadas del clon GT 1, las cuales fueron recolectadas en el jardín clonal de CORPOICA, seccional La libertad (Villavicencio- Meta). Se realizó la observación microscópica para confirmar la presencia de conidias de *M. ulei*, con asa micológica las conidias fueron sembradas en medio de aislamiento (Junqueira, Chaves, Zambolim, Romeiro & Gasparotto, 1984) e incubadas a 25 +/- 2°C durante 1 mes,

posteriormente los cultivos obtenidos fueron repicados en medio de mantenimiento M4 (un medio enriquecido que permite el incremento de la tasa de crecimiento del hongo- (**ANEXO A**) y mantenidos durante 45 días en oscuridad (Junqueira *et al.,* 1984; Mattos, 1999). A partir de los cultivos obtenidos se realizó la identificación morfológica (Schubert *et al.,* 2003), extracción de DNA utilizando la metodología descrita por (Stirling, 2003) y amplificación por PCR, secuenciación y análisis molecular de la región ITS completa utilizando cebadores universales ITS1/ITS4 (García-Romero, 2012; White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). Los amplímeros obtenidos por PCR fueron purificados y secuenciados en doble sentido en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, posteriormente fueron ensamblados y analizados mediante la herramienta Blastn y comparados contra la base de datos del GenBank.

Para la obtención de conidias suficientes para la realización de las pruebas de patogenicidad, los estromas formados en el medio de mantenimiento M4 (**ANEXO A**), fueron macerados con micropistilo en tubos de 2 ml con 1 ml de agua estéril y transferidos a erlenmeyer de 250 ml con 80 ml de medio de esporulación (**ANEXO A**), se incubaron a 24°C+/- 2°C en oscuridad durante 10 días, y 2 días de períodos de luz blanca durante 90 min (García-Romero *et al.,* 2006; Mattos*,* 1999). La extracción de conidias se realizó con una solución de tween al 0.05% y vórtex suave, la solución se ajustó a $2x10^5$ conidias/ml (Mattos *et al*., 2003; Sterling, Rodríguez, & Barrera, 2010).

2.2.2 Pruebas de patogenicidad en condiciones controladas

En este experimento se empleó un diseño completamente al azar con 2 tratamientos (clon RRIM 600 susceptible inoculado – clon RRIM 600 susceptible sin inocular) y 2 repeticiones. La unidad experimental correspondió a cada una de las plantas inoculadas. El experimento se realizó por duplicado.

Las inoculaciones se desarrollaron en el invernadero del IBUN en condiciones controladas de humedad relativa superior al 85 % y temperaturas de 26°C (+/-2), se emplearon dos plántulas del clon RRIM 600 de 9 meses de edad (3 pisos foliares y un último piso en estadío B), se utilizó una solución de conidias del hongo *M. ulei* provenientes del medio de esporulación, con una concentración de 2×10^5 conidias/ml

Resultados y discusión

Capítulo 2

(García-Romero, 2012; Mattos *et al.,* 2003) las cuales fueron re suspendidas en 4ml de tween 80 al 0,05%. Se colocaron de 8 a 10 gotas de 20 µl de la solución sobre la cara abaxial de 15 foliolos jóvenes en estadío B por planta (García *et al.,* 1999; Mattos *et al.,* 2003; Sterling & Melgarejo, 2014). Adicionalmente 100 µl de la suspensión del inóculo se sembraron en agar PDA, el cual sirvió como control positivo del inóculo.

Para los controles negativos, se emplearon otras dos plántulas del clon RRIM 600 de 9 meses de edad (3 pisos foliares y un último piso en estadío B), que fueron inoculadas con tween 80 al 0,05%. Se colocaron 8 a 10 gotas de 20 µl tween sobre la cara abaxial de 15 foliolos jóvenes, correspondientes al estadío B por planta (García *et al.,* 1999; Mattos *et al.,* 2003; Sterling & Melgarejo, 2014). Adicionalmente se sembraron 100 µl de tween en agar PDA, para observar la ausencia de crecimiento de microorganismos, como control negativo del inóculo. Luego de la inoculación las plantas permanecieron bajo condiciones controladas de humedad y temperatura, se realizó el seguimiento del desarrollo de los signos y síntomas de la enfermedad, mediante la escala de intensidad de esporulación (IE) (Mattos *et al.,* 2003) (**ANEXO B**). En el día 9 pos infección se realizó la extracción del fluido apoplástico con las condiciones estandarizadas.

2.2.3 Aislamiento del Fluido Apoplástico de *H. brasiliensis* Posinfección

El fluido apoplástico fue extraído después de 9 días de inoculación, 5 hojas (14 foliolos) por planta fueron cortados desde el peciolo, el proceso de infiltración se realizó de a 2 foliolos de la planta inoculada y de la misma forma la planta sin inocular, posteriormente los foliolos infiltrados se sometieron al proceso estandarizado de extracción de fluido apoplástico descrito en esta investigación.

2.2.4 Visualización de las proteínas presentes en el fluido apoplástico

- **Cambio de Buffer**

El cambio se realizó mediante los filtros de centrifugación Amicon® Ultra 10K, para desalinizar, purificar y concentrar las proteínas presentes en el fluido apoplástico obtenido (Zhang *et al.,* 2009), en un dispositivo de filtro Amicon® Ultra (Millipore) insertado en un tubo de microcentrífuga se transfirió el volumen final de fluido apoplástico (140 µl) y se agregaron 360 µl de buffer Tris-HCl 25 mM pH 7,5 para completar un volumen de 500 µl, el dispositivo se centrifugó durante 15 min a 14.000 x *g*, posteriormente se retiró el dispositivo de la centrífuga y se separó el filtro Amicon® Ultra del tubo de microcentrífuga, se descartó el líquido sobrante del tubo de microcentrífuga, nuevamente se colocó el dispositivo en el tubo y se adicionaron 500 µl de buffer Tris-HCl 25 mM pH 7.5, se repitió el paso de centrifugación y el proceso de adición de buffer 3 veces más a 4°C. Para recuperar la solución de proteínas se colocó el dispositivo de filtro Amicon® Ultra boca abajo en un tubo nuevo de microcentrífuga, el cual se colocó en la centrífuga alineando la tapa abierta hacia el centro del rotor y se centrifugó 2 min a 1000 x *g*. El producto obtenido fue cuantificado por fluorometría y absorbancia y almacenado a -80°C para su posterior uso.

- **Isoelectroenfoque**

Para determinar la concentración de proteínas necesarias para la visualización, el isoelectroenfoque inicialmente se realizó con el fluido apoplástico obtenido a partir de foliolos sanos. La separación se realizó empleando las tiras ZOOM® Strip de 7 cm de longitud (Invitrogen). Con condiciones bajas de pH (4-7) y de amplio rango de pH (3-10) (Bolton *et al.,* 2008). Adicionalmente se empleó como control positivo de la técnica y de las concentraciones evaluadas, un extracto comercial de proteínas totales de *E. coli* del kit ReadyPrep 2 – D Starter Kit®. El control estaba reconstituido en 125 µl de buffer de rehidratación (8 M de Urea, 2% de CHAPS, 50 mM de DTT, 0.2% de anfolitos y azul de bromofenol) del ReadyPrep 2 – D Starter Kit® BioRad. Sin embargo en las indicaciones del casette ZOOM® IPGRunner (Invitrogen) de rehidratación, se recomienda utilizar un volumen final de 155 µl para hidratar la tira Overnight. De manera que a los 125 µl de proteína se añadieron 30 µl de buffer de rehidratación. La concentración final fue: 169 µg / 155 µl=1.09 µg/ µl de proteína de *E. coli*. Del fluido apoplástico obtenido de foliolos

Resultados y discusión

Capítulo 2

sanos, se mezclaron 60 µl (producto de 2 extracciones) con una concentración de 169.2 µg de proteína y 95 µl del buffer de rehidratación, para completar un volumen de 155 µl. La concentración final fue: 169 µg / 155 µl=1.09 µg/ µl de proteína de fluido apoplástico. La rehidratación de las tiras se realizó en agitación suave durante 12 horas a temperatura ambiente. El Isoelectroenfoque se realizó en el equipo ZOOM® IPGRunner™ System Life Technologies, según las recomendaciones para tiras de estrecho rango de pH y las condiciones reportadas para el equipo: 200 V por 20 min, 450 V por 15 min, 750 V por 15 min y finalmente 2000 V por 105 min.

- **Separación de proteínas en SDS-PAGE**

Antes de desarrollar el SDS-PAGE las tiras fueron sometidas a un paso de equilibración, para ello se agregó sobre cada tira 1 ml de buffer de equilibración I (6 M de Urea, 2% de SDS, 0.375 M de Tris- HCl pH 8,8, 20% de glicerol y 2% de DTT), se dejó en agitación suave por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se descartó el buffer utilizado y se agregó 1 ml del buffer de equilibración II (contenido adicional de Iodoacetamida) (Floerl *et al.,* 2008, Shenton *et al.,* 2012) se repitió el paso de agitación.

Previamente se prepararon 2 casettes con el gel separador al 16% (Laemmli, 1970), se calentó el marcador de peso SDS–PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range (BioRad) 5 µl + 95 µl de buffer carga a 95°C por 5 min, 1 min en hielo y se fundió la agarosa overlay. Posteriormente se sumergió cada tira en 1 ml de buffer de corrida y se colocó en el respectivo casette, en papel absorbente estéril se cargaron 5 µl del marcador del peso y finalmente se agregó 1ml de agarosa overlay en cada casette para sellar la tira. La segunda dimensión se realizó en el equipo XCell SureLock® Mini-Cell, Life technologies™ a 125 V por 90 min (Bollag *et al.,* 1996). Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie durante 20 min y desteñidos durante 12 horas. El registro fotográfico de los geles obtenidos se realizó con el digitalizador BIORAD GEL DOC XR+.

Una vez estandarizada la visualización de las proteínas, se procedió a repetir el procedimiento con el fluido apoplástico obtenido tanto de los foliolos infectados como de los foliolos sin infectar.

2.3 Objetivo 3 Identificar mediante función putativa genes codificantes de proteínas efectoras descritas en fitopatógenos de la clase de los Dothideomycetes, en la interacción *H. brasiliensis* - *M. ulei*

2.3.1 Extracción y Cuantificación de RNA total

La extracción del RNA total se realizó a partir de 1 hoja de la planta infectada con el aislamiento de *M. ulei* y 1 hoja de la planta control (hoja sin infección) a los 9 días pos infección, utilizando la metodología de extracción de RNA total con CTAB (López, Asencio, Guzmán, & Boonham, 2006) (**ANEXO D**). El RNA obtenido fue re suspendido en 30 µl de agua libre de RNAsas, posteriormente se purificó mediante columnas mini RNAeasy de QIAGEN y se cuantificó por fluorometría con el equipo Qubit® (Invitrogen) utilizando el kit Quant-it^{TM} RNA BR Assay Kit (García-Romero, 2012).

2.3.2 Tratamiento del RNA con la Enzima DNasa

Para eliminar el DNA contaminante y evitar falsos positivos, el RNA obtenido para cada una de las muestras fue tratado con el kit DNase I (RNase free) 2U/µl (Jena Bioscience), de la siguiente manera: en un tubo tratado con DEPC se añadió 1µg de RNA total, 1 µl de buffer de DNasa 10X y 1 µl de DNasa I, se incubó la mezcla por 10 min a 37° C, y posterior incubación a 65 °C por 10 min para la inactivación de la enzima. Adicionalmente se guardó 1 µl a -80°C para emplearlo como control de la actividad de la enzima DNasa.

2.3.3 Síntesis de cDNA

Para la síntesis del cDNA se utilizó el kit MMLV RT 1st -Strand cDNA Synthesis (Epicentre Biotechnologies). A los 9 µl de RNA sobrantes del tratamiento con DNasa, se adicionó 2 µl de primer oligo(dT)21 primer y 1.5 µl de Agua DEPC. Se incubó a 65°C por 2 min e inmediatamente se colocó sobre hielo por 1 min, seguido de centrifugación

Resultados y discusión

Capítulo 2

suave, se adicionaron los siguientes reactivos: 2 µl de buffer 10X), 2 µl de DTT (100 mM), 2 µl de dNTP PreMix, 0.5 µl RiboGuard RNase Inhibitor y 1 ul de MMLV Reverse Transcriptase (100 U/µl). Las muestras se incubaron x 60 min a 37°C, se terminó la reacción calentando las muestras a 85°C x 5 min, 1 min en hielo y centrifugación suave. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C para su posterior uso.

2.3.4 Verificación del cDNA

Se realizó la verificación de la presencia de cDNA y la ausencia de DNA en los controles de DNasa guardados a -80°C, se realizó la amplificación por PCR del factor de elongación (EF) de *H. brasiliensis* (Tabla 2-2). Las condiciones de PCR en el programa de amplificación para el EF fueron: incubación a 95 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos con denaturalización de 30 segundos a 95°C, anillamiento a 60°C por 30 segundos y extensión durante 30 seg a 72°C. Un paso de elongación final a 72°C por 1 min (García-Romero, 2012). Finalmente se realizó un gel de agarosa al 2% para visualizar los productos de la amplificación, la electroforesis se realizó a 100 voltios por 40 min en buffer TBE 1X.

2.3.5 Amplificación de genes codificantes de proteínas efectoras descritos en fitopatógenos de la clase de los Dothideomycetes presentes en la interacción *H. brasiliensis* - *M. ulei*

Se seleccionaron las proteínas Ecp6 y Ecp7 de *C. fulvum*, a partir de los resultados descritos por Bolton y colaboradores (2008), donde describen la presencia de proteínas tipo Ecp6 de *C. fulvum* en 16 especies de la clase de los Dothydeomycetes, a la cual también pertenece *M. ulei* para evaluar la presencia de secuencias ortólogas de estos genes en el DNA del hongo y cDNA de la interacción con *H. brasiliensis* se emplearon los

primer degenerados descritos por Bolton *et al.,* (2008). Adicionalmente se seleccionó el fragmento TDFMu1 (que presenta similaridad con la proteína extracelular Ecp5 de *C. fulvum*) mediante los primers TDF2R y TDF2F (García-Romero, 2012). Los primers fueron sintetizados en Macrogen (Corea) y se utilizaron para desarrollar un ensayo de PCR usando DNA del hongo y la planta como controles (Tabla 2-2).

Tabla 2-2: Secuencias de primers utilizados para la evaluación del cDNA.

primers	Secuencia de primers
TDFHb EF F	5'-TGGTTATGGCTACGGTGTCTCGAA-3'
TDFHb EF R	5'-ATCAACACCTGATGTAGCCGCGAT-3'
Deg-Ecp6	5'- GARACNAARGCNACNGAYTGYGG -3'
Deg-Ecp7	5'- CARATHACNACNCARGAYTTYGG -3'
TDF2R	5'- AGAGCGGTCGGTTGACGGTA -3'
TDF2F	5'- TGCCACCTACGTTCCTGTCCA -3'

La PCR con los primers Ecp6 y Ecp7, se desarrolló como describe Bolton *et al.,* (2008). Las condiciones de PCR en el programa de amplificación para los Ecps fueron: denaturación inicial de 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos de denaturación de 15 seg a 94°C, anillamiento a 55°C por 30 seg y extensión durante 1 min a 72°C. Un paso de elongación final a 72°C por 5 min (Bolton *et al.,* 2008). La PCR con los primers TDF, se desarrolló a un volumen final de 10 µl con las condiciones descritas por (García-Romero, 2012). Las condiciones de programa PCR para amplificación del fragmento TDF fueron: denaturación inicial de 95°C por 2 min, seguido de 34 ciclos de denaturación de 30 seg a 95°C, anillamiento a 57°C por 30 seg y extensión durante 30 seg a 72°C. Un paso de elongación final a 72°C por 2 min (García-Romero, 2012). Finalmente se realizó un gel de agarosa al 2% para visualizar los productos de ambas amplificaciones, la electroforesis se realizó a 100 voltios por 40 min en buffer TBE 1X.

Resultados y discusión

3. Capítulo 3

3.1 Objetivo 1. Estandarizar una metodología para la extracción de fluido apoplástico de foliolos de *Hevea brasiliensis*

3.1.1 Identificación varietal del material vegetal

La identificación del material varietal del clon RRIM 600, se realizó mediante la amplificación por PCR de dos microsatélites específicos (AY486866 y AY486754), los productos obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis capilar (Figura 3-1) y Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7% (Figura 3-2 y Figura 3-3). Las figuras muestran los perfiles electroforéticos obtenidos, se observa que los individuos del clon RIMM 600 presentaron un alelo de 235 pb con el microsatélite AY486866 y 238 pb con el microsatélite AY486754, mientras los individuos del clon FX 3864 presentaron 2 alelos de 262 y 246 pb con el microsatélite AY486866 y 246 y 222 pb con el microsatélite AY486754, los perfiles obtenidos de cada individuo coincidieron en tamaño de pb con los patrones de referencia de cada clon. Se concluyó que todas las muestras evaluadas fueron conformes con el perfil del patrón de referencia certificado perteneciente al IBUN.

Figura 3-1: Perfil electroforético obtenido con el microsatélite AY486754 amplificado en los clones FX 3864 y RRIM 600, electroforesis capilar. MP: Marcador de peso molecular Ladder 10 pb® (Invitrogen) tamaños en pb. Asterisco rojo: indica el carril correspondiente a cada patrón de referencia. Los carriles aparecen identificados con el número de muestra y el nombre del clon al cual pertenecen. Los cuadros permiten comparar los tamaños obtenidos de cada individuo con respecto al patrón de referencia.

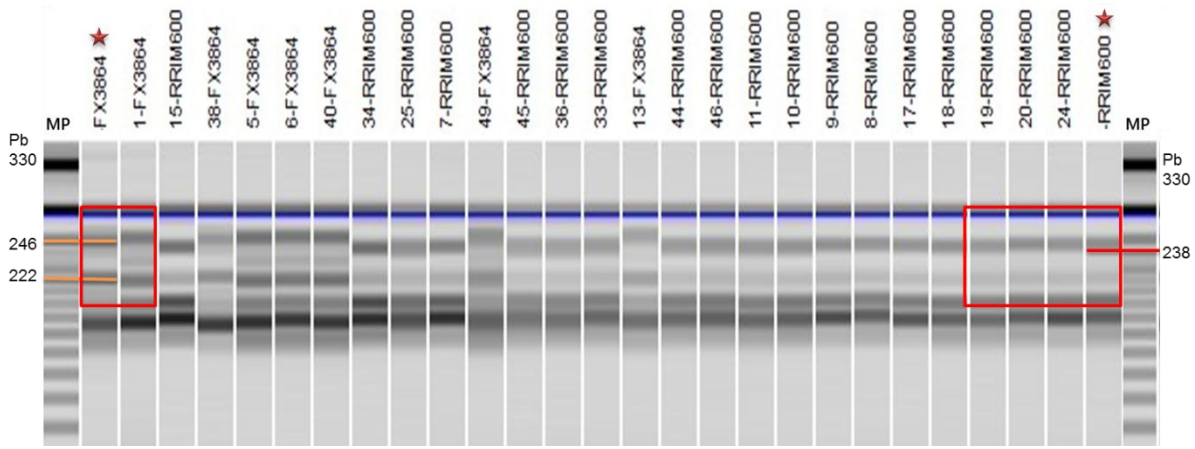
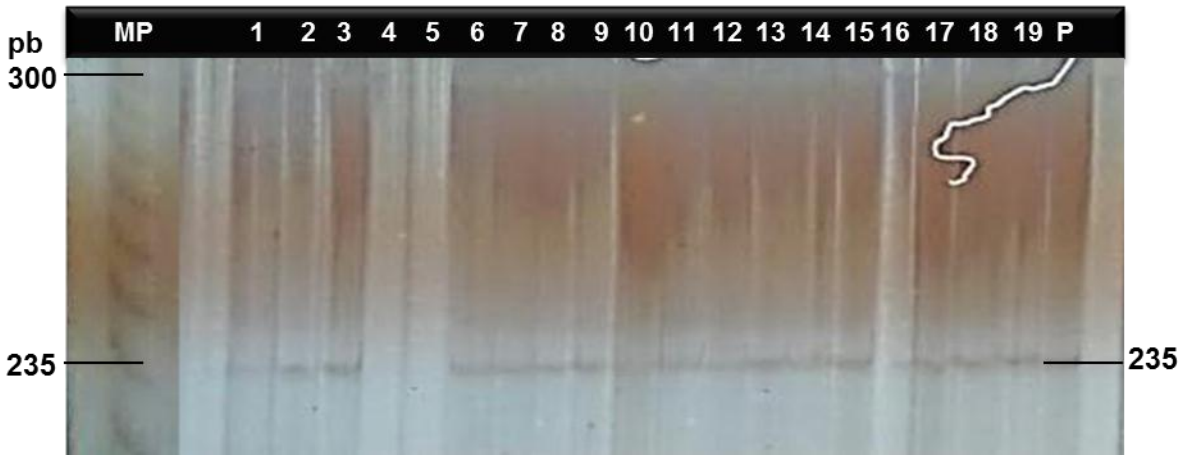


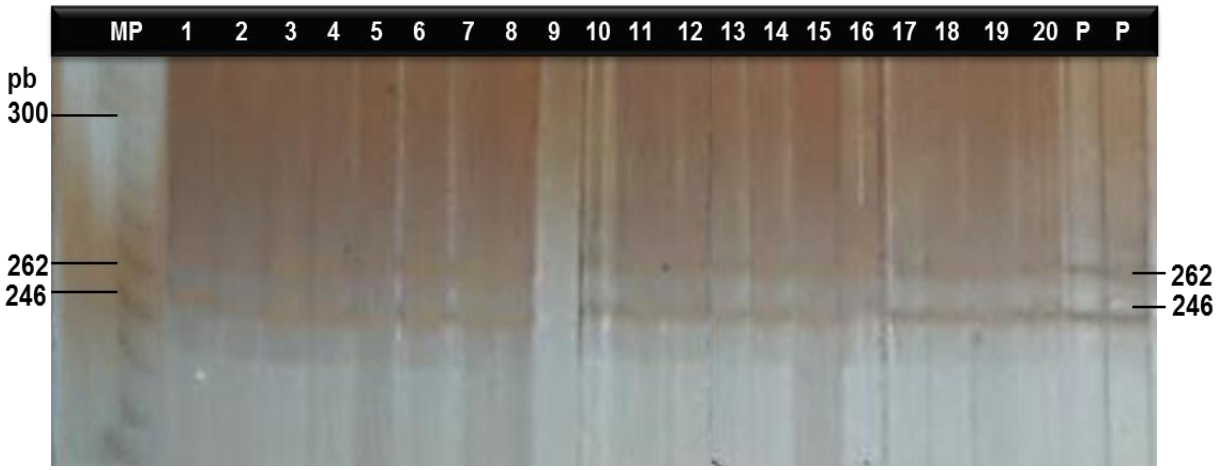
Figura 3-2: Perfil electroforético obtenido con el microsatélite AY486866 amplificado en el clon RRIM 600, electroforesis en gel de poliacrilamida 7%. Gel final, tinción con nitrato de plata. MP: Marcador de peso molecular ladder 10 pb® (Invitrogen). P: Patrón de referencia.



Resultados y discusión

Capítulo 3

Figura 3-3: Perfil electroforético obtenido con el microsatélite AY486866 amplificado en el clon FX 3864, electroforesis en gel de poliacrilamida 7%. Gel final, tinción con nitrato de plata. MP: Marcador de peso molecular ladder 10 pb® (Invitrogen). P: Patrón de referencia.



3.1.2 Estandarización de la extracción del Fluido Apoplástico a partir de foliolos de *H. brasiliensis*

Se analizaron de manera individual cada una de las variables consideradas importantes para el proceso de extracción del fluido apoplástico.

- **Peso de los foliolos**

Inicialmente se determinó la cantidad y el peso de los foliolos, el protocolo de (Araya, Bohner, & von Wirén, 2015) recomienda emplear 20 hojas de *A. thaliana*, al igual que el protocolo descrito por (De Wit & Spikman, 1982; Joosten, 2012). quienes también emplean 20 foliolos de la planta de *S. lycopersicum*. En el laboratorio se cuantificó el peso de los foliolos de *S. lycopersicum*, el cual correspondió a 4.25gr. Para establecer la cantidad de foliolos de *H. brasiliensis* en estadío C necesarias para el proceso de

extracción de fluido apoplástico, se analizó la variación en el largo y el peso de cada uno de los foliolos de la planta (Tabla 3-1) a partir de estos datos, se estableció que para alcanzar un peso aproximado a 4 gr, se necesitan entre 12 y 14 foliolos de *H. brasiliensis* en estadío C para ser sometidos al proceso de infiltración. Es importante resaltar que la unidad de crecimiento de *Hevea* como se muestra en la Figura 1-1 solo produce 5 entrenudos, cada uno con una hoja trifoliada, para un total de 15 foliolos por planta que presentarán el mismo desarrollo fenológico.

Tabla 3-1: Parámetros de peso y largo de los foliolos de *H. brasiliensis.*

Estadío foliar	Peso (gr)	Largo cm	Estadío foliar	Peso (gr)	Largo cm
B	0,02	2	C	0,18	9
B	0,02	2	C	0,20	9
B	0,03	3	C	0,20	9
B	0,03	3	C	0,26	10
B	0,06	4	C	0,24	10
B	0,05	4	C	0,25	11
B	0,04	4	C	0,25	11
B	0,09	5	C	0,34	12
B	0,06	5	C	0,42	12
B	0,04	5	C	0,37	12
B	0,08	6	C	0,34	12
B	0,09	6	D	0,41	13
C	0,05	7	D	0,48	13
C	0,21	7	D	0,66	15
C	0,14	7	D	0,68	15
C	0,12	8	D	0,58	15
C	0,15	8	D	0,65	16
C	0,16	8	D	0,76	18
C	0,18	8	D	0,81	18

- **Sistema de infiltración (equipo y aditamentos)**

Se realizó una revisión de la metodologías de extracción de fluido apoplástico, descritas en diferentes plantas (Tabla 3-2), para seleccionar y evaluar cuál de estas podía ser aplicada en el modelo de *H. brasiliensis*.

Resultados y discusión

Capítulo 3

Tabla 3-2: Parámetros reportados para extracción de fluido apoplástico en diferentes especies vegetales.

Referencia	Planta	N° de Hojas / Foliolos	Método De Infiltración	Tiempo, Presión de vacío y ciclos de vacío
(Butcher *et al.,* 2016)	*Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker de 4 semanas	-	Infiltración por vacío	Aprox. 24 psi
(Islas-Flores *et al.,* 2015)	*Grande naine Musa de 9 meses de cultivo*	5 hojas	Infiltración por vacío	1 hora a -25 InHg (-84 kPa)
(Guerra-Guimarães *et al.,* 2015)	*Coffea arabica* cortes de 2 cm	16 hojas, 10 ± 2.5 gr	Infiltración por vacío	-
(Araya *et al.,* 2015)	*A. thaliana*	20 hojas de 3 – 4 cm (1.5 gr)	Desecador conectado a una bomba de vacío	-80 hPa, 5 veces, 2 min
(Petriccione *et al.,* 2014)	*Actinidia deliciosa* “Hayward” 3, 6, 12 and 21 días	30 gr	Infiltración por vacío	70 kPa, for 15 min, x 2 ciclos
(O'Leary *et al.,* 2014)	*P. vulgaris* cv. Tendergreen *de* 21 días	Hojas cortadas en pequeños	Jeringa sin aguja de 60 ml / Infiltración por	-

		segmentos / Hojas enteras	vacío	
(O'Leary *et al.,* 2014)	*S. lycopersicum* 7 – 9 semanas	-	Jeringa sin aguja de 60 ml Infiltración por vacío	-
(O'Leary *et al.,* 2014)	*Arabidopsis thaliana* 7 semanas	-	Jeringa sin aguja de 60 ml Infiltración por vacío	
(Mueller *et al.,* 2013)	*N. benthamiana*	-	Cámara de vacío	200 mbar, 3-5 Veces X 15 min,
(Joosten, 2012)	*Solanum lycopersicum*	20 hojas	Infiltración por vacío	60 mbar (hPa), 46 Torr (mmHg)

Tabla 3-3: (Continuación)

Referencia	**Planta**	**N° de Hojas**	**Método De Infiltración**	**Tiempo, Presión de vacío y ciclos de vacío**
(Shenton *et al.,* 2012)	*Oryza sativa* ssp. Japonica cv Kakehashi	-	Usando un aspirador de agua en un Desecador conectado a una bomba de vacío.	-70 kPa X 5 min. Vacío liberado lentamente, 4 veces
(Hemetsberger *et el.,* 2012)	*Zea mays*	Hojas cortadas en trozos de 2 – 3 cm	Cámara de vacío	400 mbar, 3 veces X 15 min a
(Floerl *et al.,* 2012)	*Arabidopsis thaliana*	10 gr de hojas	Infiltración por vacío	−80 kPa x 5 min, 2 ciclos
(Witzel *et al.,* 2011)	*Z. maize* hojas cortadas en segmentos de 5 cm	-	Jeringa de 60 ml	Presión reducida estimada en 20 kPa.
(Floerl *et al.,* 2008)	*Brassica napus* var. *Nap us.* 3 semanas	-	Infiltración por vacío	-80 kPa, 5 min
(Mendoza-Rodríguez *et al.,* 2006)	Grande naine *Musa* (AAA) de 9 meses de	100 fragmentos de 2 cm^2	Infiltración por vacío	-X 30 min

Resultados y discusión

Capítulo 3

	cultivo			
(Boudart *et al.,* 2005)	*A. thaliana*	-	Desecador conectado a una bomba de vacío	2 min a T ambiente
(D'HAESE *et al.,* 2005)	*Trifolium repens* L.	8 hojas compuestas	Vacío	-90 kPa, 8 veces X 30 seg, intervalos de 15 seg, el vacío se liberó suavemente
(Lohaus *et el*., 2001)	*Vicia faba* L. (cv. Troy), *Spinacia oleracea* L., *Zea mays* L. (cv. Helix)	Hojas de 6 semanas de edad	Jeringa plástica de 60 ml	Presión reducida estimada en 20 kPa.

Tabla 3-4: (Continuación)

Referencia	**Planta**	**N° de Hojas**	**Método De Infiltración**	**Tiempo, Presión de vacío y ciclos de vacío**
(Husted *et el.,* 2000)	*Brassica napus L*. cv. Global) Semillas de canola (Lycopersicon esculentum L. cv. Moneymaker)	Segmentos de hoja de 25 x 50 mm	Jeringa plástica de 50 ml en un brazo hidráulico que mueve automáticamente el émbolo	0,4 MPa X 10 seg. Repetir el ciclo 8 veces.
(Seling *et al.,* 2000)	*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum*	3-4 hojas	Infiltración por vacío	-
(Olivieri *et al.,*	*S. tuberosum*	-	Infiltración por	-10 períodos

1998)	L. cv. Spunta		vacío	separados por intervalos de 30 segundos
(Fink *et al.,* 1988)	*Avena sativa L.*	12 g de hoja	Desecador conectado a una bomba de vacío	Por 15 min

A partir de las metodologías descritas, se decidió evaluar inicialmente el sistema de infiltración con jeringa sin aguja (Figura 3-4) empleado por Husted *et al.,* 2000; Witzel *et al.,* 2011; O'Leary *et al.,* 2014, sin embargo durante el desarrollo de esta metodologia la presión y el tiempo de infiltración variaron significativamente entre las repeticiones de los ensayos realizados con *S. lycopersicum* al igual que con los foliolos de *H. brasiliensis*, razón por la que se descarto esta metodología del estudio.

Se ha reportado el uso de foliolos cortados en pequeños segmentos (Araya *et al.,* 2015; O'Leary *et al.,* 2014; Hemetsberger, Herrberger, Zechmann, Hillmer & Doehlemann, 2012), sin embargo al realizar los cortes de los foliolos de *H. brasiliensis* produjo liberación de látex, adicionalmente se recomienda enjuagar con agua desionizada los segmentos de hoja para eliminar los contaminantes citoplasmáticos que exudan las células dañadas, pero el látex exudado se adhirió a los bordes de la hoja impidiendo su eliminación, por tal motivo, se decidió no emplear foliolos de *H. brasiliensis* cortados y considerar la aparición de látex como indicador de contaminación citoplasmática debido a su origen intracelular.

Posteriormente se evaluó el sistema de infiltración por vacío, esta técnica fue descrita en 1965 (Klement, 1965) y se ha utilizado para aislar fluido apoplástico en un gran número de especies vegetales (Zhang *et al.,* 2009; Andreasson, Abreha, & Resjö, 2017). *et al.,* 2017), en ésta se emplea un desecador o un matraz conectado a una bomba de vacío. De Wit & Spikman (1982) demostraron mediante esta metodología, la presencia de moléculas elicitoras en el fluido apoplástico de foliolos de *S. lycopersicum* infectadas con *C. fulvum*. Este sistema ha sido ampliamente utilizado en la búsqueda de proteínas efectoras y proteínas de resistencia en la interacción molecular de patosistemas, como es el análisis proteómico de hojas de *Coffea arabica* en interacciones de compatibilidad e incompatibilidad con *Hemileia vastatrix* (Guerra-Guimarães *et al.,* 2015). También se ha

Resultados y discusión

Capítulo 3

empleado en el estudio de la interacción de plantas de arroz y *Magnaporthe oryzae* para evaluar los cambios en la abundancia de las proteínas durante la interacción (Shenton *et al.,* 2012), en el estudio de efectores como Pep1 de *U, maydis* que bloquea las peroxidasas apoplásicas de su huésped en plantas de maíz (Hemetsberger *et al.,* 2012) y que además suprime la repuesta primaria evitando el estallido oxidativo, y en los protocolos descritos por Araya *et al.,* (2015) en *A. thaliana* y O'Leary *et al.,* (2014) en *S. lycopersicum* entre otros.

En la variante del segundo sistema se empleó un desecador de vidrio, de capacidad para 10 litros, con un matraz que contenía 3 foliolos, sumergidos en agua desionizada (Figura 2-3A), el desecador fue conectado a una bomba de vacío de medio caballo de fuerza, el ciclo de vacío se desarrolló a 20 inHg (Máxima presión manométrica alcanzada) durante períodos de 3, 5, 10 15 y 20 min. Sin embargo al liberar la presión de vacío, no se observó la aparición de áreas oscuras en la cara abaxial de los foliolos. El tercer sistema consistió en una modificación del segundo, se cambió el desecador de vidrio por un desecador de pasta de 5 litros (Figura 2-3B) para reducir el área y evitar pérdidas de vacío por el tamaño, sin embargo tampoco se obtuvieron resultados satisfactorios. En el cuarto sistema se cambió el desecador por un matraz de desprendimiento lateral de 1 litro (Figura 2-3C), con 2 foliolos de *H. brasiliensis,* el matraz fue conectado directamente a la bomba de vacío (Figura 2-3D) y una vez iniciado el ciclo de vacío, se observó la formación de burbujas sobre los foliolos (Figura 2-3E). En este sistema los foliolos empezaron a flotar y no se observó ningún resultado de infiltración.

Para corregir este resultado, 1 foliolo de *H. brasiliensis* fue enrollado dentro de un tubo falcón de 15 ml más 14 ml de agua desionizada (Figura 2-3F), se colocaron 2 tubos dentro del matraz, conformando el quinto sistema de infiltración (Figura 2-3G). A partir de

este sistema se observó la formación de burbujas en la parte superior del tubo falcón, pero solo el 10% del área del foliolo presentó áreas oscuras producto de la infiltración.

- **Presión de vacío**

Analizando el resultado obtenido con los tubos falcón, se concluyó que el problema radicaba en la potencia de la bomba, ya que no se estaba aportando la presión necesaria para liberar todo el aire del sistema e infiltrar satisfactoriamente los foliolos de *H. brasiliensis*. Para infiltrar los foliolos de *S. tuberosum* Andreasson y colaboradores (2017) emplearon una presión de 20 kPa, para hojas de *Grande naine Musa,* Islas-Flores y colaboradores (2015) utilizaron una presión de vacío de - 25 InHg (84 kPa). Shenton *et al.,* (2012) utilizaron una presión de vacío de -70 kPa para infiltrar hojas de *Oryza sativa*, mientras D'haese y colaboradores (2005) infiltraron *Trifolium repens L*. con una presión de vacío -90 kPa. Se realizó el cálculo de la presión de vacío a partir de la presión atmosférica de Bogotá, 753.13 hPa o 22,23991615 inHg (www.worldmeteo.info/es/america-del-sur/colombia/bogota/tiempo-101322/) y la fórmula de la presión absoluta (Tabla 3-3), demostrando que la presión de vacío en los 5 sistemas fue de -20 inHg, (-507,99 mmHg) es decir -67.7 kPa (Andreasson *et al.,* 2017).

Tabla 3-5: Cálculo de presión de vacío I.

Presión absoluta	P. atm + P. manométrica 22 inHg + 20 inHg = 42 inHg
Presión de vacío	P. atm – P. abs 22 inHg – 42 inHg = - 20 inHg. (-67 kPa)

Siendo un valor de presión de vacío menor a los reportados y con el antecedente de presencia de vasos laticíferos que afectan la permeabilidad de los foliolos de *H. brasiliensis* se concluyó que se estaba aplicando una presión insuficiente para lograr la infiltración, cabe resaltar que O'Leary *et al.,* (2014) propone un protocolo para la extracción de fluido apoplástico en *P. vulgaris* y *S. lycopersicum* pero no describe el valor de presión de vacío al cual somete el sistema de infiltración.

Resultados y discusión

Capítulo 3

Para incrementar la presión de vacío se empleó la bomba del equipo liofilizador LABCONCO (Tecniespectro) de un caballo de potencia, adicionalmente se concluyó que es importante exponer el área del foliolo al contacto con la solución de infiltración o el agua desionizada. Se descartó el uso de los tubos falcón y 2 foliolos de *H. brasiliensis* (peso aproximado de 0.40 gr) fueron colocados en el fondo del matraz con el lado abaxial hacia arriba (Andreasson *et al.,* 2017). Sobre ellos con ayuda de una pinza larga estéril, se colocaron canicas estériles (Figura 2-4) sin embargo por el peso de las canicas y la forma de colocarlas se rompieron algunas partes de los foliolos, produciendo liberación de látex, de manera que el uso de canicas se descartó del estudio. Finalmente se emplearon tubos de vidrio estériles para evitar que los foliolos flotaran durante el paso de infiltración (Figura 2-4).

El sexto sistema quedo conformado por un matraz con desprendimiento lateral, dentro del cual se colocaron 2 foliolos de *H. brasiliensis* sumergidos en agua desionizada con el lado abaxial hacia arriba y sostenidos por tubos de vidrio, y colocado dentro de la cabina de liofilización (Figura 3-4) tras cerrar herméticamente el equipo e iniciado el ciclo de vacío a 23 inHg (Máxima presión manométrica alcanzada) se evaluaron tiempos de 3, 5, 10, 15 y 20 min, se observó la formación de burbujas y transcurrido el primer ciclo de 3 min de infiltración se observó la aparición de áreas oscuras sobre el área foliar. Este resultado concuerda con lo descrito por algunos autores (Andreasson *et al.,* 2017; O'Leary *et al.,* 2014) quienes describen la aparición de zonas de color oscuro como producto de la infiltración (Figura 3-5).

Figura 3-4: Sistema de infiltración final. A. Aditamentos finales, tubos de vidrio y matraz. **B.** Equipo liofilizador para infiltración. **C.** proceso de infiltración.

Nuevamente se calculó la presión de vacío a partir de la presión atmosférica de Bogotá y la fórmula de la presión absoluta (Tabla 3-4), se demostró que en este sistema la potencia de la bomba del equipo liofilizador permitió alcanzar una presión manométrica de -23 inHg. (-584,19 mmHg) es decir -77.8 kPa siendo un valor de presión de vacío superior al reportado en algunas investigaciones (Andreasson *et al.,* 2017; Shenton *et al.,* 2012) la cual fue suficiente para lograr la infiltración en los foliolos de *H. brasiliensis*.

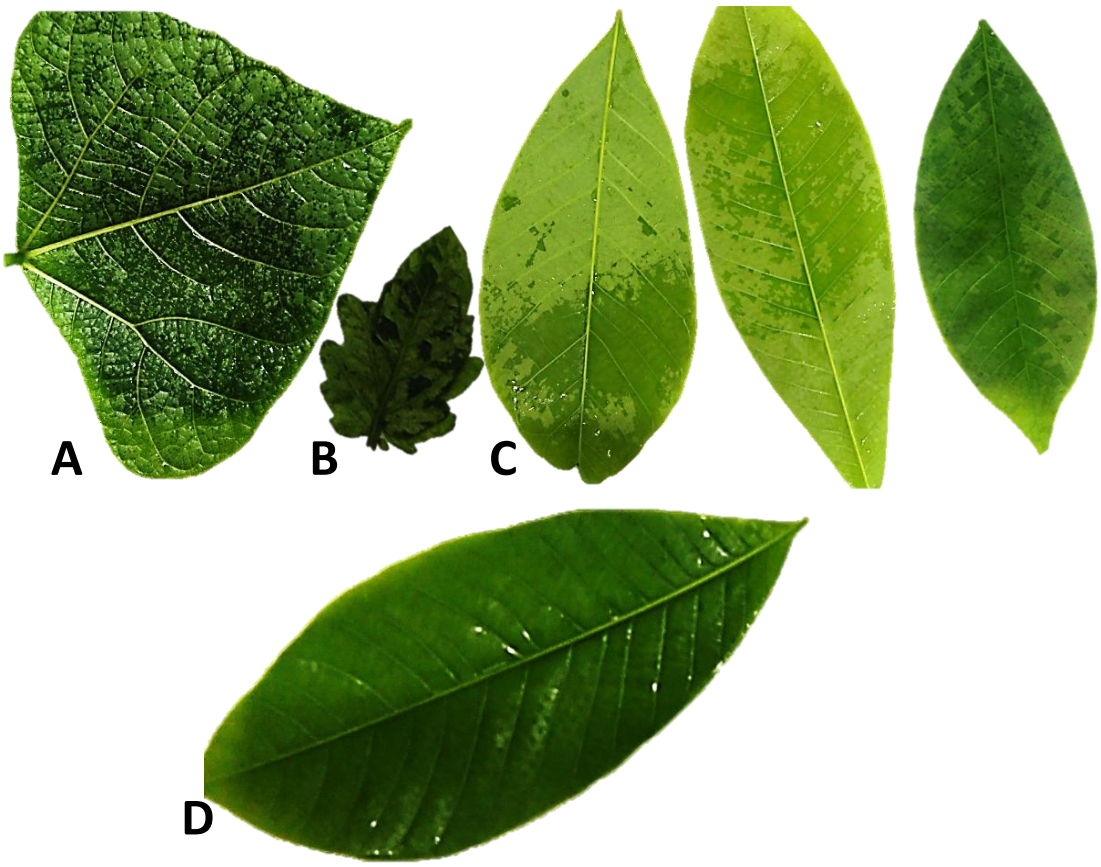
Tabla 3-6: Cálculo de presión de vacío II.

Presión absoluta	P. atm + P. manométrica 22 inHg + 23 inHg = 45 inHg
Presión de vacío	P. atm – P. abs 22 inHg – 45 inHg = - 23 inHg (-77.8 kPa)

Resultados y discusión

Capítulo 3

Figura 3-5: Infiltración. A. foliolo de *P. Vulgaris*. **B**. foliolo de *S. lycopersicum*. **C**. foliolos de *H. brasiliensis* parcialmente infiltrados. **D.** foliolo de *H. brasiliensis* totalmente infiltrado.



- **Número de foliolos a infiltrar**

En todos los sistemas evaluados no fue posible colocar más de 3 foliolos de *H. brasiliensis*, al evaluar el resultado de infiltrar 5 foliolos, solo 3 estaban infiltrados en más del 50% y los 2 sobrantes tenían menos del 10% del área infiltrada, cuando se colocaban

más de 10 foliolos, solo se observaba un área infiltrada menor al 5% en cada uno. En el último sistema evaluado se colocaron solo 2 foliolos de *H. brasiliensis* y se obtuvo una infiltración superior al 90 % del total del área del foliolo.

- **Ciclos de vacío**

Los ciclos de infiltración por vacío descritos en la Tabla 3-2 permiten observar una variación en la cantidad de ciclos y el tiempo que se realizan en cada especie vegetal. Para la infiltración de foliolos de *H. brasiliensis* el número de ciclos de vacío se relacionó directamente con el tiempo de duración de cada ciclo.

Una vez el manómetro alcanzó una presión de 23 InHg, se llevó el control del tiempo necesario para la liberación del aire en el interior del sistema (3, 5, 10, 15 y 20 min), durante este período, se observó la aparición de burbujas sobre el área foliar, que fueron desapareciendo al cabo de 3 minutos, no se observó ningún otro cambio aparente en el sistema en el resto de tiempos evaluados. El tiempo que tomó el ingreso del aire al sistema de vacío fue de 7 min. Al finalizar este primer ciclo de infiltración, se observó la aparición de áreas de color oscuro en la cara abaxial de los foliolos infiltrados (Figura 3-5C). Este ciclo se repitió 2 veces más, hasta observar más del 90% del área foliar infiltrada. Algunos de los protocolos en la Tabla 3-2 solo describen que debe aplicarse un vacío al sistema, pero no indican el valor de la presión ni el tiempo de cada ciclo, indican que el vacío debe ser liberado lentamente, sin embargo recomiendan repetir los ciclos hasta obtener toda el área infiltrada entre 3 y 5 veces.

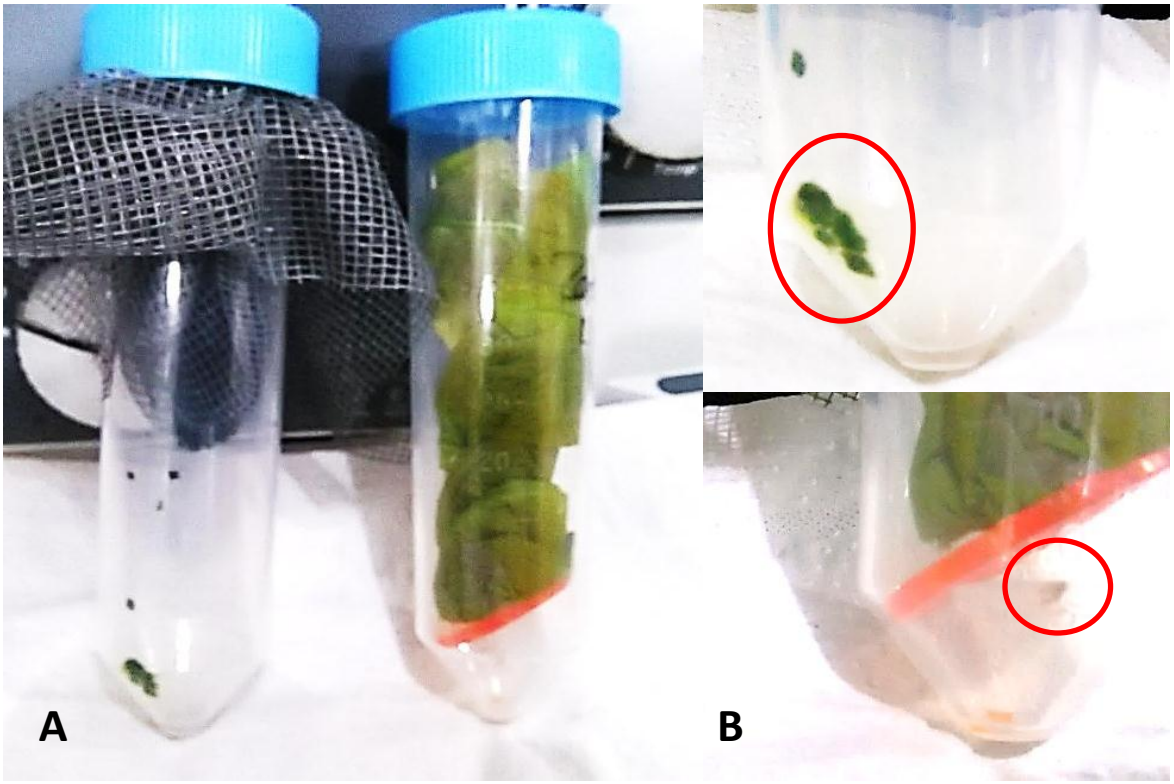
- **Sistema de centrifugación**

Una vez obtenido el material infiltrado, se retiraron los foliolos del sistema y se seco cada uno suavemente con papel absorbente para eliminar el exceso de agua desionizada de la superficie, se diseñaron 3 sistemas de centrifugación (Figura 2-5). Sin embargo el sistema de malla de Anjeo, cortaba el material vegetal produciendo contaminación con componentes citoplasmáticos, igual que el disco plástico (Figura 3-6). El sistema de papel Parafilm y jeringa, permitio recuper el fluido apoplástico, sin causar fragmentación de la hoja durante el paso de centrifugación.

Resultados y discusión

Capítulo 3

Figura 3-6: Sistemas de centrifugación. A. Sistema de malla de Anejo y disco plástico después del proceso de centrifugación **B**. En los círculos rojos se observan fragmentos de material vegetal, contaminando el fluido apoplástico extraído.



- **Gravedades de centrifugación**

La Tabla 3-5 muestra las gravedades de centrifugación descritas para diferentes tipos de plantas encontradas en la literatura, a partir de las cuales se desarrollaron las evaluaciones para recuperar el fluido apoplástico de los foliolos infiltrados de *H. brasiliensis* con el sistema de papel Parafilm descrito anteriormente.

Tabla 3-7: Gravedades evaluadas para *H. brasiliensis.*

Material vegetal	Gravedades de centrifugación	Referencia bibliográfica	Resultado en *H. brasiliensis*
S. tuberosum	1450–2100 *g* x 3 min	(Andreasson *et al.,* 2017)	Negativo*
Solanum lycopersicum cv. MoneyMaker	2000 *g* x 5 min 4 °C	(Butcher *et al.,* 2016)	Negativo*
C. arabica S4 Agaro	5000 *g* x 15 min	(Guerra-Guimarães *et al.,* 2015)	Negativo*
A. thaliana	100 *g* x 20 min 4°C	(Araya *et al.,* 2015)	Negativo*
Musa acuminata Grande Naine	10000 *g* x 10 min 4°C	(Islas-Flores *et al.,* 2015)	Contaminado
Actinidia deliciosa "Hayward"	2000 x *g* for 10 min 4 °C.	(Petriccione *et al.,* 2014)	Negativo*
P. vulgaris S. lycopersicum A. thaliana	1000 *g* x 10 min 4°C	(O'Leary *et al.,* 2014)	Negativo*
N. benthamiana	2000 *g* x 20 min 4°C	(Mueller *et al.,* 2013)	Negativo*
Z. mays	2000 *g* x 20 min 4°C	(Hemetsberger *et al.,* 2012)	Negativo*
O. sativa ssp. Japonica cv Kakehashi	1000 *g* x 5 min	(Shenton *et al.,* 2012)	Negativo*
Arabidopsis thaliana	1000 *g* x 8 min 4°C	(Floerl *et al.,* 2012)	Negativo*
Solanum lycopersicum	3000 *g* x 10 min 4°C	(Joosten, 2012)	Negativo*
Z. mays	400 *g* x 5 min 5°C	(Witzel *et al.,* 2011)	Negativo*
Brassica napus var. *napus*	900 *g* x 8 min 4°C	(Floerl *et al.,* 2008)	Negativo*
S. lycopersicum	1600 *g* x10 min	(Shabab *et al.,* 2008)	Negativo*
Grande Naine Musa (AAA)	3000 *g* x 10 min 4°C	(Mendoza-Rodríguez *et al.,*	Negativo*

Resultados y discusión

Capítulo 3

		2006)	
T. repens L. Trébol blanco	2000 *g* x 15 min 4°C	(D'HAESE *et al.*, 2005)	Negativo*
A. thaliana	200 *g* x 17 min 20°C	(Boudart *et al.*, 2005)	Negativo*
A. thaliana	830 *g* x 20 min	(Huang *et al.*, 2002)	Negativo*
Vicia faba L. (cv. Troy)	75 *g* x 4 min 4°C	(Lohaus *et al.*, 2001)	Negativo*

Tabla 3-8: (Continuación)

Material vegetal	**Gravedades de centrifugación**	**Referencia bibliográfica**	**Resultado en *H. brasiliensis***
Zea mays L. (cv. Helix).	90 *g* x 4 min 4°C	(Lohaus *et al.*, 2001	Negativo*
Spinacia oleracea L	220 *g* x 4 min 4°C	(Lohaus *et al.*, 2001	Negativo*
S. tuberosum ssp. *tuberosum*	440 *g* x 15 min	(Seling *et al.*, 2000)	Negativo*
B. napus L. cv. Global) Semillas de canola y (L. esculentum L. cv. Moneymaker)	2000 *g* for 10 min at 8°C	(Husted *et al.*, 2000)	Negativo*
S. tuberosum L. cv. Spunta	400 *g* x 20 min	(Olivieri *et al.*, 1998)	Negativo*
Hordeum vulgare L. Cebada	1000 *g* x 10 min	(Blinda *et el.*, 1997)	Negativo*
S. lycopersicum	3000 *g* x 10 min	(De Wit & Spikman, 1982)	Negativo*

*Negativo: no se obtuvo fluido apoplástico después de la centrifugación. *Contaminado: presencia de látex en el fluido apoplástico.

A partir de los resultados obtenidos en las evaluaciones de centrifigacion descritos en la tabla 3-5, se consideró que con gravedades inferiores a 5000 *g*, a diferencia de los reportados para otros materiales vegetales no es posible obtener fluido apoplástico de foliolos de *H. brasiliensis*, esto debido quizás a la presencia de vasos laticíferos en la hoja que probablemente interfieren en el proceso de centrifugación. Teniendo en cuenta lo anterior se seleccionaron valores de gravedad superiores a 5000 *g* para realizar nuevos ensayos (Tabla 3-6). A partir de los cuales se pudó establecer que las gravedades necesarias para la extracción de fluido apoplástico en foliolos de *H. brasiliensis* corresponde a 8000 *g* x 20 min. Si este valor se incrementa se observa la presencia de látex, el cual es considerado en este estudio como un indicador de contaminación citoplasmática.

El tiempo de centrifugación también debió ser incrementado ya que se observó que se obtienen mejores rendimientos, con el doble del tiempo reportado en otros protocolos sin afectar la calidad del fluido obtenido. Este resultado es comparable con los reportados por Delaunois *et al.,* (2013)*;* Delaunois *et al.,* (2016*),* quien optimizo el protocolo para extracción de fluido apoplástico en hojas de uva (*Vitis vinifera* L.) debido a la dificultad para recuperar el fluido por centrifugación, aumentando la velocidad de centrifugación hasta 7.500 *g*.

Tabla 3-9: Gravedades de centrifugación evaluadas para *H. brasiliensis.*

Gravedades de centrifugación	**Resultado en *H. brasiliensis***
6000 *g* x 10 min	Negativo*
7000 *g* x 10 min	Escaso*
7000 *g* x 20 min	Escaso*
8000 *g* x 10 min	Escaso*
8000 *g* x 20 min	Aceptable*
9000 *g* x 10 min	Presencia de látex escasa

Resultados y discusión

Capítulo 3

10000 *g* x 10 min	Presencia de látex moderada
11000 *g* x 10 min	Presencia de látex abundante

*Negativo: no se obtuvo fluido apoplástico.
*Escaso: inferior a 3 µl de fluido apoplástico
*Aceptable: 8-10 µl de fluido apoplástico por hoja
*Presencia de látex: El látex se observa como un sólido de color blanco sumergido en aproximadamente 20 µl de fluido apoplástico.

- **Buffer de infiltración y SDS – PAGE**

En muchos estudios se usa el agua desionizada como buffer de infiltración (O'Leary *et al.,* 2014; Joosten, 2012; Lohaus *et al.,* 2001; De Wit & Spikman, 1982), los sistemas anteriormente descritos fueron evaluados con agua desionizada. Sin embargo otros autores reportan el uso de buffers que contengan compuestos tales como sales o tampones, para mejorar la extracción de las proteínas (Boudart *et al.,* 2005) o para prevenir la lisis de la membrana plasmática (Andreasson *et al.,* 2017; Witzel *et al.,* 2011). Con base en lo anterior se evaluaron 2 buffer de infiltración, para comparar posteriormente los perfiles de separación de las proteínas obtenidas.

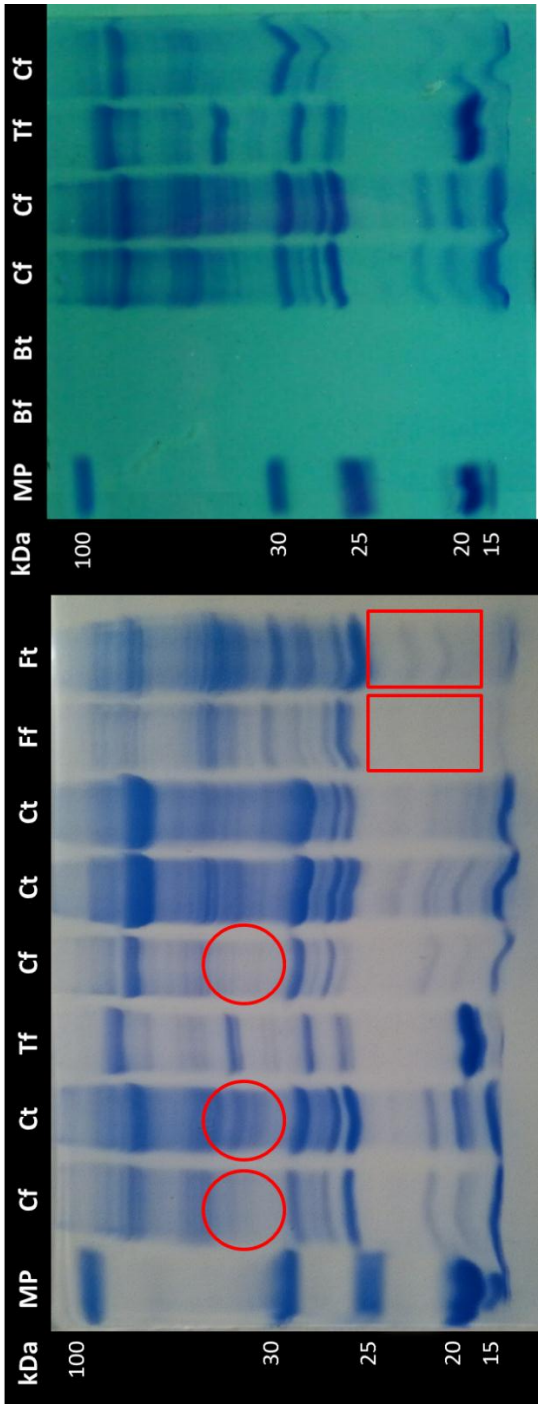
Los buffer seleccionados fueron: I) Tris-HCl 50 mM pH 8,0 / Nacl 0.6M / β-mercaptoetanol 0.1% (v/v) (Olivieri *et al.,* 1998) II) NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 0,1 M pH 6,5 / NaCl 50mM (Witzel *et al.,* 2011). Los fluidos obtenidos fueron analizados mediante SDS-PAGE al 16% (Laemmli, 1970), para observar la distribución electroforética y la presencia de proteínas en cada uno de los extractos de fluido apoplástico de *S. lycopersicum, P. vulgaris* y *H. brasiliensis*. El contenido de proteína de cada extracto fue cuantificado por Qubit y Nanodrop. 40 µg de proteína (20 µl) fueron cargados en el gel (Calderan-Rodrigues *et al.,* 2016) (Figura 3-8). Mientras que el rendimiento de extracción de las proteínas fue similar en ambos buffer para las tres especies vegetales, los perfiles de proteínas mostraron

algunas diferencias, se destacan dos bandas de aproximadamente 40 - 50 kDa presentes en los extractos de *H. brasiliensis* obtenidos con el buffer de infiltración Tris-HCl pero ausente en los perfiles del buffer fosfato de sodio, círculos rojos (Figura 3-7). Dos bandas de aproximadamente 23 y 21 kDa se observan en el extracto de *P. vulgaris* infiltrado con buffer Tris-HCl, que no se observan en el extracto infiltrado con el buffer fosfato de sodio, cuadros rojos (Figura 3-7). En los extractos del apoplasto de cada una de las especies evaluadas se obtuvo un alto número de bandas (15 – 20), con un patrón proteico de mayor intensidad cuando se empleó la solución Tris-HCl como buffer de infiltración en comparación con el perfil de las proteínas que fueron obtenidas con el buffer fosfato de sodio. Este resultado concuerda con el descrito por Witzel *et al.,* 2011, que compara el perfil proteico de seis buffers de infiltración para extracción de fluido apoplástico en hojas de maíz (Agua, 20 mM ácido ascórbico /20 mM CaCl2, 100 mM sorbitol, 25 mM Tris-HCl, 100 mM buffer fosfato de sodio y 50 mM NaCl) y describe un patrón proteico de mayor abundancia en el perfil obtenido con el buffer Tris-HCl. El autor describe que al emplear el agua y el buffer Tris-HCl como buffer de infiltración, se produce disrupción de la membrana plasmática, razón por la cual se obtiene un perfil proteico con mayor numero de bandas, a diferencia de los resultados obtenidos con el buffer fosfato de sodio con el cual se obtiene un menor número de proteínas contaminantes intracelulares. Con base en lo anterior, se decidió emplear el buffer fosfato de sodio como buffer de infiltración para la estandarización de la metodología en *H. brasiliensis.*

Resultados y discusión

Capítulo 3

Figura 3-7: SDS PAGE Perfiles proteicos. Extractos de fluido apoplástico de *P. vulgaris S. lycopersicum* y *H. brasiliensis*. Este gel muestra la comparación entre los componentes proteicos del fluido apoplástico obtenidos con diferentes buffer de infiltración. En todos los carriles fueron cargados 40 µg de proteína. Siglas de la Figura: T: Tomate, C: Caucho, F: frijol, B: buffer, t: buffer tris, f: buffer fosfato. Marcador de peso: Page Ruler Unstained Low Range Protein Ladder (10 µl). Tinción con Azul de coomassie



Discusión

El espacio apoplástico esta compuesto por la matriz de la pared celular y el espacio intercelular o extracelular, es un compartimentó dinámico con un amplio rango de

Resultados y discusión

Capítulo 3

funciones biológicas, en este, se realizan procesos de transporte de agua y nutrientes, interacciones planta patógeno, percepción y transducción de señales ambientales (Witzel *et al.,* 2011). El estudio de los cambios de la dinámica de la composición de las proteínas apoplásticas se ha convertido en un campo muy activo de investigación (Zhang *et al.,* 2009). Para un análisis diferencial mediante la visualización de las proteínas del apoplasto expresadas durante la interacción planta patógeno, la calidad del extracto obtenido es crucial. Existen varios métodos comúnmente utilizados para extraer el fluido apoplástico entre ellos la aplicación de presión mediante la bomba Scholander, la infiltración con jeringa y el método de infiltración por vacío (Lohaus *et al.,* 2001; Zhang *et al.,* 2009), sin embargo de todos los métodos este último ha sido el más empleado en la obtención de fluido apoplástico de diferentes especies vegetales, seguido de un paso de centrifugación para colectar el fluido apoplástico (Witzel *et al.,* 2011; Zhang *et al.,* 2009; Lohaus *et al.,* 2001; Dannel, Pfeffer & Marschner, 1995).

Existen grandes diferencias en la facilidad con la que se infiltran diferentes foliolos y el fluido apoplástico que posteriormente es recuperado por centrifugación (Tabla 3-2 y Tabla 3-5). Estas diferencias están correlacionadas con la fuente de tejido vegetal, la variedad, el tipo de hoja, la edad, el peso y la presión atmosférica, por lo que un flujo de trabajo altamente estandarizado es útil para aumentar la reproducibilidad de los experimentos (Lohaus *et al.,* 2001). O´leary (2014) describe que se obtiene con mayor facilidad y con mayor rendimiento fluido apoplástico de *P. vulgaris* de la variedad Tendergreen que del cultivar Canadian Wonder, resaltando que existen grandes diferencias en el proceso de extracción entre variedades de la misma especie. En este estudio solo se evaluó el comportamiento del clon RIMM 600 por su alta susceptibilidad al ataque de *M. ulei*. Sin embargo para futuros ensayos se recomienda evaluar el proceso de infiltración- centrifugación en otros clones y compararlo con el aquí demostrado.

Se deben examinar cuidadosamente varios tipos de foliolos antes de decidir sobre una fuente de tejido para la extracción de fluido apoplástico. El tamaño y la edad de los foliolos juegan un rol principal en el proceso de extracción, la infiltración de *P. vulgaris* se realiza con hojas completamente expandidas de 21 días de edad, las cuales son consideradas como las primeras hojas verdaderas (O´leary *et al.,* 2014). Andreasson y colaboradores (2017) recomiendan utilizar hojas de *S. tuberosum* de 5 semanas de edad, mientras O´leary y colaboradores (2014) recomiendan usar hojas de *S. lycopersicum* de 7 semanas de edad, sin embargo los foliolos de *H. brasiliensis* de mas de 5 semanas de edad no se pudieron infiltrar, lo cual puede ser asociado a la acumulación de lignina en la pared celular y el incremento de tamaño de los vasos laticíferos en la hoja, que afectan e impiden la permeabilización, haciendo necesaria la implementación de un sistema de mayor potencia.

La lisis celular total o parcial se presenta cuando el esfuerzo mecánico encontrado por las células es demasiado alto durante las etapas de infiltración o centrifugación, resultando en la presencia de contaminantes citoplasmáticos indeseables, por lo tanto el procedimiento para un tipo de hoja dado, debería ser un equilibrio optimizado entre maximizar el rendimiento y minimizar la contaminación citoplasmática. En todos los casos se debe optimizar la velocidad de centrifugación, controlando el volumen recuperado y un nivel mínimo de contaminación en el apoplasto. Se utilizan como marcadores de contaminación citoplasmática las actividades de enzimas como MDH, G6PDH y glucosa-fosfato isomerasa, las cuales permanecen bajas hasta un umbral de centrifugación, e incrementan por lisis o fugas citoplasmáticas (Nouchi, Hayashi, Hiradate, Ishikawa, Fukuoka, Chen & Kobayashi, 2012; Lohaus *et al.,* 2001).

La evaluación de metabolitos como fosfatos de hexosa o clorofila son indicadores de fuga citoplasmatica, pero son menos empleados (Baker *et al.,* 2012), sin embargo, cualquier tipo de ensayo puede ser útil para la cuantificación relativa de la contaminación apoplástica entre muestras. Idealmente deben usarse múltiples mediciones independientes para validar la integridad del fluido, debido a que los foliolos que son difíciles de infiltrar requieren posteriormente velocidades de centrifugación más altas, los rendimientos de fluido apoplástico obtenido son menores, lo cual afecta la posibilidad de

Resultados y discusión

Capítulo 3

evaluación de actividades enzimáticas, en este sistema se empleo la presencia de látex como un indicador de contaminación celular, debido a su origen citoplasmático y la escaza cantidad de fluido obtenido.

Nouchi *et al.,* (2012) e Islas-Flores *et al.,* (2015), describen el proceso de obtención de fluido apoplástico a partir de secciones cortadas de hojas de *O. sativa* y *Grande naine Musa*, las cuales son difíciles de manejar e infiltrar y requieren una mayor centrifugación, sin embargo cuando se usan secciones de hojas cortadas es posible obtener altos niveles de contaminación aun a pesar del lavado extensivo de los sitios de corte. En secciones cortadas de raíz de *Zea mays L*, la G6PDH se detectó después de la extracción de fluido apoplástico en todas las velocidades de centrifugación, la cual fue en aumento de la concentración a mayores velocidades, indicando contaminación citoplasmática a causa del corte de la hoja (Maksimović *et al.,* 2014). Los foliolos de *H. brasiliensis* al ser cortados presentaron liberación de látex en los cortes, el cual se quedo adherido creando un tapón en los bordes de la hoja que no fue posible retirar en los lavados posteriores, haciendo obligatorio el uso de foliolos enteros.

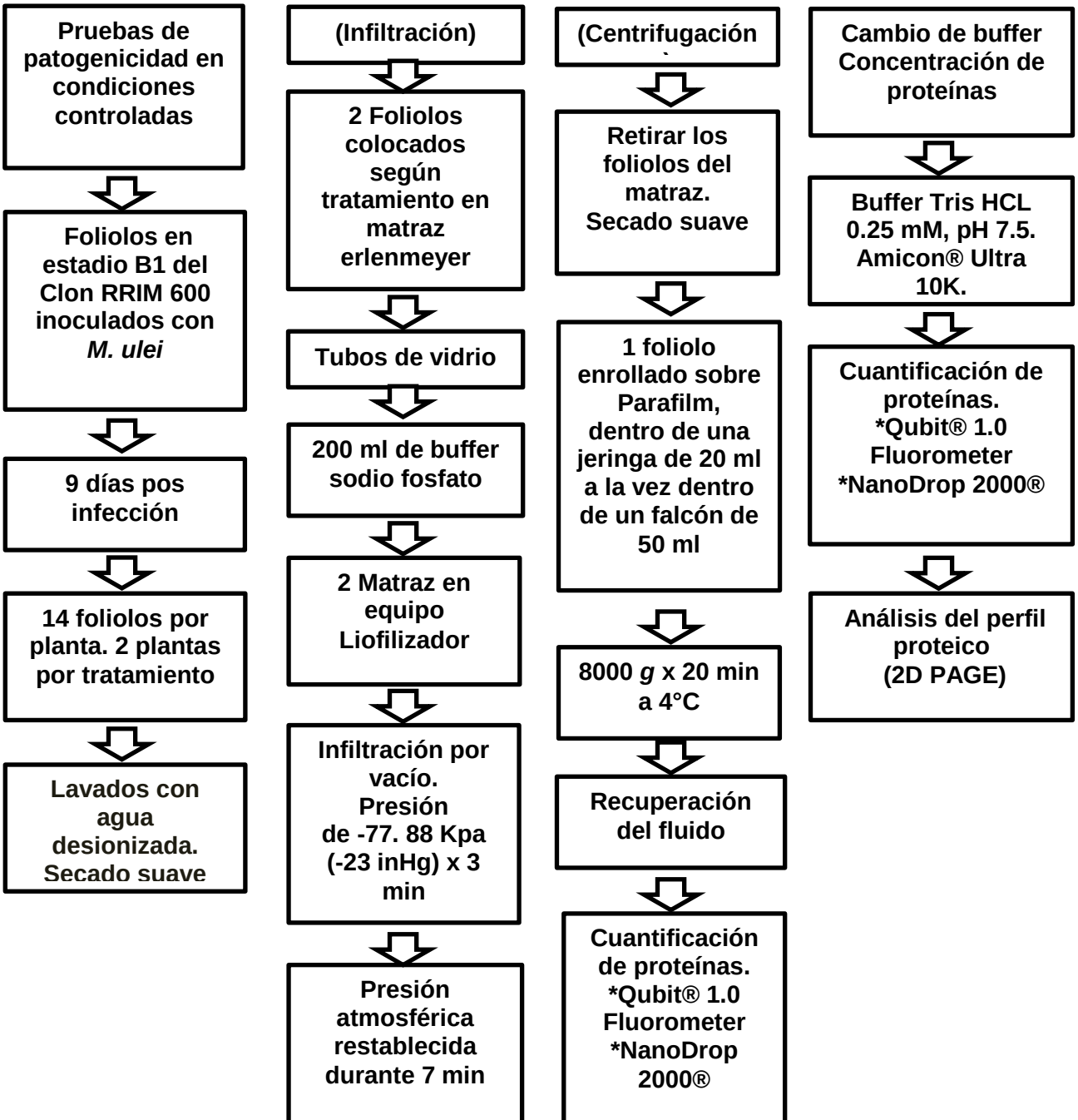
La infiltración se realizó con buffer fosfato de sodio como recomienda Witzel *et al* (2011) para mejorar la extracción de proteínas y prevenir la lisis de la membrana plasmática, ya que se obtiene un menor número de proteínas contaminantes intracelulares. El uso de papel Parafilm como soporte de la hoja durante la etapa de centrifugación (Baker *et al.,* 2012; O´leary 2014), permite mejorar la eficacia de la extracción del fluido, ya que minimiza el daño en la hoja ocasionado por el exceso de plegado y compresión observado cuando se emplean mallas o soportes plásticos perforados.

La técnica de infiltración-centrifugación es una técnica simple y robusta que presenta algunas limitaciones entre las que se encuentran la imposibilidad de recuperación de

todas las moléculas presentes en el apoplasto porque algunos compuestos (cationes y proteínas) pueden estar estrechamente asociados con la pared celular cargada negativamente (Boudart *et al.,* 2005), y las velocidades de centrifugación algunas veces pueden ser insuficientes para permitir la remoción de proteínas de alto peso molecular (Lohaus *et al.,* 2001).

A continuación se presenta un esquema claro de la metodología que se debe seguir para obtener fluido apoplástico, a partir de foliolos de *H. brasiliensis* en estadio foliar C.

Figura 3-8: Esquema de metodología de infiltración estandarizada para extracción de fluido apolastico de foliolos de *H. brasiliensis* en estadio C.



4. Capítulo 4

4.1 Objetivo 2. Identificar moléculas candidatas a proteínas efectoras de *M. ulei* en el fluido apoplástico de *H. brasiliensis* posinfección

4.1.1 Identificación de *M. ulei*

El aislamiento de *M. ulei* fue obtenido a partir de hojas del clon GT 1, presentó micelio de aspecto aterciopelado color verde oliva en la cara abaxial de la hoja, a partir del cual se observaron a nivel microscópico conidias características, a medida que el hongo fue creciendo en el medio de aislamiento, presentó micelio corto de color grisáceo claro y oscuro, hasta formar estructuras estromáticas de color café oscuro. En medio de esporulación se observaron estructuras estromáticas de color café oscuro que presentaron una coloración gris claro en la superficie. A nivel microscópico se observó micelio dematiaceo septado y presencia de conidióforos en forma de botella, con desarrollo simpodial de conidias solitarias, septadas, curvadas, lisas e hialinas con un tamaño entre 15–65 x 6–11 µm (Figura 4-1) (Schubert *et al.,* 2003).

El análisis de la secuencia de ADN correspondiente a la región ITS se realizó mediante amplificación por PCR (Pérez-Vera *et al*., 2005). La visualización de los amplímeros se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, donde se observó un fragmento de aproximadamente 530 pb (Figura 4-2). Como producto de la secuenciación, se obtuvo una secuencia consenso de 479 pb (ANEXO C), los resultados de la comparación contra la base de datos del GenBanK arrojaron un 100% de identidad contra la accesión EF543263.1 correspondiente al aislamiento de *M. ulei* IBUN-SINCHI Mu1 (García-Romero, 2012), y un 100 % de identidad contra la accesión KT935503.1 correspondiente al aislamiento FP151233 de *Pseudocercospora ulei*. Su relación

filogenética con otros géneros de la familia Mycosphaerellaceae o sus estados anamórficos se confirmó con los porcentajes de identidad del 88 y 87% (Figura 4-3).

Figura 4-1: Estructuras macro y microscópicas de *M. ulei* in vitro. **A.** Lesión conidial de *M. ulei* en foliolo de *H. brasiliensis*. **B.** Conidias típicas de *M. ulei*. 100 X provenientes de lesión **C.** Formación de colonia y estroma *in-vitro* de *M. ulei,* 10 y 20 días de siembra en medio de aislamiento. **D.** Estroma maduro de *M. ulei in vitro,* 45 días en medio de mantenimiento. **E.** Esporulación *in-vitro* de *M. ulei* 10 días en medio de esporulación. **F.** Conidias de *M. ulei* extraídas de medio de esporulación teñidos con azul de lactofenol 100 X.

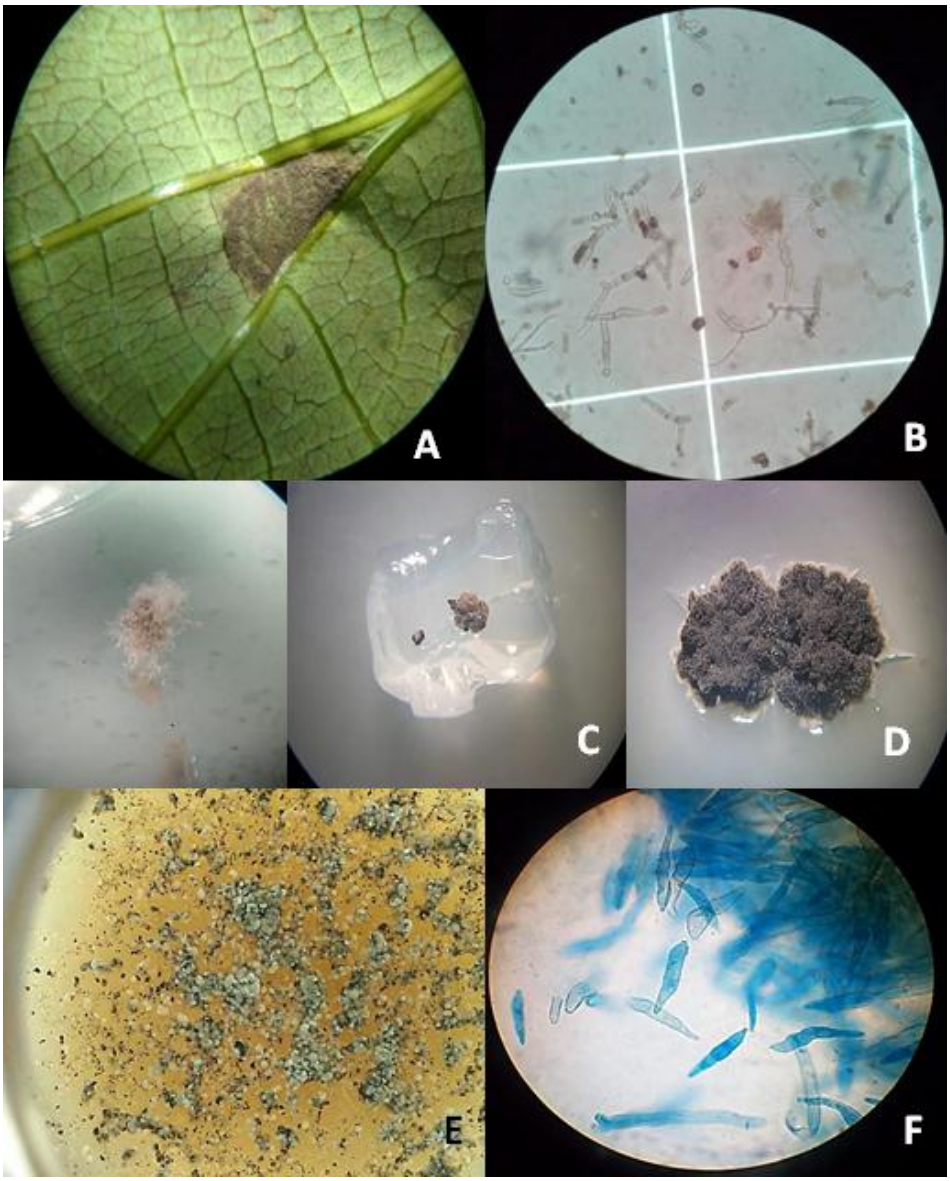


Figura 4-2: Amplímeros de la región ITS. Mp. marcador de peso molecular. **Carril (1 y 3)** aislamiento de *C. gloeosporioides* (control, positivo). **Carril (2)** aislamiento de *M. ulei*. **Carril (4)** control de reactivos de la PCR.

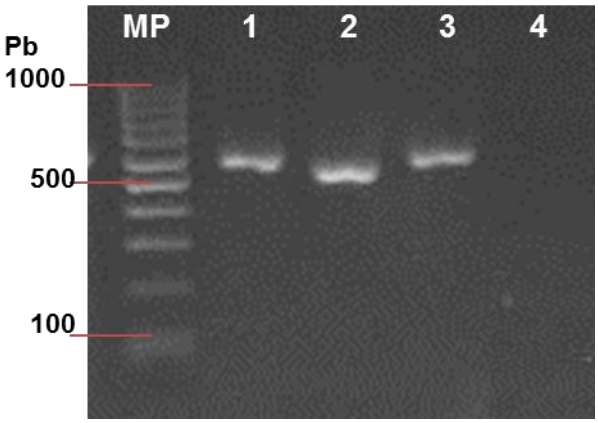


Figura 4-3: Formato de salida Blastn. Resultados de comparación secuencia ITS contra base de datos GenBank.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☑	Microcyclus ulei isolate IBUN-SINCHI Mu1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcrib	885	885	100%	0.0	100%	EF543263.1
☐	Microcyclus ulei isolate IBUN Mu67 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa	839	839	97%	0.0	99%	EF543264.1
☐	Microcyclus ulei isolate IBUN Mu95 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa	828	828	97%	0.0	99%	EF543266.1
☐	Microcyclus ulei isolate IBUN Mu71 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spa	817	817	96%	0.0	98%	EF543265.1
☐	Microcyclus ulei isolate AC 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.:	804	804	92%	0.0	99%	KC800721.1
☐	Microcyclus ulei isolate UFVMu01ES 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp	804	804	92%	0.0	99%	KC800719.1
☐	Microcyclus ulei isolate UFVMu05MT 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp	804	804	92%	0.0	99%	KC800718.1
☐	Microcyclus ulei isolate UFVMu01RO 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp	804	804	92%	0.0	99%	KC800717.1
☐	Pseudocercospora cladrastidis genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and compl	531	531	94%	8e-147	88%	AB694922.1
☐	Pseudocercospora cladrastidis genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and compl	531	531	94%	8e-147	88%	AB694921.1
☑	Pseudocercospora ulei strain FP151233 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal	518	518	58%	6e-143	100%	KT935503.1
☐	Pseudocercospora pseudostigmina-platani strain CPC 11726 culture-collection CBS:131588 18S riboso	516	516	93%	2e-142	88%	GU269857.1
☐	Stigmina sp. CPC 11721 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA ge	516	516	93%	2e-142	88%	GU214700.1
☐	Pseudocercospora sp. CPC 11726 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac	516	516	93%	2e-142	88%	DQ303089.1
☐	Pseudocercospora camelliicola voucher TNM 3774 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal	503	503	88%	2e-138	88%	KJ201933.1
☐	Pseudocercospora clematidis strain CPC 11657 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra	503	503	93%	2e-138	87%	DQ303072.1
☐	Pseudocercospora exilis strain CPC 25193 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri	492	492	93%	4e-135	87%	KT290139.1
☐	Cercosporella dolichandrae strain CPC 22948 culture-collection CBS:138101 18S ribosomal RNA gene,	492	492	94%	4e-135	87%	KJ869140.1
☐	Cercosporella virgaureae strain CBS 113304 culture-collection CBS:113304 18S ribosomal RNA gene, p	490	490	94%	1e-134	87%	KF251301.1
☐	Pseudocercospora ocimi-basilici strain CPC 10283 culture-collection CPC:10283 18S ribosomal RNA ge	490	490	93%	1e-134	87%	GU269754.1
☐	Pseudocercospora ocimicola strain CPC 10283 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1,	490	490	93%	1e-134	87%	GU214678.1
☐	Pseudocercospora vitis strain JZB360014 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosom	488	488	94%	5e-134	87%	KP636434.1

Una vez el hongo fue identificado morfológica y molecularmente, fue depositado en el Banco de Genes y Cepas del IBUN con el código GCL08112014.

4.1.2 Desarrollo de la enfermedad

M. ulei generó síntomas cloróticos en el clon RIMM600 a los 5 días posinfección, claramente visibles en el día 9 (Figura 4-4). Los síntomas de deformación foliar aparecieron después del 6 día y se observaron fuertemente en el día 12. El índice de esporulación evaluado a los 15 días posinfección fue de 4, valor propuesto para considerar el clon como susceptible (Figura 4-5) característica que permite demostrar la capacidad de infección del aislamiento de *M. ulei* GCL08112014 (Mattos *et al.,* 2003).

Figura 4-4: Síntomas de la infección. Foliolos del Clon RRIM 600 a los 9 y 12 días posinoculación con el aislamiento de *M. ulei* GCL08112014. Foliolos con síntomas de SALB y lesiones esporuladas a los 12 días posinoculación (10x).

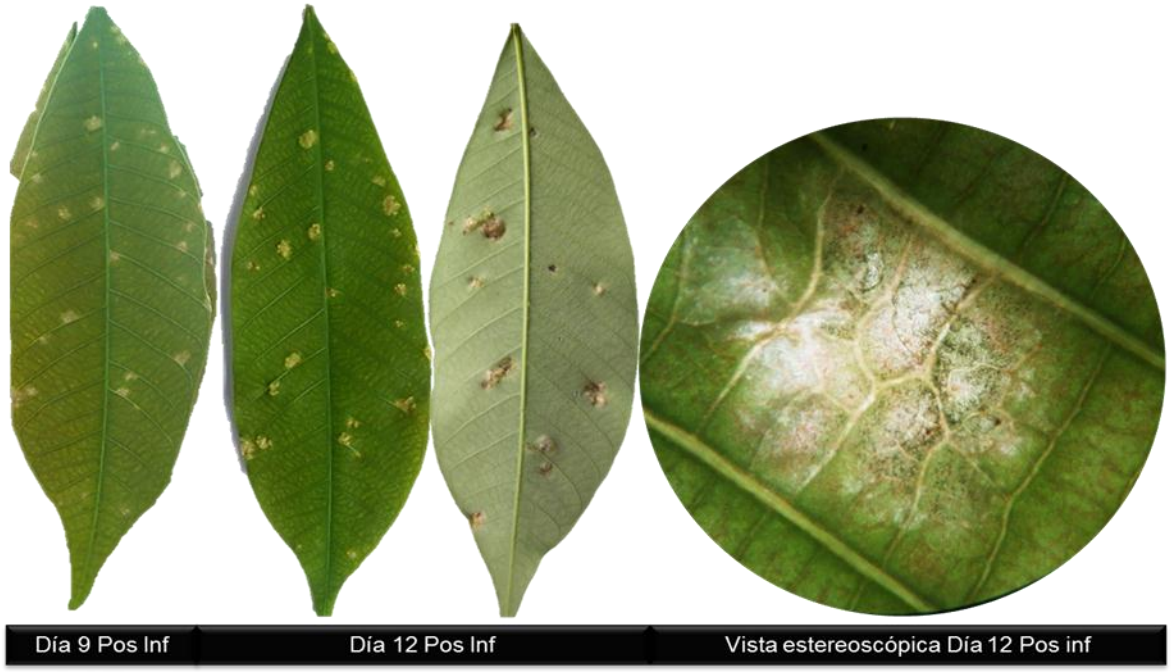


Figura 4-5: Síntomas de la infección. Foliolos del Clon RRIM 600 a los 15 días pos inoculación con el aislamiento de *M. ulei* GCL08112014 y lesiones esporuladas a los 15 días posinoculación (10x).

4.1.3 Aislamiento del fluido apoplástico de *H. brasiliensis* posinfección

El fluido apoplástico fue extraído después de 9 días de inoculación, 14 foliolos por planta fueron cortados desde la base (2 plantas por cada tratamiento), se sometieron al mismo tratamiento de infiltración 2 foliolos de la planta inoculada con *M. ulei* y 2 de la planta sin inocular, los foliolos fueron pesados, lavados con agua desionizada, secados, colocados según el tratamiento (Inoculados y sin inocular), a partir de los fluidos obtenidos de cada réplica, 4 µl fueron cuantificados por fluorometría y por absorbancia (Tabla 4-1).

Tabla 4-1: Concentración de fluido apoplástico obtenido.

N° DE PLANTA	TRATAMIENTO	N° DE FOLIOLOS	VOLUMEN OBTENIDO TOTAL	CONCENTRACIÓN OBTENIDA TOTAL
1	Inoculada	14	98	1.35 µg/µl
2	Inoculada	14	112	1.23 µg/µl
3	Sin inocular	14	96	1.45 µg/µl
4	Sin inocular	14	122	1.17 µg/µl

4.1.4 Cambio de buffer y concentración del fluido

A cada uno de los fluidos obtenidos se les realizó el cambio de buffer sodio fosfato, por el buffer Tris-HCl 25 mM pH 7.5 debido a que este ultimo, al poseer carga interfiere y afecta los análisis en 2D. El cambio se realizó mediante los filtros de centrifugación Amicon® Ultra 10K (Zhang *et al.,* 2009). En la tabla 4-2 se observa el efecto concentrador del paso por la columna de cada fluido, después de realizado el cambio de buffer.

Tabla 4-2: Cambio de buffer y concentración de fluido apoplástico.

N° DE PLANTA	TTO	VOLUMEN INICIAL	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN FINAL	CONCENTRACION FINAL
1	Inoculada	98	2.35 µg/µl	35	12.5 µg/µl
2	Inoculada	112	1.90 µg/µl	34	17.7 µg/µl
3	Sin inocular	122	1.75 µg/µl	30	2.81 µg/µl
4	Sin inocular	105	1.45 µg/µl	35	2.83 µg/µl
5	Sin inocular	120	2.25 µg/µl	24	17.00 µg/µl
6	Sin inocular	108	2.04 µg/µl	28	15.4 µg/µl

4.1.5 Visualización de las proteínas presentes en el fluido apoplástico

Para el desarrollo del primer IEF se emplearon tiras de pH 4 – 7 y un extracto comercial de proteínas totales de *E. coli* del kit ReadyPrep 2 – D Starter Kit® como control de la técnica, la concentración de las proteínas de *E. coli* fue confirmada por fluorometría y correspondió a 1.35 µg/µl de proteína. El resultado obtenido en el perfil proteico del control de *E. coli* corresponde al reportado en el inserto del ReadyPrep 2 – D Starter Kit® BioRad (Figura 4-6) y permitió evaluar las condiciones de voltaje, las cuales demostraron ser óptimas para el desarrollo del IEF a pesar de ser más bajas de lo reportado en la literatura. En la misma dentro de los círculos rojos, se observan las escasas proteínas obtenidas de la mezcla de los fluidos apoplásticos (plantas N° 3 y 4), dos spots con

pesos aproximados entre los 15 y 5 kDa, que se ubican en una región de pH 4 – 5, a la vez que dos spots de mayor peso, entre 55 y 100 kDa, tan solo se observa 1 spot de peso aproximado de 55 kDa, que se ubica en un pH cercano a 6. A pesar de haber colocado una cantidad de proteínas igual al control de *E. coli*, este resultado reveló la necesidad de realizar un ensayo en un rango de pH más amplio ya que se consideró que gran cantidad de proteínas debían encontrarse en otro rango de pH, adicionalmente se aumentó la concentración.

Se procedió a realizar un segundo ensayo de IEF, en el que se emplearon tiras de ZOOM® Strips de pH 3 – 10 de 7 cm de longitud, para el control de *E. coli* se utilizaron las mismas condiciones del fluido apoplástico de *H.* brasiliensis de la planta N° 5, se colocaron 20 µl (17.00 µg/µl x 20 µl= 340 µg), a los cuales se les añadieron 135 µl de buffer de rehidratación para completar los 155 µl de volumen final, la concentración final en la tira fue de 2.19 µg/µl de proteína (340 µg / 155 µl= 2.19 µg/µl). La rehidratación de las tiras se realizó en agitación suave durante 12 horas a temperatura ambiente, el IEF y el SDS-PAGE se realizaron de la forma anteriormente descrita.

En este segundo ensayo de 2D-PAGE se utilizó nuevamente el control de *E. coli* para validar las condiciones de la técnica empleada, al igual que en la figura 4-6, se observa un perfil proteico de buena concentración dada la intensidad de los spots revelados, con una amplia variedad de proteínas distribuidas en relación a su masa y carga, que corresponden con lo reportado en el inserto del Kit.

El análisis 2D-PAGE del fluido apoplástico de la planta N° 5 de *H. brasiliensis* en un rango de pH 3–10 (Figura 4-7) permitió observar una mayor cantidad de spots, en relación con la Figura 4-6, de buena intensidad debido al incremento de la concentración, que se distribuyen en relación a su masa y carga (círculos rojos), dentro de los que cabe resaltar una región concentrada de características alcalinas (cuadro rojo) que presentan tamaños entre los 20 y 5 kDa aproximadamente.

Figura 4-6: Gel bidimensional. A. Extracto de proteínas de *E. coli* (control de la técnica). **B.** Proteínas presentes en el fluido apoplástico de *H. brasiliensis*. IEF (pH 4-7). SDS-PAGE al 16%. Teñido con Azul de Coomassie.

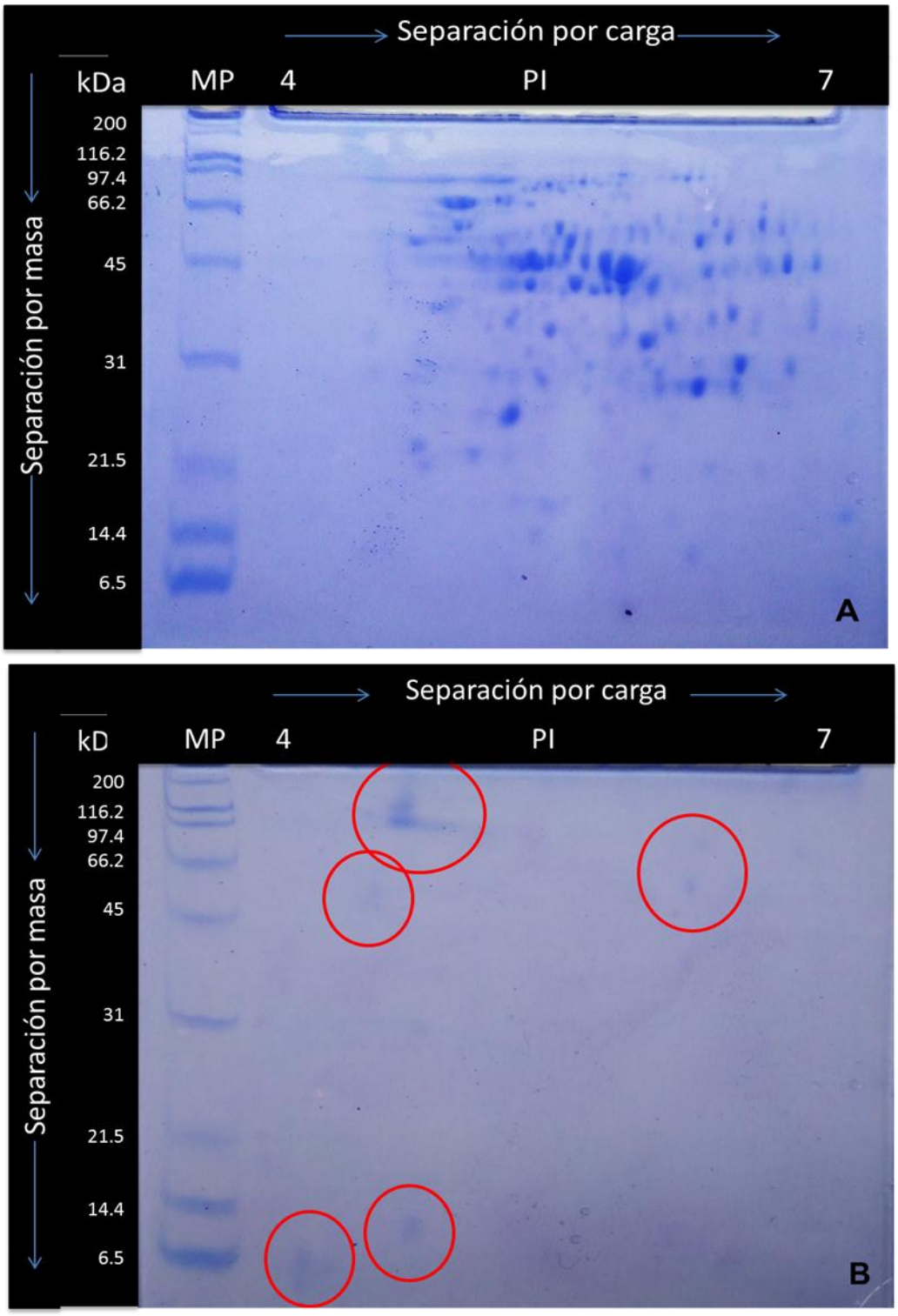
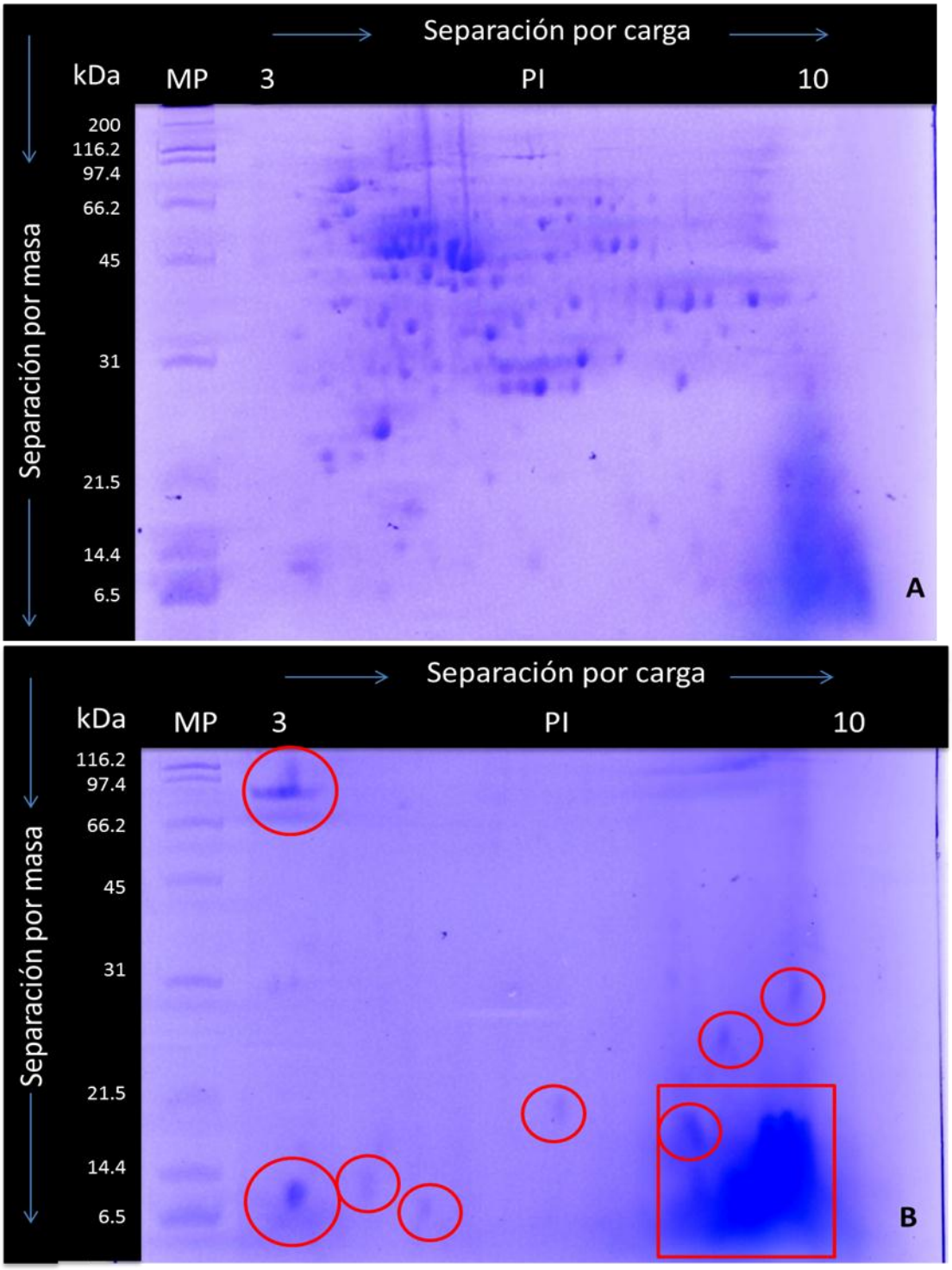


Figura 4-7: Gel bidimensional. A. Extracto de proteínas de *E. coli* (control de la técnica). **B.** Proteínas presentes en el fluido apoplástico de *H. brasiliensis*. IEF (pH 3-10). SDS-PAGE al 16%. Teñido con Azul de Coomassie.



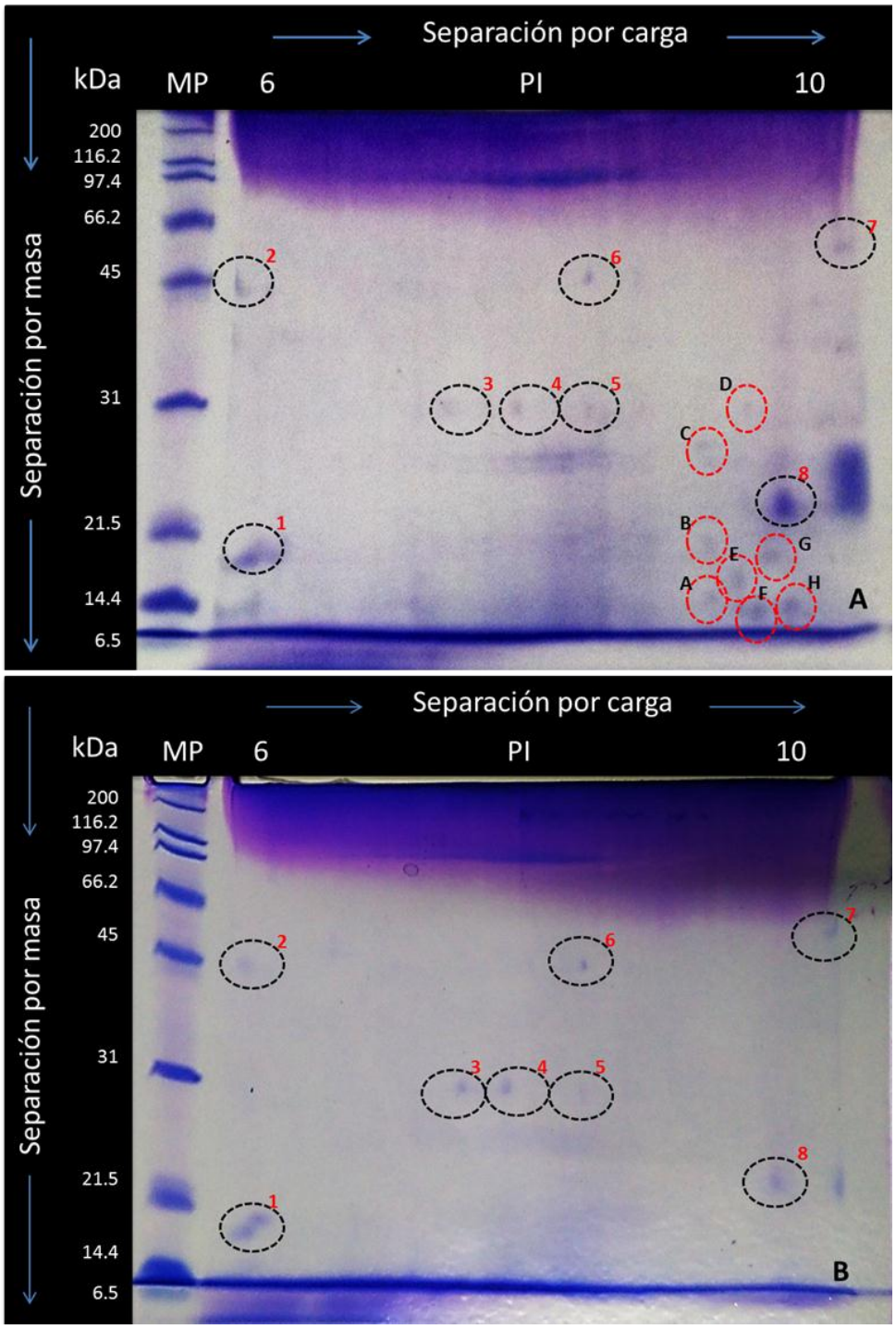
Una vez confirmada la concentración de proteínas presentes en el fluido apoplástico necesarias para la visualización (300 µg), se procedió a realizar un zoom en un rango de pH 6-10 para comparar el perfil proteico del fluido apoplástico obtenido a partir de foliolos en estadío C, de la interacción de *H. brasiliensis* - *M. ulei* (Planta N° 2) 9 días posinoculación comparado con el fluido obtenido de foliolos sin inocular (Planta N° 6) (Figura 4-8).

El análisis comparativo mediante 2D-PAGE de las proteínas presentes en los extractos apoplásticos evaluados, revelo la presencia de ocho spots, que se consideraron de expresión constitutiva en ambos geles (círculos negros). Sin embargo se observa la disminución en cuanto a la intensidad de dichos spots, en el extracto de la interacción planta patógeno (Figura 4-8).

Estos resultados son similares a los reportados por Floerl y colaboradores (2008), quienes compararon la expresión proteica del apoplasto de hojas de *Brassica napus* var. *Napus* infectadas con *Verticillium longisporum,* tres semanas posinfección, y reportaron la disminución de la intensidad de las proteínas constitutivas y la expresión de 12 proteínas en la interacción, en un rango de pH entre 6 y 10, con un peso molecular aproximado entre 21 y 35 kDa, las cuales después del análisis de LC-MS/MS se identificaron como glucanasas, endoquitinasas y peroxidasas (Floerl *et al.,* 2008).

Shenton y colaboradores (2012) compararon mediante análisis 2-DE los extractos apoplásticos obtenidos de hojas de *Oryza sativa* ssp. Japonica cv Kakehashi inoculada con *Magnaporthe oryzaea* a las 12 y 72 horas posinoculación, (tiempos para ilustrar eventos tempranos y tardíos en la interacción). Donde reportaron el incremento en la abundancia de los spots expresados en la interacción incompatible a las 72 horas de inoculación, la mayoría de los cuales fueron identificados como proteínas relacionadas con la defensa, que en la interacción compatible, se observaron claramente disminuidos en su abundancia. Solo dos spots fueron expresados únicamente en la interacción compatible, uno de los cuales fue posteriormente identificado como un factor de virulencia expresado por *Magnaporthe* durante la infección identificado como CYP1 cyclophilina (Shenton *et al.,* 2012).

Figura 4-8: Gel bidimensional de fluido apoplástico de la hoja de *H. brasiliensis.* A. 9 días posinfección con *M. ulei*. **B.** plantas no infectadas. Cada gel se cargó con 300 µg de proteína. IEF (pH 6-10). SDS-PAGE al 16%. Teñido con Azul de Coomassie. Los círculos negros indican spots que aparecen presentes en ambos casos, los círculos rojos indican la presencia de spots que se expresan diferencialmente.



Adicionalmente se observó la presencia de 8 spots en el extracto apoplástico de la interacción planta patógeno (Figura 4-8), que presentaron características alcalinas (círculos rojos) ubicados en un rango de pH entre 9 – 10, con un peso aproximado entre 6 y 30 kDa respectivamente. En la Tabla 4-3 se presentan los tamaños aproximados y rangos de pH de los spots observados en los fluidos evaluados, los spots de bajo peso molecular podrían corresponder a proteínas efectoras expresadas por el hongo *M. ulei* durante la interacción con *H. brasiliensis*, pues la mayoría de los efectores apoplásticos publicados corresponden a tamaños de proteína de 5 - 25 kDa (Shindo *et al.,* 2016). Por ejemplo las proteínas homólogas a Ecp6 en *M. graminícola* Mg3LysM, Mg1LysM, MgxLysM tienen pesos moleculares de 22, 8 y 9 kDa respectivamente (Marshall *et al.,* 2011), mientras la proteína Ecp6 tiene una masa molecular de 21 kDa y se ubica en un pH cercano a 4, a diferencia de la proteína Ecp7 que tiene una masa molecular de 11 kDa y se ubica en un pH cercano a 6 (Bolton *et al.,* 2008), tamaños que corresponden a lo observado en el fluido de la interacción.

Tabla 4-3: Características de los spots observados en los fluidos apoplásticos evaluados.

NOMBRE DEL SPOT	TAMAÑO APROX.	pH APROX.	PRESENTE EN F.A DE PLANTA SANA	PRESENTE EN F.A DE PLANTA INFECTADA	ABUNDANCIA DURANTE LA INTERACCIÓN
1	15 kDa	6,2	X	X	↓
2	45 kDa	6	X	X	↓
3	29 kDa	7,5	X	X	↑
4	29 kDa	7,8	X	X	=
5	28 kDa	8,3	X	X	↓
6	45 kDa	8,3	X	X	↓
7	50 kDa	10	X	X	↓
8	23 kDa	9,6	X	X	↓
A	14 kDa	9,2		X	
B	20 kDa	9,2		X	
C	26 kDa	9,2		X	
D	30 kDa	9,4		X	
E	16 kDa	9,3		X	
F	9 kDa	9,5		X	
G	18 kDa	9,5		X	
H	10 kDa	9,7		x	

Sin embargo no podemos demostrar que las proteínas observadas en el fluido apoplástico de la interacción *H. brasiliensis-M. ulei* correspondan a proteínas de defensa de respuesta primaria como peroxidasas, proteasas, quitinasas, lectinasas, o que correspondan a proteínas efectoras extracelulares, hasta que se realicen análisis de secuenciación para la identificación y comparación en bases de datos, es importante destacar que todas las proteínas efectoras apoplásicas son pequeñas y a menudo no presentan homología con secuencias anotadas, lo cual indica la necesidad de realizar estudios que evalúen la expresión diferencial de dichos spots a partir de sus secuencias en diferentes tiempos de infección.

Discusión

Desde la aparición del SALB, causada por el hongo ascomiceto *M. ulei,* numerosas han sido las pérdidas en el cultivo de caucho natural (Gasparotto *et al.,* 1988), a nivel mundial, sin embargo pocas han sido las investigaciones realizadas en el área de la interacción de este patosistema, a la fecha se desconoce el mecanismo molecular empleado por el patógeno para infectar la planta, así como las interacciones específicas que ocurren durante el proceso infeccioso. La dificultad para obtener una imagen completa de las proteínas involucradas en este patosistema, resulta de la complejidad de la interacción y el total desconocimiento de la interacción a nivel molecular. Para comprender este tipo de interacción, es útil examinar el proteoma, utilizando un fraccionamiento sub celular como lo es el estudio del proteoma del apoplasto, a partir del cual la información recopilada puede ser analizada junto con la expresión génica con el fin de comprender los procesos biológicos y de interacción que tiene lugar el espacio apoplástico (Shenton *et al.,* 2012).

La obtención de fluido apoplástico mediante el método de infiltración – centrifugación ha sido ampliamente utilizado en el patosistema de *S. lycopersicum* y *C. fulvum,* que es considerado como un modelo de estudio ideal desde que (De Wit y Spikman, 1982) descubrieron proteínas elicitoras inductoras de necrosis en hojas de tomate infectadas con *C. fulvum,* este método fue usado para obtener fluido apoplástico de foliolos de *H. brasiliensis* sanas y foliolos infectados con *M. ulei* 9 días posinoculación y observar los cambios en el perfil proteico durante la infección en comparación con el control no infectado. Como el procedimiento de infiltración centrifugación podía dañar las células y contaminar el extracto apoplástico con componentes intracelulares, se usó en este estudio la presencia de látex como como indicador de contaminación citoplasmática. Shenton y colaboradores (2012) proponen que las muestras sujeto de infiltración, al ser tratadas bajo las mismas condiciones, arrojan las mismas cantidades de contaminantes citoplasmáticos. Habiendo realizado el análisis del 1D SDS y considerándolo satisfactorio se decidió que el extracto podía ser evaluado en 2-DE.

Para entender parte de los mecanismos que subyacen a la interacción molecular planta patógeno, se utilizó una electroforesis bidimensional para identificar visualmente los componentes del fluido apoplástico involucrados durante este proceso, basados en el análisis 2-DE se observaron ocho spots que incrementaron su intensidad durante la interacción en comparación con el control, y 8 spots que únicamente se expresaron durante la infección, los cuales pueden ser asociados a la expresión del arsenal de virulencia del patógeno en el día 9 posinoculación. Sin embargo es necesario realizar el análisis de identificación de dichos spots, para caracterizar su naturaleza y rol durante la interacción y poder determinar su relación en la patogénesis. Se recomienda para futuras evaluaciones seleccionar los spots de expresión diferencial, realizar digestión en gel y analizarlos por espectro fotometría de masas, para obtener la huella peptídica, e identificarlos por homología en bases de datos a través de herramientas como Mascot (http://www.matrixscience.com). Posteriormente realizar la predicción de la localización subcelular empleando el programa TargetP (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP) (Zhang *et al.,* 2009).

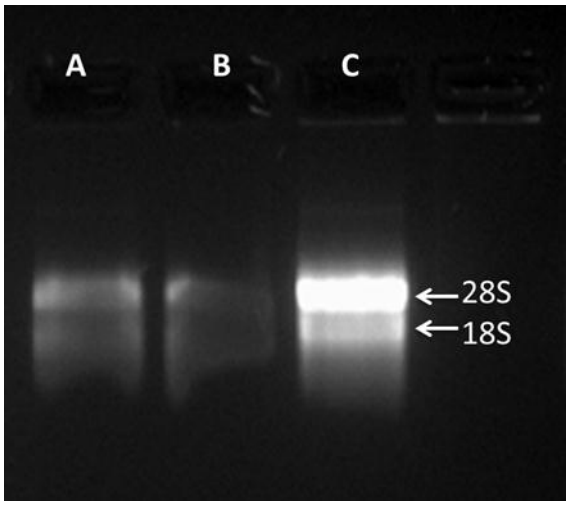
5. Capitulo 5

5.1 Objetivo 3. Identificar mediante función putativa genes codificantes de proteínas efectoras descritas en fitopatógenos de la clase de los Dothideomycetes, en la interacción *H. brasiliensis* - *M. ulei*

5.1.1 Extracción de RNA

El RNA se obtuvo a partir de 3 muestras denominadas: A) RNA planta infectada 1 (Inf1) B) RNA planta infectada 2 (Inf2) y C) RNA planta sana (Sana). Después del proceso de purificación por columna, el RNA fue visualizado en un gel de agarosa al 1%, la electroforesis se realizó a 100 voltios durante 15 minutos (Figura 5-1).

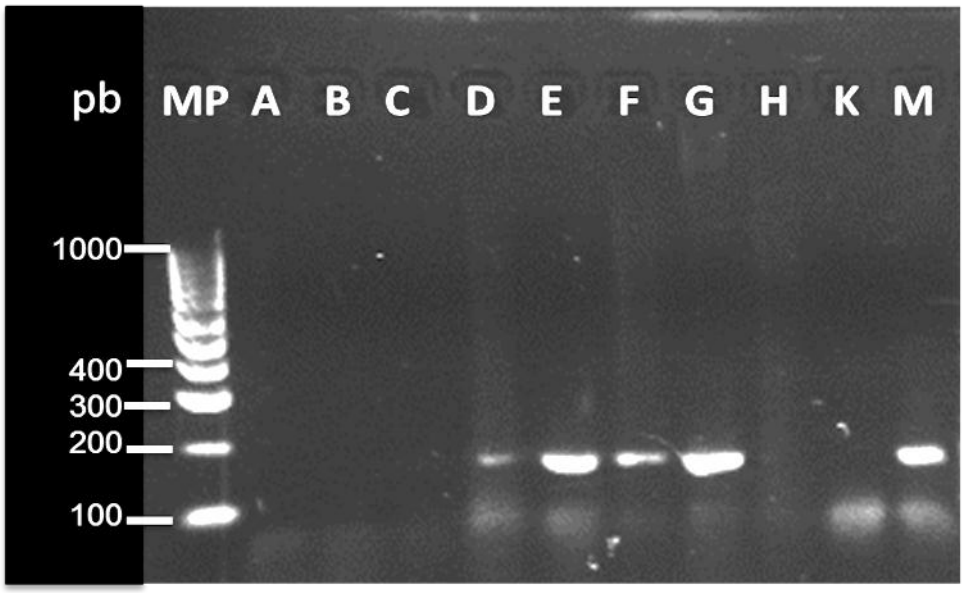
Figura 5-1: Visualización de RNA. 2 µl fueron cargados en cada carril, gel al 1 % de agarosa. Se indican las bandas del RNA ribosomal 18s y 28s con las flechas. **A.** RNA planta infectada 1. **B.** RNA planta infectada 2. **C.** RNA planta sana.



5.1.2 Verificación del cDNA

La verificación del cDNA se realizó mediante la amplificación por PCR del factor de elongación de *H. brasiliensis*. Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% (Figura 5-2).

Figura 5-2: Amplificación del factor de elongación en cDNA y DNA de *H. brasiliensis*. A. Control DNasa planta Sana. **B.** Control DNasa planta Inf 1. **C.** Control DNasa planta Inf 2. **D.** cDNA planta Sana. **E.** cDNA planta Inf 1. **F.** cDNA planta Inf 2. **G.** DNA planta de *H. brasiliensis*. **H.** DNA de hongo *M. ulei*. **K.** Agua control de reactivos. **M.** DNA planta de *H. brasiliensis.*

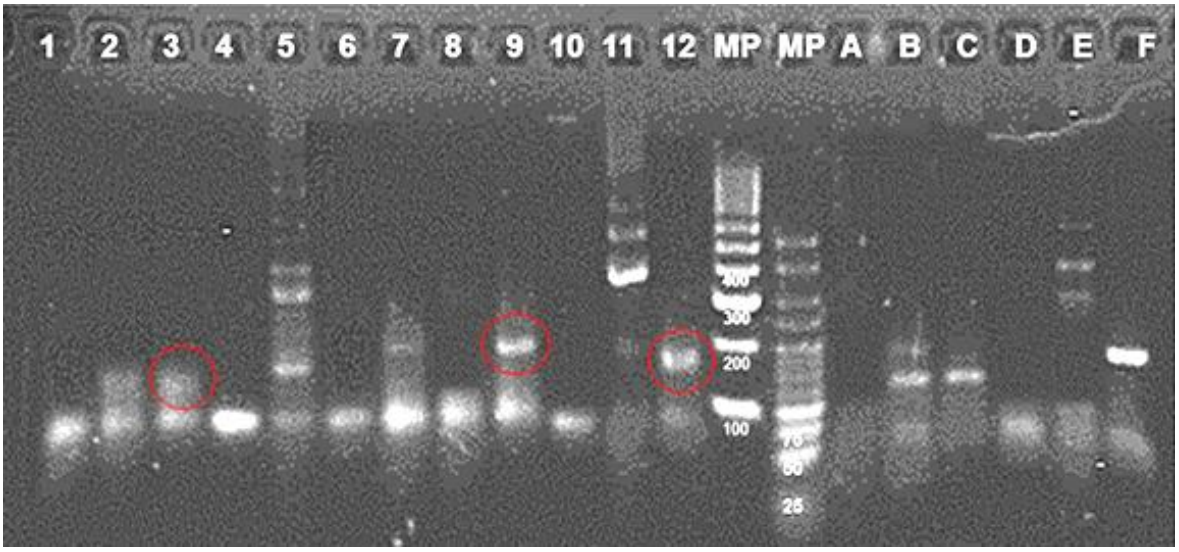


En la figura anterior se observa una banda de aproximadamente 190 pb (carriles D, E Y F) producto del cDNA, que corresponde en tamaño con la banda obtenida en los carriles G y M que pertenecen al DNA de *H. brasiliensis*, indicando la eficiencia del proceso de retrotranscripción y la existencia de cDNA. En los carriles A, B y C no se observa ningún producto, lo cual demuestra la actividad de la enzima DNasa en el tratamiento del RNA y excluye cualquier contaminación con DNA. En los carriles H y K no se observó ningún producto como era de esperar para los controles negativos.

5.1.3 PCR de los genes codificantes de proteínas efectoras seleccionados

La evaluación de la presencia en el cDNA de los genes codificantes de proteínas efectoras con homología en hongos de la clase de los Dothideomycetes y el fragmento derivado de la transcripción TDFMu1, se realizó mediante la amplificación por PCR de los genes *Ecp6* y *Ecp7*, los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% (Figura 5-3).

Figura 5-3: Amplificación de los genes *ECP6* (Carril 1 – 6), *ECP7* (Carril 7 – 12), y TDFMu1 (Carril A – F). En cDNA de *H. brasiliensis* en interacción con *M. ulei* y DNA de *H. brasiliensis* y *M. ulei* como control. **1.** cDNA planta Sana. **2.** cDNA planta Inf 1. **3.** cDNA planta Inf 2. **4.** Agua control de reactivos. **5.** DNA planta de *H. brasiliensis*. **6.** DNA de hongo *M. ulei*. **7.** cDNA planta Sana. **8.** cDNA planta Inf 1. **9.** cDNA planta Inf 2. **10.** Agua control de reactivos. **11.** DNA planta de *H. brasiliensis*. **12.** DNA de hongo *M. ulei*. **MP:** HyperLadder™ IV Bioline. **MP:** HyperLadder™ V Bioline. **A.** cDNA planta Sana. **B.** cDNA planta Inf 1. **C.** cDNA planta Inf 2. **D.** Agua control de reactivos. **E.** DNA planta de *H. brasiliensis*. **F.** DNA de hongo *M. ulei*.



En la figura 5-3 se observa en los carriles 2 y 3 una única banda de aproximadamente 120 pb, que corresponde al producto de la amplificación del primer Ecp6 en el cDNA obtenido de la interacción de *H. brasiliensis* con *M. ulei* a los 9 días posinfección, dicha banda se encuentra ausente en el carril N° 1 del cDNA de una planta sana de *H. brasiliensis*. El carril N° 5 corresponde al producto de la amplificación del primer Ecp6 en el DNA de *H. brasiliensis*, donde se observa una inespecificidad debida a la degeneración del primer, cabe resaltar que la banda presente en los carriles 2 y 3 no se

observa en el carril 5. El carril N° 6 corresponde al DNA del hongo *M. ulei*, y no hay presencia de ningún amplímero, esto puede ser debido a que la expresión del amplímero que se observa en los carriles 2 y 3 solo se induce cuando el hongo infecta la planta.

Caso contrario a lo observado en el cDNA de la planta sana y el cDNA de la planta infectada en los carriles 7 y 9, donde se obtuvo una banda (transcrito) de aproximadamente 190 pb que también se observa en el carril 11 que corresponden al DNA de *H. brasiliensis*, en este carril se obtiene el mismo caso de inespecificidad del primer Ecp7. Es importante resaltar que en el carril N° 12 (DNA de *M. ulei*) se obtiene un amplímero de aproximadamente 180 pb, el cual puede corresponder a un gen ortólogo de *Ecp7* en el DNA de *M. ulei*, que se expresa de forma constitutiva y que hasta el momento no ha sido descrito.

En los productos de amplificación por PCR del fragmento TDFMu1 se observa la expresión de una banda (transcrito) de aproximadamente 190 pb en el carril B que corresponden al cDNA de la interacción planta patógeno y coincide en tamaño con el amplímero obtenido en el carril F (DNA de *M. ulei*), este resultado indica que el fragmento TDFMu1 está presente en el DNA del hongo y se expresa durante la interacción con la planta. Adicionalmente en los carriles B y C que corresponden al cDNA de la interacción, se observa una banda de aproximadamente 150 pb que está ausente en el carril F. Este resaltado podría ser relacionado con una variación alélica en el gen que codifique para el TDFMu1, que sea dependiente de la cepa de *M. ulei* y produzca la presencia de un transcrito de menor tamaño, que se expresa solo durante la interacción con la planta. Estos resultados coinciden con García-Romero (2012) quien reporto la presencia del TDFMu1 en el DNA del hongo y la variación del mismo durante la interacción planta patógeno.

Se seleccionaron los productos obtenidos en los carriles 3, 9 y 12 círculos rojos (Figura 5-3), para ser secuenciados en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional en sentido forward y reverse, las secuencias obtenidas se presentan en el **ANEXO 5.**

Después de realizar el análisis computacional con el algoritmo Blastn para la asignación de función, se obtuvo que la secuencia expresada en el cDNA de la interacción

amplificada con el primer Ecp6 (carril 3) llamada CD12EP, presentó homología con una secuencia del cloroplasto de varias especies de la familia Euphorbiácea, entre ellas *H. brasiliensis y Manihot esculenta,* todas con un porcentaje del 96% (Figura 5-4).

Figura 5-4: Alineamientos significativos de la secuencia de nucleótidos de CD12EP. Base de datos de NCBI.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
☐	Euphorbia esula cultivar 1984-ND001 chloroplast, complete genome	124	249	100%	2e-25	96%	KY000001.1
☐	Averrhoa carambola voucher PDBK 2014-0241 chloroplast, complete genome	124	249	100%	2e-25	96%	KX364202.1
☐	Euphronia guianensis 23S ribosomal RNA gene, complete sequence; plastid	124	124	100%	2e-25	96%	KT780265.1
☐	Averrhoa carambola chloroplast, complete genome	124	249	100%	2e-25	96%	KU569488.1
☐	Erythroxylum novogranatense chloroplast, complete genome	124	249	100%	2e-25	96%	KX256287.1
☐	Ricinus communis cultivar Hale chloroplast, complete genome	124	249	100%	2e-25	96%	JF937588.1
☐	Oxalis latifolia ribosomal protein L2 (rpl2) and ribosomal protein L23 (rpl23) genes, complete cds; tRNA-Ile	124	124	100%	2e-25	96%	HQ664602.1
☐	Ruptiliocarpon caracolito ribosomal protein L2 (rpl2) gene, exon 1 and partial cds; ribosomal protein L23 (	124	124	100%	2e-25	96%	HQ664571.1
☐	Ochna mossambicensis ribosomal protein L2 (rpl2) and ribosomal protein L23 (rpl23) genes, complete cds	124	124	100%	2e-25	96%	HQ664566.1
☑	Hevea brasiliensis chloroplast, complete genome	124	249	100%	2e-25	96%	HQ285842.1
☐	Oxalis latifolia voucher FLAS:M.J. Moore 316 23S ribosomal RNA (rrn23) gene, complete sequence; chlorc	124	124	100%	2e-25	96%	GQ998574.1
☐	Jatropha curcas chloroplast, complete genome	124	249	100%	2e-25	96%	FJ695500.1
☑	Manihot esculenta cultivar TME3 chloroplast, complete genome	124	249	100%	2e-25	96%	EU117376.1
☐	Bruguiera gymnorrhiza 23S ribosomal RNA gene, complete sequence; chloroplast gene for chloroplast prc	124	124	100%	2e-25	96%	AF355767.1
☐	Rhizophora mangle 23S ribosomal RNA gene, complete sequence; chloroplast gene for chloroplast produ	124	124	100%	2e-25	96%	AF355764.1
☐	Rhizophora apiculata 23S ribosomal RNA gene, complete sequence; chloroplast gene for chloroplast prod	124	124	100%	2e-25	96%	AF355763.1
☐	Ceriops tagal 23S ribosomal RNA gene, complete sequence; chloroplast gene for chloroplast product	124	124	100%	2e-25	96%	AF355762.1
☐	Rhizophora stylosa 23S ribosomal RNA gene, complete sequence; chloroplast gene for chloroplast produc	124	124	100%	2e-25	96%	AF355761.1
☐	Rhizophora mucronata 23S ribosomal RNA gene, complete sequence; chloroplast gene for chloroplast prc	124	124	100%	2e-25	96%	AF355760.1
☐	Linum usitatissimum clone LU0005H10 mRNA sequence	122	122	98%	6e-25	96%	EU829615.1

Adicionalmente el análisis con el algoritmo Blastx de la secuencia CD12EP, presentó homología con proteínas hipotéticas de varias especies de plantas (Figura 5-5).

Figura 5-5: Alineamientos significativos de la secuencia peptídica de CD12EP. Base de datos de NCBI.

ORF124 [Pinus koraiensis]	42.4	42.4	77%	8e-04	95%	YP_001152214.1
unknown [Lotus japonicus]	40.4	40.4	77%	0.001	89%	AFK34633.1
hypothetical protein VIGAN_01442200 [Vigna angularis var. angularis]	40.4	40.4	77%	0.002	89%	BAT76424.1
hypothetical protein DCAR_001522 [Daucus carota subsp. sativus]	40.4	40.4	77%	0.002	89%	KZN08866.1
Metallocarboxypeptidase inhibitor [Dorcoceras hygrometricum]	37.7	37.7	77%	0.077	89%	KZV51009.1
Uncharacterized protein ORF91 [Cajanus cajan]	37.4	37.4	77%	0.10	79%	KYP43983.1
PREDICTED: transcription factor bHLH101-like [Nicotiana tabacum]	36.6	71.6	77%	0.16	84%	XP_016511122.1
hypothetical protein AMTR_s00001p00272530 [Amborella trichopoda]	35.0	35.0	72%	0.19	83%	ERM96660.1
hypothetical protein BrnapMp036 [Brassica napus]	35.4	35.4	56%	0.24	100%	YP_717133.1
hypothetical protein DCGMS_00420 [Raphanus sativus]	34.7	34.7	56%	0.26	100%	AGC81702.1
hypothetical protein AMTR_s00103p00141530 [Amborella trichopoda]	34.3	34.3	68%	0.53	82%	ERN00895.1
hypothetical protein JCGZ_08885 [Jatropha curcas]	33.5	33.5	56%	0.63	100%	KDP36632.1
hypothetical protein VITISV_039385 [Vitis vinifera]	33.9	33.9	56%	0.65	100%	CAN72686.1
hypothetical protein L484_000616 [Morus notabilis]	33.1	33.1	56%	0.68	100%	XP_010105290.1
hypothetical protein MTR_3g035620 [Medicago truncatula]	33.5	33.5	64%	1.1	94%	XP_003599574.1
hypothetical protein KK1_040454 [Cajanus cajan]	33.1	33.1	56%	1.1	93%	KYP38292.1
hypothetical protein MTR_0002s0250 [Medicago truncatula]	34.3	34.3	64%	1.2	94%	XP_013443670.1
hypothetical protein KK1_050058 [Cajanus cajan]	32.3	32.3	56%	2.5	93%	KYP77522.1
hypothetical protein DCAR_031888 [Daucus carota subsp. sativus]	33.1	33.1	56%	2.6	86%	KZM80661.1
hypothetical protein B456_008G055700 [Gossypium raimondii]	31.6	31.6	56%	2.9	93%	KJB46745.1
hypothetical protein PHAVU_003G142600g [Phaseolus vulgaris]	32.3	32.3	60%	3.6	93%	XP_007154729.1
hypothetical protein B456_005G170600 [Gossypium raimondii]	30.8	30.8	56%	6.3	86%	KJB30981.1
hypothetical protein BVRB_2g039970 isoform B [Beta vulgaris subsp. vulgaris]	32.0	32.0	52%	8.0	92%	KMT17301.1

Mientras que en el análisis de la secuencia expresada en el DNA de *M. ulei* y el cDNA de la interacción amplificada con el primer Ecp7 (carril 12 y 9) llamadas DME7 y CDE7 respectivamente, con el algoritmo Blastn y Blastx no se encontró semejanza significativa con ninguna secuencia publicada.

Discusión

Se planteó a partir del amplímero obtenido con el primer Ecp7 de aproximadamente 180 pb observado en el carril N° 12 que podría corresponder a un gen ortólogo de *Ecp7* presente en el DNA del hongo *M. ulei*, y que hasta el momento no ha sido descrito, los resultados de la secuenciación no reportaron semejanza con ninguna secuencia publicada, lo que podría indicar que sí pudiese tratarse de un nuevo gen, sin embargo deben realizarse estudios para obtener la secuencia completa, y predecir la secuencia peptídica que codificaría para evaluar su expresión. Cabe resaltar como se mencionó anteriormente que los genes que codifican para proteínas efectoras a menudo no presentan homología con secuencias anotadas (Stergiopoulos *et al.,* 2010) respaldando nuestro hallazgo.

La presencia de una única banda en el carril 3 se asumió como la expresión del transcrito del gen *Ecp6* durante la interacción, sin embargo los resultados de la secuenciación del producto del carril 3, demostraron que se trata de la amplificación de una inespecificidad, que puede ser debida a la ausencia de la región o motivos altamente conservados para los que fue diseñado el primer degenerado. Estos resultados estaban contemplados en los hallazgos a los que nos podríamos enfrentar, pues en la investigación de Bolton y colaboradores (2008) 36 fueron las especies que se evaluaron para encontrar ortólogos de Ecp6, y tan solo 16 fueron las especies donde encontraron la presencia de proteínas tipo, con alta similaridad a Ecp6 de *C. fulvum.* Podemos asumir que *M. ulei* se encuentra entre las 20 especies que no poseen una secuencia ortóloga de Ecp6.

6. Conclusiones generales

El apoplasto de la planta de *Hevea brasiliensis* es el compartimiento donde puede tener lugar la expresión de determinantes de virulencia y la activación de respuesta de defensa a partir del reconocimiento de *Microcyclus ulei* o moléculas elicitoras de éste.

Este es el primer estudio del proteoma del fluido apoplástico de la interacción de *H. brasiliensis* posinfección *in vitro* con *M. ulei,* que proporciona un panorama general de las proteínas involucradas presente en el apoplasto durante la interacción con el patógeno.

Este trabajo ha contribuido en 3 aspectos principales para la implementación del método de extracción de fluido apoplástico en el patosistema de *H. brasiliensis – M. ulei* como base para la identificación de proteínas ya sea de resistencia o causantes de enfermedad: (I) Estandarización del método de extracción de fluido apoplástico en foliolos en estadío C del clon RIMM 600 de *H. brasiliensis*, mediante el método de infiltración centrifugación. (II) Obtención de fluido apoplástico adecuado para análisis de 2D-PAGE. Con bajos niveles de contaminación citoplasmática. (III) Identificación de un perfil proteico comparativo en 2D-PAGE de los fluidos apoplásticos obtenidos 9 días posinfección, a partir de plantas sanas del clon RIMM 600 y plantas inoculadas con *M. ulei*.

Se definieron las condiciones para la extracción del fluido apoplástico a partir de foliolos del clon RRIM 600, las cuales correspondieron a: El paso de infiltración se desarrolló en foliolos en estadío C sumergidos en buffer de infiltración NaH_2PO_4-Na_2HPO_4 0,1 M pH 6,5/NaCl 50 mM y sometidos a 3 ciclos de vacío a -77.8 kPa por 3 min. Para la obtención de fluido apoplástico se realizó un paso de centrifugación a 8000 *g* x 20 min. Para los análisis proteómicos en 2D -PAGE, se emplearon 300 µg de proteína y tiras de IPG con pH 6-10.

El análisis proteico presentado en este estudio, permite observar un mapa proteómico bien definido de las proteínas apoplásticas de expresión constitutiva en foliolos de *H. brasiliensis* tanto infectadas como no infectadas, donde además se observa la presencia de 8 spots de bajo peso molecular, con rangos entre los 9,2 y 9,7 kDa, expresados 9 días posinoculación con *M. ulei*. Que se constituyen en candidatas a posibles efectores o proteínas de respuesta de la planta.

La implementación de este método en futuras investigaciones permitirá caracterizar e identificar proteínas involucradas en la interacción molecular de *H. brasiliensis* y *M. ulei,* proteínas de resistencia y proteínas efectoras y explicar cómo estas Interactúan entre si o con los componentes de la pared celular. Adicionalmente podrá evaluarse el mecanismo de secreción de las proteínas efectoras, su localización y translocación, e identificar procesos de respuesta al estrés, metabolismo y remodelación de la pared celular entre otros.

La identificación de genes codificantes de proteínas efectoras como Ecp6, proteína descrita en 16 especies de fitopatógenos de la clase de los Dothideomycetes, a partir de primers degenerados, no arrojó resultados en el cDNA de la interacción de *H. brasiliensis* - *M. ulei*, lo cual puede ser debido a la ausencia de la región o motivos altamente conservados para los que fue diseñado el primer degenerado, indicando la ausencia del gen evaluado. Sin embargo en el DNA del hongo *M. ulei* y el cDNA de la interacción planta patógeno, el amplímero secuenciado no presentó homología al compararlo contra la base de datos de GenBank, lo cual indica que el fragmento podría corresponder a un gen ortólogo del gen *Ecp7* que hasta el momento no ha sido descrito.

Se recomienda emplear la metodología de extracción de fluido apoplástico, para identificar moléculas candidatas a proteínas efectoras, ya que esta metodología permite ir desde la secuenciación del spot expresado de forma diferencial en cada patosistema, hasta la elucidación de la secuencia del gen, mientras que cuando no se cuenta con el genoma anotado del hongo es imposible realizar análisis comparativos contra genomas de otros hongos y evaluar la presencia de genes o dominios característicos que pudiesen favorecer la búsqueda.

A. Anexo: Medios de cultivo para trabajo in vitro de *M. ulei*

Preparación para un litro

Medio de cultivo para el mantenimiento de *M. ulei* (M4)

- -Pelar y picar 250 g de papa, cocinar por 10 min en 700 ml de agua destilada, colarla y dejar enfriar
- -Servir 200 ml de agua destilada en un Baker y agregar los siguientes productos en las cantidades mencionadas: 10 g de sacarosa, 2 g de fosfato de potasio monobásico y los 700 ml de cocido de papa
- -Adicionar en condiciones estériles 1 ml de una solución de aminoácidos (triptófano 250 ppm, clorhidrato de lisina 1000 ppm, de treonina 250 ppm) y 1 ml de una solución de cloranfenicol 5000 ppm. Ajustar el pH a 5.00 y adicionar 20 g de agar-bacteriológico N° 1
- -Calentar hasta disolver completamente la mezcla y completar a volumen
- -Verterlo en erlenmeyer de 250 ml (25 ml) o tubos de 125 ml (20 ml)
- -Esterilizar a 121º C. (1 atm.) por 15 min, dejar enfriar y almacenar a 4°C para su posterior uso

Medio de cultivo para esporulación de *M. ulei*

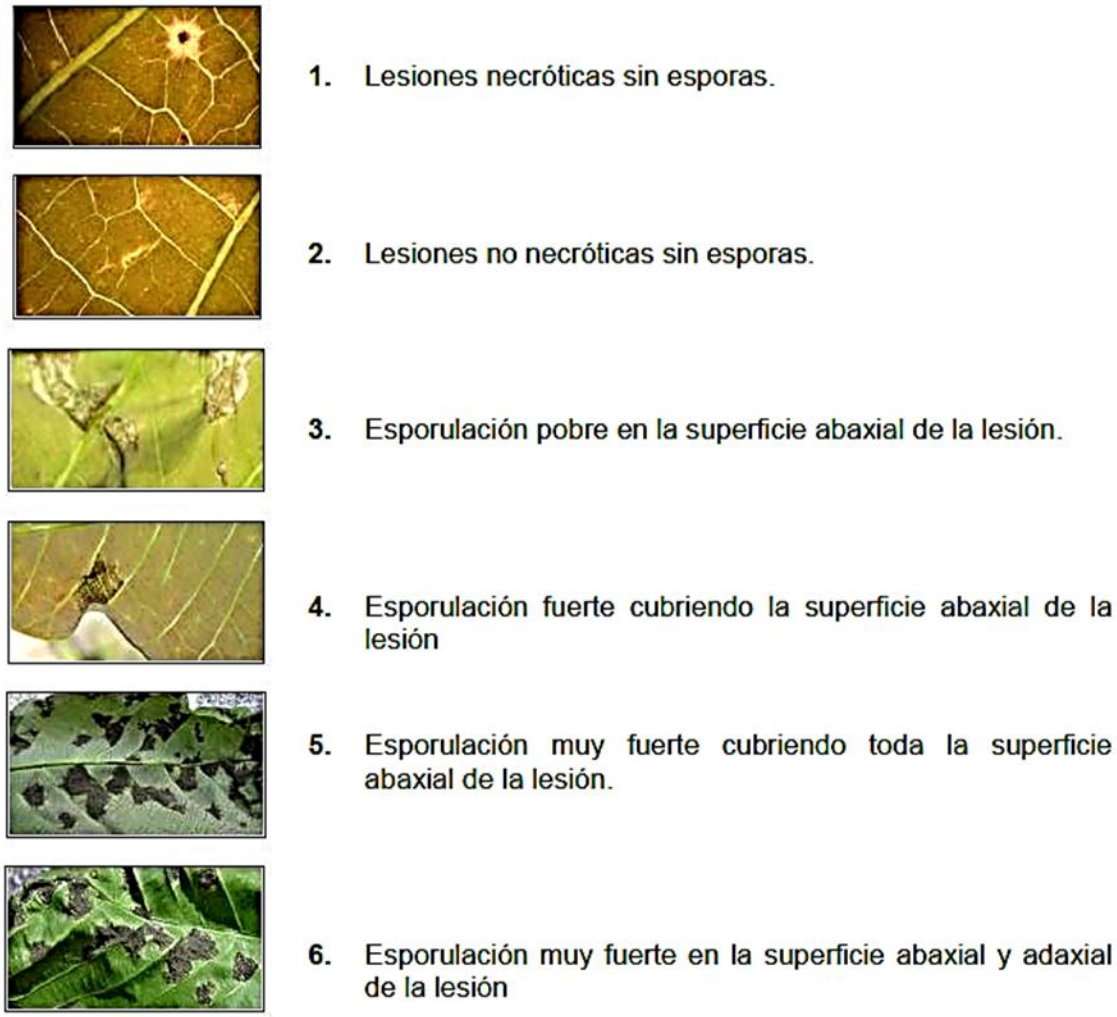
- -Pelar y picar 250 g de papa, cocinar por 10 min en 700 ml de agua destilada, colarla y dejar enfriar
- -Servir 200 ml de agua destilada en un Baker y agregar los siguientes productos en las cantidades mencionadas: 10 g de sacarosa, 6 g de neopeptona y los 700 ml de cocido de papa

- -Adicionar en condiciones estériles 1 ml de una solución de aminoácidos (triptófano 250 ppm, clorhidrato de lisina 1000 ppm, de treonina 250 ppm) y 1 ml de una solución de cloranfenicol 5000 ppm. Ajustar el pH a 5.00 y adicionar 20 g de agar-bacteriológico N° 1
- -Calentar hasta disolver completamente la mezcla y completar a volumen
- -Verterlo en erlenmeyer de 250 ml (25 ml)
- -Esterilizar a 121º C. (1 atm.) por 15 min, dejar enfriar y almacenar a 4°C para su posterior uso

B. Anexo: Escala de Intensidad de esporulación (IE)

La medición de los signos y los síntomas asociados a la enfermedad producidos en las plantas inoculadas durante las pruebas de patogenicidad, se realizó en base a la escala de Intensidad de esporulación (IE) propuesta por (Mattos *et al.,* 2003) y en base a ella se puede decir que: las lesiones 1 y 2 son características de material con resistencia, mientras que las lesiones 3, 4, 5 y 6 son características de material susceptible (Figura 6 -1).

Figura 6-1: Escala de evaluación de intensidad de esporulación (IE). Modificada por Mattos *et al.,* (2003).



C. Anexo: Producto de secuenciación de ITS

>ITSMu 479

GGATAGAAGAGGAGCGCCGACTCACCCCTCATGTGACCCCACCCGTTGCTTCGGGG
GCGACCCCGCCGGCACGCGTGCCGGCGCCGGGCGCCCCCGGAGGTCTCCTCAAC
ACGGCATCTTCTGCGTCGGAGCGTCACAGCAAATGACACAAAACTTTCAACAACGGA
TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCG
AAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCCCTCAAGCCCCGGCTTGGTGTTGGG
CGTCGCGGCCCCGCGCGCCTCAAAGTCTCCAGCCAGGCCGTCCGTCTCCTAGCGT
CGTGCAGTCACATCATCCGCTTTGGAGCGCGGGCGGCCGCGGCCGTCAAACCGTC
CACTCAGGTGACCTCGATCGGCAGATCAATC

D. Anexo: Protocolo de Extracción de RNA total con CTAB

(López *et al.,* 2006) Composición de buffers:

Buffer de maceración CTAB (Esterilizar por autoclavado)

2% CTAB

100mMTris-HCl, pH 8.0

20mM EDTA, pH 8.0

1.4M NaCl

1% Na2SO3

2% PVP-40

Buffer TE-SDS (Esterilizar por autoclavado)

10mM Tris-HCl, pH 8.0

1mM EDTA, pH 8.0

1% (p/v) SDS

Extracción:

Pulverizar 2 gr de material vegetal con Nitrógeno líquido.

Homogenizar el material vegetal con 3 ml de buffer de maceración CTAB, dar vórtex por 10 seg, e incubar durante 15min a 65°C.

Adicionar 3ml de cloroformo:isoamilalcohol (24:1 v/v), vórtex 10 seg y centrifugar durante 15min a 4500rpm a 4°C.

Transferir la fase acuosa (Aproximadamente 2 ml para evitar tomar elementos de la fase orgánica) a un tubo falcón nuevo.

Agregar 2 ml de cloroformo:isoamilalcohol, vórtex 10 seg y centrifugar durante 15min a 4500rpm a 4°C.

Precipitación:

transferiri la fase acuosa (Aproximadamente 1 ml) a un tubo eppendorf nuevo de 2 ml.

Adicionar 1 ml de LiCl 4M e incubar overnight a 4°C.

Centrifugar durante 30min a 12000rpm a 4°C y eliminar el sobrenadante.

Resuspender el pellet en 500 µl de buffer TE-SDS.

Adicionar 200 µl NaCl 5M y 700 µl de isopropanol, mezclar invirtiendo el tubo varias veces e incubar durante 30min a -20°C.

Centrifugar durante 10min a 12000rpm a 4°C y eliminar el sobrenadante.

Lavar el pellet con 500 µl de etanol al 70%, agitar vigorosamente, centrifugar durante 5 min a 12000rpm a 4°C y eliminar el sobrenadante.

Adicionar 500 µl de etanol 70%, agitar vigorosamente, centrifugar durante 5min a 12000rpm a 4°C y eliminar el sobrenadante.

Dejar secar el pellet a temperatura ambiente durante 50 min y resuspender con 30 µl de agua tratada con DEPC.

El RNA se purificó mediante columnas mini RNAeasy de QIAGEN y se cuantificó por fluorometría con el equipo Qubit® (Invitrogen) utilizando el kit Quant-it™ RNA BR Assay Kit, finalmente se almacenó a -80 °C para su posterior análisis.

Todo el material utilizado durante la extracción del RNA fue tratado previamente con una solución de DEPC y posteriormente esterilizado.

E. Anexo: Productos de secuenciación

> CD12EP 146

CGGKKKKKGSCMWWMSSCMMSMMKKYRMCSSCYRGGTCKCCTTTCAACTGCTGCT
GATCCATGGGCAGGCAAGAGACAACCTGGCGAACTGAAACATCTTAGTAACCARAG
GAAAAAAAAAAAAAAAAAAMCCSSGGGSSSCMMCM

>DME7 144

GRRRRRASKWTMRGTCYSCGKYKGWGCSKAASKAATSYGWTGTKTTTGAYGGAAGA
CGGAAGAGGTGACGTCRACGTTGAAGGAGTTTTCGAGAAAAGAGGCGGCGAATCW
AAMAAAAAAAAAAAAAMCYCCSGGGKCCMAAAG

>CDE7 135

AAAACGTACATCAGACTCTGCGTCGCATCTGACMCGCGRMGTAMCYCTTCCGKCTT
CCTYAAAAAAAAGGCCTCTTCTTCTCTTTCTCAACTTCTTACGTTATCTGCATCCGAAA
WCCTGCGKSGKGAWCTGGGG

F. Anexo: Productos académicos

- **Participación en congresos Internaciones.**

4° Congreso Argentino de fitopatología

Mendoza – Argentina

Fecha: 19,20 y 21 de abril de 2017

Modalidad poster.

- **Participación en congresos Nacionales**.

VI Congreso Internacional Cauchero

Bucaramanga – Colombia

Fecha: 13, 14 y 15 de octubre de 2016

Modalidad poster.

Bogotá Microbial Meeting (Edición II)

Bogotá – Colombia

Fecha: 12 de agosto de 2016

Modalidad poster.

4°CAF 2017

AAF ASOCIACIÓN ARGENTINA DE FITOPATÓLOGOS

"Trabajar en equipo organiza el trabajo y multiplica los resultados"

4° CONGRESO ARGENTINO DE FITOPATOLOGÍA

MENDOZA - ARGENTINA

19, 20 y 21de abril de 2017

CERTIFICAMOS QUE:

Maria Elizabeth MÉNDEZ TIBAMBRE

ha participado en calidad de

Expositor

Dra.Ing. Agr. Gabriela S.Lucero
Presidente Comisión Organizadora
4° Congreso Argentino de Fitopatologia

Dra.Ing. Agr. Mercedes Scandiani
Presidente de la
Asociación Argentina de Fitopatólogos

VI CONGRESO INTERNACIONAL CAUCHERO

La Confederación Cauchera Colombiana - CCC y
la Corporación Centro Nacional de Investigación para el Caucho Natural - CENICAUCHO

CERTIFICAN QUE:

ELIZABETH MENDEZ - POSTER

Asistió al VI Congreso Internacional Cauchero, celebrado en Bucaramanga durante los días 13, 14 y 15 de octubre de 2016

CONFEDERACIÓN CAUCHERA COLOMBIANA

CENICAUCHO

Juan Carlos Silva Fierro
Director Ejecutivo CCC

Fernando García Rubio
Director Ejecutivo CENICAUCHO

El comité organizador del Bogotá Microbial Meeting (Edición II)

certifica que

Maria Elizabeth Méndez Tibambre

con C.C. 1032396520, participó en calidad de PRESENTACIÓN DE PÓSTER en el

que se realizó en la Universidad Nacional de Colombia el día 12 de Agosto de 2016

Con el apoyo de ASM (American Society of Microbiology), el Posgrado de Interfacultades de Microbiología (Universidad Nacional de Colombia e ISME (International Society of Microbial Ecology).

Bibliografía

Ackerveken, G. F., Kan, J. A., & de Wit, P. J. (1992). Molecular analysis of the avirulence gene avr9 of the fungal tomato pathogen Cladosporium fulvum fully supports the gene-for-gene hypothesis. *The Plant Journal*, *2*(3), 359-366.

Almeida, D. P., & Huber, D. J. (1999). Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: a potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. Physiologia Plantarum., 105(3), 506-512.

Alvim, P. (1982). Amazonia: investigación sobre agricultura y uso de tierras (Vol. 82). Una evaluación en la perspectiva de los cultivos perennes en la Cuenca Amazónica. En: HETCH, S.B. Amazonia. Investigación sobre agricultura y uso de tierras. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1982, p. 326. .

Andreasson, E., Abreha, K. B., & Resjö, S. (2017). Isolation of Apoplast. Isolation of Plant Organelles and Structures. In M. A. Taylor NL (Ed.), Methods and Protocols (pp. 233-240). New York: Springer.

Araya, T., Bohner, A., & von Wirén, N. (2015). Extraction of Apoplastic Wash Fluids and Leaf Petiole Exudates from Leaves of Arabidopsis thaliana. Bio-protocol, 5(24), e1691. doi: https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1691

ASTM-International. (2011). Standard Specification for Natural Rubber (NR) Technical Grades (Vol. ASTM D2227-96, pp. 2). West Conshohocken: ASTM International.

Baker, C. J., Kovalskaya, N. Y., Mock, N. M., Owens, R. A., Deahl, K. L., Whitaker, B. D., & Aver'yanov, A. A. (2012). An internal standard technique for improved quantitative analysis of apoplastic metabolites in tomato leaves. *Physiological and molecular plant pathology*, *78*, 31-37.

Bello, E. I., & Otu, F. (2015). Physicochemical Properties of Rubber (Hevea brasiliensis) Seed Oil, Its Biodiesel and Blends with Diesel. British Journal of Applied Science & Technology, 6(3), 261-275.

Blinda, A., Koch, B., Ramanjulu, S., & Dietz, K. (1997). De novo synthesis and accumulation of apoplastic proteins in leaves of heavy metal-exposed barley seedlings. Plant, Cell & Environment, 20(8), 969-981.

Bolton, M. D., Van Esse, H. P., Vossen, J. H., De Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I. J & De Wit, P. J. (2008). The novel Cladosporium fulvum lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular microbiology*, *69*(1), 119-136.

Bollag, D. M., Rozycki, M. D., & Edelstein, S. J. (1996). Gel electrophoresis under denaturing conditions. In: Protein methods, 2nd edn. New York (NY, USA): Wiley-Liss, Inc; 1996. pp 107–154.

Boller, T., & He, S. (2009). Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens Science., 324, 742-744.

Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Lafitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., & Pont-Lezica, R. (2005). Cell wall proteins in apoplastic fluids of Arabidopsis thaliana rosettes: identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics*, *5*(1), 212-221.

Burgos, J. D., Moreno, J., & Rojas, J. A. P. (2006). Estudio preliminar de prevalencia de Microcyclus ulei en jardines clonales de Hevea brasiliensis en Cundinamarca, Meta, Santander y Tolima. *Colombia Forestal*, *9*(19), 61-69.

Butcher, B. G., Chakravarthy, S., D'Amico, K., Stoos, K. B., & Filiatrault, M. J. (2016). Disruption of the carA gene in Pseudomonas syringae results in reduced fitness and alters motility. *BMC microbiology*, *16*(1), 194.

Calderan-Rodrigues, M. J., Jamet, E., Douché, T., Bonassi, M. B. R., Cataldi, T. R., Fonseca, J. G., & Labate, C. A. (2016). Cell wall proteome of sugarcane stems: comparison of a destructive and a non-destructive extraction method showed differences in glycoside hydrolases and peroxidases. *BMC plant biology*, *16*(1), 14.

Castellanos, O., Fonseca, S., & Barón, M. (2009). Agenda Prospectiva De Investigación Y Desarrollo Tecnológico Para La Cadena Productiva De Caucho Natural Y Su Industria En Colombia Vol. 29. G. E. Ltda. (Ed.) (pp. 1 - 209). Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-56092009000200025&lng=en&tlng=es.

Castro Navarro, O., M. (2011). Caracterización de los patosistemas foliares de importancia económica en caucho (Hevea brasiliensis Müll. Arg) en la Altillanura estructural plana del Meta (Tesis Doctoral. Tesis Doctoral), Universidad Nacional de Colombia., Colombia.

Ciuffetti, L. M., Manning, V. A., Pandelova, I., Betts, M. F., & Martinez, J. P. (2010). Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the Pyrenophora tritici-repentis–wheat interaction. *New Phytologist*, *187*(4), 911-919.

Compagnon, P. (1998). El caucho natural biología, cultivo, producción. México, DF.

Confederación Cauchera Colombiana. (2016). Censo de Plantaciones de Caucho Natural (Hevea brasiliensis). In C. C. COLOMBIANA (Ed.), (Vol. 1, pp. 1 - 30). Bogotá

Chandra, U., Reju, M. J., Singh, R. P., Das, G., Panda, D., & Mydin, K. K. (2016). Studies on the Evaluation of the Half-sib Progenies to Identify the Prepotency of the Mother Clones of Hevea brasiliensis in Meghalaya. International Journal of Bio-resource and Stress Management, 7(5), 1063-1067. doi: DOI: 10.5958/0976-4038.2016.00167.6

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, *124*(4), 803-814.

Cui, H., Tsuda, K., & Parker, J. E. (2015). Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. Annual review of plant biology, 66, 487-511.

Dannel, F., Pfeffer, H., & Marschner, H. (1995). Isolation of apoplasmic fluid from sunflower leaves and its use for studies on influence of nitrogen supply on apoplasmic pH. *Journal of Plant Physiology*, *146*(3), 273-278

Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *nature*, *411*(6839), 826-833.

De Araujo, A. E., Kalil Filho, N., Nogrega, M. B. M., Sousa, N. C., & dos SANTOS, J. W. (2001). Reaçaõ de dez clones de seringueira (Hevea benthamiana) a três isolados de Microcyclus ulei. *Acta Amazonica*, *31*(3), 349-356.

da Hora Júnior, B. T., de Macedo, D. M., Barreto, R. W., Evans, H. C., Mattos, C. R. R., Maffia, L. A., & Mizubuti, E. S. (2014). Erasing the past: a new identity for the Damoclean pathogen causing South American leaf blight of rubber. *PloS one*, *9*(8), e104750.

D'HAESE, D., Vandermeiren, K., Asard, H., & Horemans, N. (2005). Other factors than apoplastic ascorbate contribute to the differential ozone tolerance of two clones of Trifolium repens L. *Plant, Cell & Environment*, *28*(5), 623-632.

de Jonge, R., van Esse, H. P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., & Thomma, B. P. (2010). Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. Science, 329(5994), 953-955.

De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., & Cervone, F. (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology, 39, 313-335.

Delaunois, B., Colby, T., Belloy, N., Conreux, A., Harzen, A., Baillieul, F., & Cordelier, S. (2013). Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes. *BMC plant biology*, *13*(1), 24.

Delaunois, B., Baillieul, F., Clément, C., Jeandet, P., & Cordelier, S. (2016). Vacuum Infiltration-Centrifugation Method for Apoplastic Protein Extraction in Grapevine. *Unconventional Protein Secretion: Methods and Protocols*, 249-257.

Delmadi, L. C., Neto, D. C., & Rocha, V. D. F. (2009). Evaluation of the potential use of the hyperparasite *Dicyma pulvinata* (Berk. & MA Curtis) in the biological control of rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Wild. ex A. Juss.) Muell. Arg.] south american leaf blight [*Microcyclus ulei* (Henn) Arx] in São José do Rio Claro. Ciência Florestal, 19(2), 183-193.

De Wit, P. J. G. M., Mesarich, C. H., Ökmen, B., van der Burgt, I. A., Iida, Y., Battaglia, E., ... & Collemare, J. A. R. (2014). The role of effectors, pamps, and secondary metabolites in adaptation of Cladosporium fulvum to tomato. In *Book of Abstracts XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions* (pp. 41-41).

De Wit, P. J., Van Der Burgt, A., Ökmen, B., Stergiopoulos, I., Abd-Elsalam, K. A., Aerts, A. L., ... & Datema, E. (2012). The genomes of the fungal plant pathogens Cladosporium fulvum and Dothistroma septosporum reveal adaptation to different hosts and lifestyles but also signatures of common ancestry. *PLoS Genet*, *8*(11), e1003088.

De Wit, P. J., Mehrabi, R., van den Burg, H. A., & Stergiopoulos, I. (2009). Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular plant pathology*, *10*(6), 735-747.

De Wit, P. J., Joosten, M. H., Thomma, B. H., & Stergiopoulos, I. (2009). Gene for gene models and beyond: the Cladosporium fulvum-Tomato pathosystem. In *Plant Relationships* (pp. 135-156). Springer Berlin Heidelberg.

De Wit, P. J. (1977). A light and scanning-electron microscopic study of infection of tomato plants by virulent and avirulent races of Cladosporium fulvum. *European Journal of Plant Pathology*, *83*(3), 109-122.

De Wit, P. J. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. Cellular and Molecular Life Sciences, 64(21), 2726-2732.

De Wit, P. J., & Spikman, G. (1982). Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. Physiological Plant Pathology, 21(1), 1IN19-18IN211.

FAO. (2016). Ruber Tree Production FAO. Retrieved 21/09/2016, 2016, from http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S

Felle, H. H. (2006). Apoplastic pH during low-oxygen stress in barley. Annals of Botany, 98(5), 1085-1093.

Fink, W., Liefland, M., & Mendgen, K. (1988). Chitinases and ,B-1,3-Glucanases in the Apoplastic Compartment of Oat Leaves (Avena sativa L). Plant Physiology, 88, 270-275.

Floerl, S., Druebert, C., Majcherczyk, A., Karlovsky, P., Kües, U., & Polle, A. (2008). Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (Brassica napus var. napus) attenuate Verticillium longisporum growth but not disease symptoms. BMC Plant Biology, 8(1), 1. doi: 10.1186/1471-2229-8-129

Floerl, S., Majcherczyk, A., Possienke, M., Feussner, K., Tappe, H., Gatz, C., & Polle, A. (2012). Verticillium longisporum infection affects the leaf apoplastic proteome, metabolome, and cell wall properties in Arabidopsis thaliana. *PLoS One*, *7*(2), e31435.

Flor, H., H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. Annu Rev Phytopathology, 9(1), 275-296.

García, D., Carels, N., Koop, D. M., de Sousa, L. A., de Andrade Junior, S. J., Pujade-Renaud, V., & de Mattos Cascardo, J. C. (2011). EST profiling of resistant and susceptible Hevea infected by Microcyclus ulei. . Physiological and molecular plant pathology, 76(2), 126-136.

Garcia, D., Cazaux, E., Rivano, F., & D'Auzac, J. (1995). Chemical and structural barriers to Microcyclus ulei, the agent of South American leaf blight, in Hevea spp. *Forest Pathology*, *25*(5), 282-292.

Garcia, D., Troispoux, V., Grange, N., Rivano, F., & d'Auzac, J. (1999). Evaluation of the resistance of 36 Hevea clones to Microcyclus ulei and relation to their capacity to accumulate scopoletin and lignins. *European Journal of Forest Pathology*, *29*(5), 323-338.

García-Romero, I. A., Castro, O. M., Aristizábal, F., & Tapiero, A. L. (2011). Primer reporte de susceptibilidad del clon de caucho natural FX-3864 a Microcyclus ulei en la altillanura colombiana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *13*(1), 144-147.

García-Romero, I.A., González, S., Milena, S., Montoya, C., & Aristizabal, F. (2011). Identification in silico of SSR markers for genotyping Hevea sp. clone gardens in Colombia. *Agronomía Colombiana*, *29*(3), 359-366.

García-Romero, Peraza-Arias, A. R., Pinzón-Gutiérrez, Y. A., Santacruz-Saldaña, O. E., Tapiero, A., León, G, Castilla-Campos, E. (2013). Modelo Productivo para el cultivo del árbol de caucho natural en la Orinoquía. CENICAUCHO-CORPOICA. Retrieved Junio, 2015, from http://www.siembra.co/NetCorpoicaMVC/WebSot/(S(e4jvirjjixkjn5vwv5bnb4gc))/Content/HTMLModelosProductivos/pdf/MP_Caucho/MP_Caucho.pdf

García-Romero, I. A., Aristizábar, F. A., & Castaño, D. M. (2006). Revisión sobre el hongo Microcyclus ulei, agente causal del mal suramericano de la hoja del caucho. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *8*(2), 50-59.

García-Romero, I. A. (2012). Estudio de la interacción planta – patógeno en clones comerciales de Hevea brasiliensis presentes en jardines clónales de Colombia, susceptibles y resistentes al mal suramericano de la hoja del caucho. ((Doctor en

Ciencias Agropecuarias) Tesis Doctoral), Universidad Nacional de Colombia Facultad de Agronomía,, Bogotá

Garnica, D. P., Nemri, A., Upadhyaya, N. M., Rathjen, J. P., & Dodds, P. N. (2014). The ins and outs of rust haustoria. *PLoS Pathog*, *10*(9), e1004329.

Gasparotto, L., Lieberei, R., & Trindade, D. (1984). GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE MICROCYCLUS ULEI E SUA SENSIBILIDADE A FUNGICIDAS, "IN VITRO". Fitopatologia brasil., 9, 505-511.

Gasparotto, L., Santos, A. F. D., Pereira, J. C. R., & Ferreira, F. A. (2012). Doenças da seringueira no Brasil. Brasília, DF. *EMBRAPA*, *2*.

Giraldo, M. C., & Valent, B. (2013). Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(11), 800-814.

Grist, P., & Menz, K. M. (1995). Modelling rubber growth as a function of climate and soils (C. f. R. a. E. Studies Ed.). Canberra, Australia.

Guerra-Guimarães, L., Tenente, R., Pinheiro, C., Chaves, I., do Céu Silva, M., Cardoso, F. M., & Ricardo, C. P. (2015). Proteomic analysis of apoplastic fluid of Coffea arabica leaves highlights novel biomarkers for resistance against Hemileia vastatrix. Frontiers in plant science, 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00478

Guyot, J., & Eveno, P. (2015). Maturation of perithecia and ascospores discharge in South American leaf blight of rubber tree. . European Journal of Plant Pathology, 143(3), 427-436.

Guyot, J., Condina, V., Doaré, F., Cilas, C., & Sache, I. (2014). Role of ascospores and conidia in the initiation and spread of South American leaf blight in a rubber tree plantation. Plant pathology, 63(3), 510-518.

Guyon K, Balague C, Roby D, Raffaele S (2014) Secretome analysis reveals effector candidates associated with broad host range necrotrophy in the fungal plant pathogen Sclerotinia sclerotiorum. BMC Genomics 15: 336. pmid:2488603.

Guzmán-Guzmán, P., Alemán-Duarte, M. I., Delaye, L., Herrera-Estrella, A., & Olmedo-Monfil, V. (2017). Identification of effector-like proteins in Trichoderma spp. and role of a hydrophobin in the plant-fungus interaction and mycoparasitism. *BMC genetics*, *18*(1), 16.

He, P., Shan, L., & Sheen, J. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant–microbe interactions. *Cellular microbiology*, *9*(6), 1385-1396.

Hemetsberger, C., Herrberger, C., Zechmann, B., Hillmer, M., & Doehlemann, G. (2012). The Ustilago maydis effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity. PLoS Pathog, 8(5), e1002684. doi: :10.1371/journal.ppat.1002684

Hemetsberger, C., Mueller, A. N., Matei, A., Herrberger, C., Hensel, G., Kumlehn, J., & Doehlemann, G. (2015). The fungal core effector Pep1 is conserved across smuts of dicots and monocots. *New Phytologist*, *206*(3), 1116-1126.

Huang, T., Nicodemus, J., Zarka, D. G., Thomashow, M. F., Wisniewski, M., & Duman, J. G. (2002). Expression of an insect (Dendroides canadensis) antifreeze protein in Arabidopsis thaliana results in a decrease in plant freezing temperature. Plant molecular biology, 50(3), 333-344. doi: 10.1023/A:1019875922535

Husted, S., Hebbern, C. A., Mattsson, M., & Schjoerring, J. K. (2000). A critical experimental evaluation of methods for determination of NH4+ in plant tissue, xylem sap and apoplastic fluid. Physiologia Plantarum., 109(2), 167-179.

IRSG. (2016). Rubber Stastistical Bulletin. Retrieved Julio 2016, from (http://www.rubberstudy.com/documents/WebSiteData_June2016.pdf)

Islas-Flores, I., Alcocer-Alvarez, C., Sánchez-Rodríguez, Y. A., & Canto-Canché, B. (2015). Recovery of active pathogenesis-related enzymes from the apoplast of Musa acuminata infected by Mycosphaerella fijiensis. . African Journal of Biotechnology, 14(23), 1970-1981. doi: 10.5897/AJB2014.14334

Jasso Mata, J., Palma López, D. J., Rojo Martínez, G. E., Vargas Hernández, J. J., & Velázquez Martínez, A. (2003). Predicción de la producción de látex en plantaciones comerciales de hule (hevea brasiliensis müll. Arg.) en Oaxaca, México. Revista Fitotecnia Mexicana., 26(3), 183 – 190.

Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. Nature, 444(7117),323-329.

Joosten, M. H., & de Wit, P. J. (1999). The Tomato–Cladosporium F ulvum Interaction: A Versatile Experimental System to Study Plant-Pathogen Interactions. *Annual review of phytopathology*, *37*(1), 335-367.

Joosten, M. H., Bergmans, C. J., Meulenhoff, E. J. S., Cornelissen, B. J., & De Wit, P. J. (1990). Purification and serological characterization of three basic 15-kilodalton pathogenesis-related proteins from tomato. *Plant physiology*, *94*(2), 585-591.

Joosten, M. H., & De Wit, P. J. (1989). Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with Cladosporium fulvum (syn. Fulvia fulva) as 1, 3-β-glucanases and chitinases. *Plant Physiology*, *89*(3), 945-951.

Joosten, M. H. (2012). Isolation of apoplastic fluid from leaf tissue by the vacuum infiltration-centrifugation technique. *Plant Fungal Pathogens: Methods and Protocols*, 603-610.

Junqueira, N. T. V., Chaves, G. M., Zambolim, L., Romeiro, R. D. S., & Gasparotto, L. (1984). Isolamento, cultivo e esporulação de Microcyclus ulei, agente etiológico do mal-das-folhas da seringueira. *Revista Ceres*, 31, 322-332.

Klement, Z. (1965). Method of obtaining fluid from the intercellular spaces of foliage and the fluid's merit as substrate for phytobacterials pathogens. Phytopathology, 55, 1033-1034.

Koop, D. M., Rio, M., Sabau, X., Cardoso, S. E. A., Cazevieille, C., Leclercq, J., & Garcia, D. (2016). Expression analysis of ROS producing and scavenging enzyme-encoding genes in rubber tree infected by Pseudocercospora ulei. *Plant Physiology and Biochemistry*, *104*, 188-199.

Kruijt, M., de Kock, M. J., & de Wit, P. J. (2005). Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Molecular plant pathology*, *6*(1), 85-97.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685. doi: 10.1038/227680a0

Le Guen, V., Garcia, D., Mattos, C. R. R., Doaré, F., Lespinasse, D., & Seguin, M. (2007). Bypassing of a polygenic Microcyclus ulei resistance in rubber tree, analyzed by QTL detection. *New phytologist*, *173*(2), 335-345.

Le Guen, V., Guyot, J., Mattos, C. R. R., Seguin, M., & Garcia, D. (2008). Long lasting rubber tree resistance to Microcyclus ulei characterized by reduced conidial emission and absence of teleomorph. *Crop protection*, *27*(12), 1498-1503.

Le Guen, V., Garcia, D., Doaré, F., Mattos, C. R., Condina, V., Couturier, C., & Seguin, M. (2011). A rubber tree's durable resistance to Microcyclus ulei is conferred by a qualitative gene and a major quantitative resistance factor. *Tree Genetics & Genomes*, *7*(5), 877-889.

Le Guen, V., Garcia, D., Mattos, C., Fouet, O., Doaré, F., Condina, V., & Seguin, M. (2013). A newly identified locus controls complete resistance to Microcyclus ulei in the Fx2784 rubber clone. *Tree genetics & genomes*, *9*(3), 805-812.

Lespinasse, D., Grivet, L., Troispoux, V., Rodier-Goud, M., Pinard, F., & Seguin, M. (2000). Identification of QTLs involved in the resistance to South American leaf blight (Microcyclus ulei) in the rubber tree. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, *100*(6), 975-984.

Lieberei, R. (2006). Physiological characteristics of Microcyclus ulei (P. Henn.) V.ARX. - A fungal pathogen of the cyanogenic host *Hevea brasiliensis*. Journal of Applied Botany and Food Quality. 80(1), 63-68.

Lieberei, R. (2007). South American leaf blight of the rubber tree (*Hevea* spp,): new steps in plant domestication using physiological features and molecular markers. Annals of Botany, 100(6), 1125-1142.

Liu, Z., Zhang, Z., Faris, J. D., Oliver, R. P., Syme, R., McDonald, M. C., & Xu, S. (2012). The cysteine rich necrotrophic effector SnTox1 produced by Stagonospora nodorum triggers susceptibility of wheat lines harboring Snn1. *PLoS Pathog*, *8*(1), e1002467.

Lizarralde-Montoya, R. D. (2014). Bullets Junio 2014 Fuente informe IRSG Abril – junio 2014 In S. H. C. Bogotá (Ed.), (pp. 15). Colombia: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Lohaus, G., Pennewiss, K., Sattelmacher, B., Hussmann, M., & Hermann Muehling, K. (2001). Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum*, *111*(4), 457-465.

López, R., Asencio, C., Guzmán, M., & Boonham, N. (2006). Development of real-time and conventional RT-PCR assays for the detection of Potato yellow vein virus (PYVV). Journal of Virological Methods, 136, 24 – 29.

Lo Presti, L., Lanver, D., Schweizer, G., Tanaka, S., Liang, L., Tollot, M., ... & Kahmann, R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual review of plant biology*, *66*, 513-545.

Luderer, R., De Kock, M. J., Dees, R. H., De Wit, P. J., & Joosten, M. H. (2002). Functional analysis of cysteine residues of ECP elicitor proteins of the fungal tomato pathogen Cladosporium fulvum. *Molecular plant pathology*, *3*(2), 91-95.

Lyu, X., Shen, C., Fu, Y., Xie, J., Jiang, D., Li, G., & Cheng, J. (2016). A small secreted virulence-related protein is essential for the necrotrophic interactions of Sclerotinia sclerotiorum with its host plants. *PLoS Pathog*, *12*(2), e1005435.

Macho, A. P., & Zipfel, C. (2015). Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. Current opinion in microbiology, 23, 14-22.

Madden, L. V., & Wheelis, M. (2003). The threat of plant pathogens as weapons against US crops. Annual Review of Phytopathology, 41(1), 155-176.

Maksimović, J. J. D., Živanović, B. D., Maksimović, V. M., Mojović, M. D., Nikolic, M. T., & Vučinić, Ž. B. (2014). Filter strip as a method of choice for apoplastic fluid extraction from maize roots. *Plant Science*, *223*(1), 49-58.

Martínez, H. J. (2005). La Competitividad de las Cadenas Agroproductivas en Colombia, análisis de su estructura y dinámica, (1991 - 2004) (I. B. Venezuela Ed.). Bogotá: IICA Biblioteca Venezuela.

Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K. E., & Rudd, J. J. (2011). Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus Mycosphaerella graminicola reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant physiology*, *156*(2), 756-769.

Mesarich, C., Ökmen, B., Rövenich, H. J., Jashni, M. K., Wang, C., Griffiths, S. A., & de Wit, P. J. G. M. (2016). Novel effectors identified in the apoplast of Cladosporium fulvum-infected tomato.

Mesarich, C. H., Okmen, B., Rovenich, H., Griffiths, S. A., Wang, C., Jashni, M. K., & van der Burgt, A. (2017). Specific hypersensitive response-associated recognition of new apoplastic effectors from Cladosporium fulvum in wild tomato. *bioRxiv*, 127746.

Mattos, C. R., Garcia, D., Pinard, F., & Le Guen, V. (2003). Variabilidade de isolados de Microcyclus ulei no sudeste da Bahia. *Fitopatologia Brasileira*, *28*(5), 502-507.

Mattos, C. R. R. (1999). Meios de cultura com água de coco verde para esporulação de Microcyclus ulei. Fitopatologia Brasileira, 24, 470.

Mayama, S., Matsuura, Y., Iida, H., & Tani, T. (1982). The role of avenalumin in the resistance of oat to crown rust, Puccinia coronata f. sp. avenae. Physiology and Plant Pathology, 20, 189-199.

Mello, S. C. M. D., Santos, M. D. F., & Silva, J. B. T. D. (2006). Dicyma pulvinata isolates colonizing Microcyclus ulei stromata in rubber. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *41*(2), 359-363.

Mendoza-Rodríguez, M., Sánchez, A., Leiva-Mora, M., Acosta-Suárez, M., Rojas, L., Jiménez, E., & Portal, O. (2006). Extracción de proteínas a partir del fluido intercelular en hojas de banano, cultivar 'Grande naine'(Musa AAA). *Biotecnología Vegetal*, *6*(1), 59 – 62.

Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W., & Young, N. D. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *The Plant Journal*, *20*(3), 317-332.

Mueller, A. N., Ziemann, S., Treitschke, S., Aßmann, D., & Doehlemann. (2013). Compatibility in the Ustilago maydis–maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. G. PLoS Pathog, 9(4), e1003177. doi: 10.1371/journal.ppat.1003177

Ndimba, B. K., Chivasa, S., Hamilton, J. M., Simon, W. J., & Slabas, A. R. (2003). Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of Arabidopsis cell suspension cultures induced by fungal elicitors. *Proteomics*, *3*(6), 1047-1059.

Nouchi, I., Hayashi, K., Hiradate, S., Ishikawa, S., Fukuoka, M., Chen, C. P., & Kobayashi, K. (2012). Overcoming the difficulties in collecting apoplastic fluid from rice leaves by the infiltration–centrifugation method. *Plant and Cell Physiology*, *53*(9), 1659-1668.

Ojito-Ramos, K., & Portal, O. (2010). Introducción al sistema inmune en plantas. *Biotecnología vegetal*, *10*(1),3-19.

O'Leary, B. M., Rico, A., McCraw, S., Fones, H. N., & Preston, G. M. (2014). The infiltration-centrifugation technique for extraction of apoplastic fluid from plant leaves using Phaseolus vulgaris as an example. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 94, e52113-e52113.

Olivieri, F., Godoy, A. V., Escande, A., & Casalongué, A. C. (1998). Analysis of intercellular washing fluids of potato tubers and detection of increased proteolytic activity upon fungal infection. . Physiological Plantarum, 104, 232-238.

Páez, U. A. H., Romero, I. A. G., Restrepo, S. R., Gutiérrez, F. A. A., & Castaño, D. M. (2015). Assembly and analysis of differential transcriptome responses of Hevea brasiliensis on interaction with Microcyclus ulei. . PloS one, 10(8), e0134837.

Palomares Rius, J., E (2009). Estudio de los mecanismos de interacción entre Meloidogyne artiellia y Fusarium oxysporum f. sp. ciceris en genotipos de garbanzo. (TESIS DOCTORAL TESIS DOCTORAL), UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA.

Pérez-Vera, O. A., Yañez-Morales, M. J., Alvarado-Rosales, D., Cibrian-Tovar, D., & García-Díaz, S. E. (2005). Hongos asociados a Eucalipto, Eucalyptus grandis Hill: Maid Fungi. *Agrociencia*, *39*, 311-318.

Petriccione, M., Salzano, A. M., Di Cecco, I., Scaloni, A., & Scortichini, M. (2014). Proteomic analysis of the Actinidia deliciosa leaf apoplast during biotrophic colonization by Pseudomonas syringae pv. actinidiae. *Journal of proteomics*, *101*, 43-62.

Regalado, A. P., & Ricardo, C. P. (1996). Study of the intercellular fluid of healthy Lupinus albus organs (presence of a chitinase and a thaumatin-like protein). *Plant physiology*, *110*(1), 227-232.

Rico, A., Jones, R., & Preston, G. M. (2009). Adaptation to the plant apoplast by plant pathogenic bacteria. Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology, 63-89.

Rivano, F., Maldonado, L., Simbaña, B., Lucero, R., Gohet, E., Cevallos, V., & Yugcha, T. (2015). Suitable rubber growing in Ecuador: An approach to South American leaf blight. Industrial Crops and Products, 66, 262-270.

Rivano, F., Martinez, M., Cevallos, V., & Cilas, C. (2010). Assessing resistance of rubber tree clones to Microcyclus ulei in large-scale clone trials in Ecuador: a less time-consuming field method. European Journal of Plant Pathology, 126(4), 541-552.

Rivano, F., Mattos, C. R., Cardoso, S. E., Martinez, M., Cevallos, V., Le Guen, V., & García, D. (2013). Breeding Hevea brasiliensis for yield, growth and SALB resistance for high disease environments. Industrial Crops and Products, 44 659-670.

Rooney, H. C., van't Klooster, J. W., van der Hoorn, R. A., Joosten, M. H., Jones, J. D., & de Wit, P. J. (2005). Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science*, *308*(5729), 1783-1786.

Saha, T., Roy, C. B., & Nazeer, M. A. (2005). Microsatellite variability and its use in the characterization of cultivated clones of Hevea brasiliensis. *Plant breeding*, *124*(1), 86-92.

Sambugaro, R. (2007). Estágios foliares, fenología da seringueira (Hevea spp,) e interação com Microcyclus ulei Mal das folhas. (Tese Doutorado), Universidade Estadual Paulista. , Botucatu.

Sarris, P. F., Duxbury, Z., Huh, S. U., Ma, Y., Segonzac, C., Sklenar, J., & Wirthmueller, L. (2015). A plant immune receptor detects pathogen effectors that target WRKY transcription factors. *Cell*, *161*(5), 1089-1100.

Sattelmacher, B. (2001). The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. New phytologist, 149(2), 167-192.

Schubert, K., Ritschel, A., & Braun, U. (2003). A monograph of Fusicladium s. lat. (Hyphomycetes). Schlenchtendalia, 9, 353-356.

Seling, S., Wissemeier, A. H., Cambier, P., & Van Cutsem, P. (2000). Calcium deficiency in potato (Solanum tuberosum ssp. tuberosum) leaves and its effects on the pectic composition of the apoplastic fluid. Physiologia Plantarum., 109(1), 44-50.

Sepulveda, O. R. (1995). Historia e Importancia del Caucho. El Cacaotero Colombiano, 39.

Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintha, R., & van der Hoorn, R. A. (2008). Fungal effector protein AVR2 targets diversifying defense-related cys proteases of tomato. The Plant Cell, 20(4), 1169-1183. doi: 10.1105/tpc.107.056325

Shenton, M. R., Berberich, T., Kamo, M., Yamashita, M., Taira, H., & Terauchi, R. (2012). Use of intercellular washing fluid to investigate the secreted proteome of the rice–Magnaporthe interaction. Journal of plant Research 125, 311–316.

Shindo, T., Kaschani, F., Yang, F., Kovács, J., Tian, F., Kourelis, J., & Kumari, S. (2016). Screen of Non-annotated Small Secreted Proteins of Pseudomonas syringae Reveals a Virulence Factor That Inhibits Tomato Immune Proteases. *PLoS Pathog*, *12*(9), e1005874.

Shiu, S. H., & Bleecker, A. B. (2003). Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in Arabidopsis. Plant Physiology, 132(2), 530-543.

Silva-Gomesa, S., Decouta, A., & Nigoua, J. (2014). Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Encyclopedia of Inflammatory Diseases*, 1-16.

Sonah, H., Deshmukh, R. K., & Bélanger, R. R. (2016). Computational prediction of effector proteins in fungi: opportunities and challenges. *Frontiers in plant science*, *7*.

Stergiopoulos, I., van den Burg, H. A., Ökmen, B., Beenen, H. G., van Liere, S., Kema, G. H., & de Wit, P. J. (2010). Tomato Cf resistance proteins mediate recognition of cognate homologous effectors from fungi pathogenic on dicots and monocots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(16), 7610-7615.

Stergiopoulos, I., Kourmpetis, Y. A., Slot, J. C., Bakker, F. T., De Wit, P. J., & Rokas, A. (2012). In silico characterization and molecular evolutionary analysis of a novel superfamily of fungal effector proteins. *Molecular biology and evolution*, *29*(11), 3371-3384.

Stergiopoulos, I., & de Wit, P. J. (2009). Fungal effector proteins. *Annual review of phytopathology*, *47*, 233-263.

Sterling, A., Rodríguez, O. L., Quintero, L., & Correa, J. (2009). Evaluación fitosanitaria y resistencia en campo a Microcyclus ulei de Hevea brasiliensis en la Amazonia colombiana. *Revista Colombia Amazónica*, *2*, 80-90.

Sterling, A., Rodríguez, O. L., & Barrera, L. Q. (2010). Variabilidad fisiológica de aislamientos de Microcyclus ulei de la Amazonia colombiana. Momentos de Ciencia, 7(1), 30 - 35.

Sterling, C. A., & Correa, D.J. (2010). Desempeño en período de inmadurez de una colección clonal de caucho en la Amazonia Colombiana. Universidad de la Amazonia. Ingenierías & Amazonia., 3(1), 16 – 27.

Sterling Cuéllar, A., & Melgarejo, L. M. (2014). Variación temporal a Microcyclus ulei en los clones de caucho FX 3864 y FX 4098 en condiciones controladas. Revista Colombiana de Biotecnología, 16(2), 158-168.

Stirling, D. (2003). DNA extraction from fungi, yeast, and bacteria. (Stirling Ed.). *PCR Protocols*, 53-54.

Suarez, Y. Y. J., Molina, J. R., & Furtado, E. L. (2015). Hevea brasiliensis clones with high productivity and resistance to Microcyclus ulei in clonal garden in the Middle Magdalena Colombian region. *Summa Phytopathologica*, *41*(2), 115-120.

Tampakaki, A. P., Hatziloukas, E., Panopoulos, N.J. (2009). *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press.

Tiffin, P., & Moeller, D. A. (2006). Molecular evolution of plant immune system genes. Science Direct, 22(12), 662 - 670.

Tsuda, K., & Somssich, I. E. (2015). Transcriptional networks in plant immunity. New phytologist, 206(3), 932-947.

Van den Ackerveken, G. F. J. M., Van Kan, J. A., Joosten, M. H. A. J., Muisers, J. M., Verbakel, H. M., & De Wit, P. J. G. M. (1993). Characterization of two putative pathogenicity genes of the fungal tomato pathogen Cladosporium fulvum. Molecular Plant-Microbe Interactions, 6(2), 210-215.

Van den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M. H., Vervoort, J., & de Wit, P. J. (2006). Cladosporium fulvum Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(12), 1420-1430.

Van Esse, H. P., Thomma, B. P., van't Klooster, J. W., & de Wit, P. J. (2006). Affinity-tags are removed from Cladosporium fulvum effector proteins expressed in the tomato leaf apoplast. *Journal of experimental botany*, *57*(3), 599-608.

Varghese, Y. A., Knaak, C., Sethuraj, M. R., & Ecke, W. (1997). Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in Hevea brasiliensis. Plant breeding, 116(1), 47-52.

Venkatachalam, P., Geetha, N., Sangeetha, P., & Thulaseedharan, A. (2013). Natural rubber producing plants: an overview. African Journal of Biotechnology, 12(12), 1297-1310.

Villarraga, D. M. V., Tibambre, M. E. M., Romero, I. A. G., Suarez-Moreno, Z., & Moreno-Sarmiento, N. (2017). Evaluation of biocontrol properties of Streptomyces spp. isolates against phytopathogenic fungi *Colletotrichum gloeosporioides* and *Microcyclus ulei.* African Journal of Microbiology Research, 11(5), 141-154.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, *18*(1), 315-322.

Witzel, K., Shahzad, M., Matros, A., Mock, H. P., & Mühling, K. H. (2011). Comparative evaluation of extraction methods for apoplastic proteins from maize leaves. *Plant Methods*, *7*(1), 48.

Young, S. A., Guo, A., Guikema, J. A., White, F. F., & Leach, J. E. (1995). Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with Xanthomonas oryzae pv oryzae. *Plant Physiology*, *107*(4), 1333-1341.

Zhang, L., Tian, L. H., Zhao, J. F., Song, Y., Zhang, C. J., & Guo, Y. (2009). Identification of an apoplastic protein involved in the initial phase of salt stress response in rice root by two-dimensional electrophoresis. *Plant Physiology*, *149*(2), 916-928.

Zhang, Z., Wu, Y., Gao, M., Zhang, J., Kong, Q., Liu, Y., & Zhang, Y. (2012). Disruption of PAMP-induced MAP kinase cascade by a Pseudomonas syringae effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. Cell host & microbe, 11(3), 253-263.