UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudio de la interacción planta – patógeno en clones comerciales de *Hevea brasiliensis* presentes en jardines clonales de Colombia, susceptibles y resistentes al mal suramericano de la hoja del caucho

Ibonne Aydee García Romero

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Agronomía, Escuela de posgrados,

Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias – Énfasis en fitopatología

Bogotá, Colombia

2012

Estudio de la interacción planta – patógeno en clones comerciales de *Hevea brasiliensis* presentes en jardines clonales de Colombia, susceptibles y resistentes al mal suramericano de la hoja del caucho

Ibonne Aydee García Romero

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias

Directora:

PhD, MSc, QF, Dolly Montoya Castaño

Codirectora:

PhD, MSc, B, Silvia Restrepo Restrepo

Línea de Investigación:

Caucho Natural - Fitopatología

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Bioprospección del Instituto de Biotecnología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Agronomía, Escuela de Posgrados

Bogotá, Colombia

2012

A mi hijo Matías y mi esposo Mauricio

Agradecimientos

Agradezco a la profesora Dolly Montoya mi directora y coordinadora del grupo de Bioprocesos y bioprospección por su apoyo incondicional y acertada dirección. Por su ejemplo de vida y su amistad que trascendió el trabajo académico.

Al profesor Fabio Ancizar Aristizabal Gutiérrez coordinador del laboratorio de biología molecular de plantas y la línea en investigación en caucho natural por su apoyo permanente y compromiso con la línea de investigación, “por ponerse la camiseta con nosotros los estudiantes”.

A la doctora Silvia Restrepo Restrepo por su colaboración y asesoría en el planteamiento del proyecto, durante todo el desarrollo del componente de fitopatología molecular, por la confianza que siempre tuvo en mi y su buena disposición para ayudarme en la parte experimental y desarrollo de documentos.

Al doctor Aníbal Tapiero por su asesoría en la parte de la evaluación del SALB en campo, el aislamiento de *M. ulei*, así como su colaboración para contactar los grupos de investigación en caucho natural de Brasil.

A la profesora Esperanza Torres por su colaboración en el planteamiento del proyecto así como la búsqueda de financiación para el mismo. Su apoyo durante los semestres como asistente de docencia en la facultad de Agronomía.

A los profesores que evaluaron el proyecto de tesis, el examen de calificación, los cuatro seminarios doctorales y los profesores con quienes curse asignaturas dentro del doctorado. Quienes con su estricta evaluación y crítica constructiva consolidaron mi conocimiento en diferentes áreas de la fitopatología así como la construcción de mi línea de pensamiento.

A la escuela de posgrados de la Facultad de Agronomía que me acepto como estudiante de doctorado y colaboró para la realización de todas las diferentes etapas de mi formación.

A todo el personal académico, de investigación y la unidad administrativa del Instituto de Biotecnología (mi segundo hogar), quienes me brindaron todo el soporte estructural y

físico para la realización de mi trabajo de tesis, así como la motivación para lograr sacarlo adelante.

A mis compañeros y amigos Oscar Santacruz, Laura Cerón, Sandra Sayer, Sandra Rodríguez, Guillermo Torres, Leonardo Bocanegra, Jacqueline Ramírez, Claudia Cordero, Alejandro García, Yeimy Pinzón, Silvia Bustamante, Carolina Cuellar y Elizabeth Méndez con quienes compartí los buenos y malos resultados. Quienes desde su área de conocimiento siempre estuvieron dispuestos a ayudarme a solucionar problemas que fueron surgiendo durante el desarrollo de este trabajo de investigación. Les agradezco a todos el brindarme no solo su conocimiento sino su amistad incondicionalmente.

A los pasantes del colegio mayor de Cundinamarca quienes cada semestre me colaboraron y me apoyaron en el desarrollo de la parte experimental de la investigación.

Al proyecto Caracterización morfológica y molecular del hongo *M. ulei* dirigido por la profesora Dolly Montoya y el profesor Fabio Aristizábal. El cual fue cofinanciado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural que permitió la formulación de la propuesta de investigación y su financiación durante los dos primeros años.

A la Fundación para la investigación de la ciencia y tecnología del Banco de la República que financio el último año de la investigación.

A la dirección académica por su apoyo económico con el programa de becarios y posteriormente con el de asistentes de docencia.

A mis padres y incondicional.

A mi esposo Mauricio por su apoyo académico, por su amor y su paciencia. A mi hijo Matías por existir y ser mi más grande motivación.

Resumen

El mal suramericano de las hojas del caucho es considerado uno de los limitantes más importantes para el cultivo de *Hevea spp.* en Centro y Sur América. Esta enfermedad es causada por el hongo *Microcyclus ulei*. En condiciones ambientales favorables reduce en un 50% la producción de látex o causa la muerte de clones susceptibles. Existe resistencia al patógeno en diferentes especies de *Hevea* pero con baja productividad, sin embargo se sabe muy poco de los mecanismos moleculares asociados. El objetivo de este estudio fue contribuir con el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la interacción *Hevea spp. – M. ulei*. Para tal fin se evaluó la expresión diferencial génica de tres clones RRIM 600 (susceptible), FX 3864 (resistente parcial) y IAN 710 (resistente total), durante las primeras horas de la infección (0, 24, 48 y 144) en condiciones controladas, inoculados con el aislamiento GCL009 aislado y caracterizado en este trabajo. Se aplicó cDNA-AFLPS utilizando 13 combinaciones de oligos con 2 y 3 bases de selección. Se seleccionaron amplímeros expresados diferencialmente que posteriormente fueron secuenciados, se asignó función a las secuencias consenso obtenido mediante Blastx y tBlastx contra las bases de datos NCBI, TIGR y Phytozome. La validación de la expresión se realizó mediante qRT-PCR aplicado a 12 genes seleccionados, en RRIM 600, FX 3864 y FX 2261 (resistente total) este último con respuesta hipersensible. Se encontraron 99 bandas expresadas diferencialmente a partir de las cuales se obtuvieron 49 secuencias, se asignó función al 84%. Dentro de los genes más relevantes se encontró un dominio LRR con similaridad a Cf-5 de *Lycopersicum esculentum*, una secuencia con similaridad a una proteína NBS de *Euphorbia eusula*, sobreexpresada desde las 24h en FX 2261 y a las 144h en FX 3864. Una secuencia con similaridad a ECP-5 de *Clasdosporium fulvum* la cual fue detectada en el genoma de *M. ulei* y se sobreexpresó en RRIM 600 y FX 3864 a las 24, 48 y 144 hpi, en FX 2261 la expresión se inhibió desde las 48 h. Los resultados obtenidos en esta investigación permiten sugerir que una proteína de *M. ulei* podría ser un efector el cual sería reconocido específicamente por una proteína de *Hevea*.

Palabras clave. *Hevea brasiliensis*, Caucho natural, SALB, *Microcyclus ulei*, Expresión diferencial génica, cDNA-AFLPs, qRT-PCR.

Abstract

The South American leaf blight is considered one of the most important limiting factors for the growth of the natural rubber tree (*Hevea spp.*) in Central and South America. This disease is caused by the fungus *Microcyclus ulei*, which under favorable environmental conditions reduces the production of latex up to 50% or the eventual death of susceptible clones. Several species of *Hevea* have resistance to this pathogen, however, these species have low productivity, and in addition there is limited knowledge of the molecular mechanisms associated with the resistance. The objective of this research was to study the molecular mechanisms involved in the interaction between *Hevea spp.* and *M. ulei*. For this purpose, the differential gene expression of three clones RRIM 600 (susceptible), FX 3864 (partial resistant), IAN 710 (total resistant), was evaluated during the first hours of infection (0, 24, 48 and 144 hpi) in controlled conditions after inoculation with the GCL009 isolate, isolated and characterized in this work. Was performed by applying the cDNA-AFLP protocol using 13 combinations of oligonucleotides with 2 and 3 bases of selection. Differentially expressed amplimers were eluted and sequenced. Function of the sequences obtained was then assigned via Blastx and tBlastx nucleotides against the databases NCBI, TIGR and Phytozome. Validation of the expression was performed by qRT-PCR applied to 12 genes selected in RRIM-600, FX 3864 and FX 2261(total resistant) this latter with hypersensitive response. Ninety nine differentially expressed bands were found from which 49 sequences were obtained, was assigned function to 84% of these. Among the most relevant genes was found LRR domain similar to Cf-5 of *Lycopersicum esculentum* and a sequence with similarity to a protein NBS from *Euphorbia eusula*, that was overexpressed at 24 h in FX 2261 and at 144 h FX 3864. A sequence with similarity to ECP-5 *Clasdosporum fulvum* which was detected in the genome of *M. ulei* was overexpressed on RRIM 600 and FX 3864 at the 24, 28 and 144 hpi, and on FX 2261 the expression was inhibited at 48 h. The results obtained in this research suggest that a protein of *M. ulei* could be an effector which would specifically recognized by a protein of *Hevea.*

Keywords: *Hevea brasiliensis*, Rubber tree, SALB, *Microcyclus ulei*, Differential expression gene, cDNA-AFLPs, qRT-PCR.

Contenido

Resumen y Abstract		**IX**
Lista de figuras		**XIV**
Lista de gráficas		**XV**
Lista de tablas		**XVI**
Lista de abreviaturas		**XVII**
Introducción		**1**
	Capítulo 1	
1.	**MARCO CONCEPTUAL**	
	PRIMERA PARTE	
1.1	Interacción planta patógeno	5
1.2	Inmunidad innata en las plantas	6
1.3	Proteínas PRR	8
1.4	Proteínas R	9
1.4.1	Proteínas NBS-LRR	12
1.4.2	Regulación de proteínas NBS-LRR	13
1.5	Eventos de señalización y respuesta del sistema inmune	15
1.6	Patógenos de las plantas	17
1.6.1	Efectores microbianos	18
1.6.1.1	Efectores de hongos	19
	SEGUNDA PARTE	
1.7	El caucho natural	20
1.8	El árbol de caucho natural	23
1.9	Mal suramericano de las hojas del caucho (South American Leaf Blight – SALB)	25
1.9.1	Signos y síntomas	25
1.10	*Microcyclus ulei* agente etiológico del SALB	27
1.10.1	Taxonomía	27
1.10.2	Morfología y fisiología	27
1.10.3	Ciclo de la enfermedad	28
1.10.4	Variabilidad fisiológica	29

1.10.5 Factores asociados a patogenicidad 31

1.11 Resistencia de Hevea al SALB 32

1.11.1 Búsqueda de resistencia genética al SALB 33

1.12 Estudio molecular de interacciones planta –patógeno 34

Capítulo 2

2. METODOLOGÍA

2.1 Objetivo No1. Determinar los niveles de susceptibilidad de los clones comerciales de *H. brasiliensis* a diferentes aislamientos de *M. ulei* provenientes de la Orinoquía, en condiciones controladas. 38

2.1.1 Aislamientos de *M. ulei* 38

2.1.2 Material vegetal 38

2.1.3 Pruebas de patogenicidad en condiciones controladas 39

2.2 Objetivo No2. Identificar genes expresados diferencialmente en clones de *H. brasiliensis* susceptibles y resistentes durante los primeros días del ataque causado por el hongo *M. ulei* causante del Mal Suramericano de la Hoja del Caucho. 41

2.2.1 cDNA-AFLPs 41

2.2.1.1 Extracción de RNA total 41

2.2.1.2 Síntesis de cDNA de doble cadena 43

2.2.1.3 Reacción de digestión-ligación 44

2.2.1.4 Preamplificación con primers +0 44

2.2.1.5 Amplificación con primers con 2 y 3 bases de selección 45

2.2.1.6 Obtención de TDFs 46

2.2.2 Asignación de función génica 46

2.3 Objetivo No3. Validar mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR) los posibles genes de *H. brasiliensis* que presenten expresión diferencial durante los primeros días del ataque del hongo *M. ulei*, detectados con la técnica de cDNA-AFLPs. 46

2.3.1 Diseño de primers 47

2.3.2 qRT-PCR 47

2.3.3 Calculo de expresión diferencial 50

2.3.4 Validación del TDFMu1 51

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 3

3. SUSCEPTIBILIDAD DE CLONES DE CAUCHO NATURAL A AISLAMIENTOS DE *M. ulei* PROVENIENTES DE LA ORINOQUIA COLOMBIANA 54

3.1 Aislamientos de *M. ulei* 54

3.2	Material vegetal	58
3.3	Pruebas de patogenicidad en condiciones controladas	60
3.4	Conclusiones	60
	Capitulo 4	
4.	**IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN CLONES DE *H. brasiliensis* SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A *M. ulei***	69
4.1	cDNA-AFLPs	69
4.2	Conclusiones	80
	Capítulo 5	
5.	**VALIDACIÓN DE GENES DE EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN LA INTERACCIÓN *M. ulei-H. brasiliensis***	81
5.1	Validación de la expresión génica por qRT-PCR	81
5.1.1	Selección del gen de referencia	82
5.1.2	Diseño de primers	83
5.1.3	Cuantificación relativa de la expresión de los TDFS seleccionados	83
5.2	Validación del TDFMu1	94
5.3	Conclusiones	97
5.4	Conclusiones generales	98
6.	**RECOMENDACIONES**	100
	ANEXOS	102
A	Medios de cultivo para trabajo in vitro *de M. ulei*	102
B	Preparación de adaptadores para la realización de cDNA-AFLPs	103
C	Secuencia ITS1/RNA5.8S/ITS2 de seis aislamientos de *M. ulei* provenientes de la Altillanura colombiana	104
D	Secuencias consenso obtenidas para cada TDF	107
E	Calculo de la eficiencia para cada juego de primers usado en qRT-PCR	114
	LISTA DE PUBLICACIONES	116
	BIBLIOGRAFIA	117

Lista de figuras

No	Título	Pag.
Figura 1-1.	Esquema de proteínas R presentes en especies vegetales.	10
Figura 1-2.	Modelo de activación de las proteínas NB-LRR.	14
Figura 1-3.	Esquema de la activación de la respuesta de defensa en *A. thaliana*, activación por sobreexpresión de genes.	16
Figura 1-4.	Individuos del clon FX 3864 atacados por el SALB, Plantación de la Michelin-Bahía Brasil.	24
Figura 1-5.	Estruct	28
Figura 1-6.	Esquema del ciclo de vida completo de *M. ulei*.	29
Figura 2-1.	Esquema general metodológico.	37
Figura 2-2.	Escala de evaluación de intensidad de esporulación (IE).	40
Figura 2-3.	Pasos metodológicos de la técnica de cDNA-AFLPs.	42
Figura 2-4.	Esquema utilizado para montar los ensayos de qRT-PCR en placas de 96 pozos.	50
Figura 3-1.	Estructuras macro y microscópicas de *M. ulei* in vitro.	55
Figura 3-2.	Amplímeros obtenidos de la región ITS.	56
Figura 3-3.	Análisis de agrupamiento realizado con los aislamientos de *M. ulei* seleccionados.	57
Figura 3-4.	Perfiles electroforéticos obtenidos con los cuatro microsatélites amplificados en tres de los clones evaluados IAN-710, FX3864 y FX-2261.	59
Figura 3-5.	Conidias germinadas in vitro del aislamiento de *M. ulei* RCP009.	63
Figura 3-6.	Foliolos del clon RRIM 600 a los 6 días posinoculación con el aislamiento de *M. ulei* RCP009.	63
Figura 3-7.	Lesiones esporuladas en el clon RRIM 600 a los 12 días posinoculación con el aislamiento de *M. ulei* RCP009.	63
Figura 3-8.	Conidias del aislamiento de *M. ulei* RCP009 a los 6 días posinoculación.	63
Figura 3-9.	Esporulación del aislamiento de *M. ulei* RCP009 12 días posinoculación en el clon IAN 710.	65
Figura 3-10.	Formación de estructuras estromáticas en el clon FX 3864 a los 15 días posinoculación con el aislamiento de *M. ulei* RPC009.	65
Figura 3-11.	Manchas necróticas foliolo (parte adaxial) del clon FX 2261 a los 15 días posinoculación con el aislamiento de *M. ulei* GCP009.	65
Figura 3-12.	Manchas necróticas foliolo (parte abaxial) clon FX 2261 a los15 días posinoculación con el aislamiento de *M. ulei* GCP009.	65
Figura 4-1.	Perfil electroforético con E- AAC/M-CTA.	71
Figura 4-2.	Perfil electroforético con E- CT/M-AT.	71

Figura 4-3. Perfil electroforético con E- CT/M-AT. 72

Figura 4-4. Perfil electroforético con E- CT/M-AT. 72

Figura 4-5. TDFs efluidos de geles de acrilamida y amplificados por PCR. 73

Figura 5-1. Comparación de las secuencias proteicas de Cf-5 de *L. esculentum* y el TDFHb5. 84

Figura 5-2. Diagramas de calor obtenidos en la evaluación de la significancia de la expresión de los 10 genes analizados por qRT-PCR sobre los clones de caucho en los diferentes tiempos phi. 87

Figura 5-3. Amplificación de TDFMu1 sobre DNA de foliolos de *H. brasiliensis* sin síntomas y con síntomas de SALB. 95

Figura 5-4. Comparación de secuencias entre ECP-5 y TDFMu1. 96

Figura 5-5. Esquema del modelo de la Interacción *Hevea spp. – M. ulei.* 99

Lista de gráficas

No	Título	Pag.
Gráfica 1-1.	Comportamiento del precio del caucho natural en los últimos años.	22
Gráfica 2-1.	Esquema de curvas de amplificación obtenidos en PCR en tiempo real.	49
Gráfica 5-1.	Evaluación de la estabilidad de la expresión de los genes de referencia β-actina y factor de elongación.	82
Gráfica 5-2.	Expresión con relación a factor de elongación de los TDFs con similaridad a factores de transcripción.	89
Gráfica 5-3.	Expresión con relación a factor de elongación de TDFs involucrados en síntesis de proteínas.	90
Gráfica 5-4.	Expresión con relación a factor de elongación de TDFs con similaridad a genes relacionados con metabolismo.	91
Gráfica 5-5.	Expresión con relación a factor de elongación del **A**. TDFHb45 asociado a degradación de proteínas con similaridad a E1 activador de la ruta de ubiquitinación. **B.** TDFHb51 con similaridad a una xiloglucan-endotranscglicosilasa.	92
Gráfica 5-6.	Expresión con relación a factor de elongación del TDFHb68 con similaridad a un gen NBS de *E. eusula*.	93
Gráfica 5-7.	Expresión con relación al factor de elongación del TDFMu1 con similaridad a ECP-5 de *C. fulvum.*	95

Lista de tablas

No	Título	Pag.
Tabla 1-1.	Países con mayor área sembrada de caucho natural y producción mundial de caucho seco para el 2010.	21
Tabla 1-2.	Países con mayor consumo de caucho natural para el 2010.	22
Tabla 1-3.	Área sembrada y producción en toneladas de caucho natural por departamento para el 2010.	23
Tabla 2-1.	Primers usados para la evaluación de la identidad de los clones de caucho natural utilizados en las pruebas de patogenicidad.	39
Tabla 2-2.	Combinaciones de primers con dos y tres bases de de selección usados para la obtención de perfiles de expresión por cDNA-AFLPs.	45
Tabla 3-1.	Aislamientos de *M. ulei* que presentaron abundante esporulación.	55
Tabla 3-2.	Tamaños de alelos (pb) obtenidos para los patrones de referencia de cada clon, con cuatro microsatélites evaluados.	59
Tabla 3-3.	Reacción de cinco clones de caucho natural a la inoculación con dos aislamientos de *M. ulei*.	61
Tabla 4-1.	Expresión diferencial cualitativa a los tiempos 0, 24, 48 y 144 hpi en los clones RRIM 600 (S), IAN 710 (R) y FX 3864 (R).	73
Tabla 4-2.	Asignación de función génica obtenida para los TDFs.	76
Tabla 5-1.	Secuencias de primers diseñados para la evaluación por qRT-PCR de los TDFs seleccionados.	83

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
5´UTR	5′-*untranslated región*
ADP	Adenosín difosfato
AFLP	*Amplified fragment length polimorphism*
AJ	Acido jasmónico
Apaf-1	*Apoptotic protease activating factor-1*
ARC1 y 2	*APAF-1, R proteins, and CED-4 domain*
AS	Acído salicílico
ASOHECA	Asociación de heveicultores del Caquetá
ATP	Adenosín trifosfato
Avr	*Avirulence*
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
C3	Carbono-3
C3HC4	$Cys_3HisCys_4$
C4	Carbono-4
CAF-1	*Chromatin assembly factor*-1
CAM	*Crassulacean acidic metabolismo*
CARD/NOD	*Nucleotide-binding oligomerization domain*
CC	*Coil-coil*
CEBiP	*Chitin elicitor binding protein*
CCC	Confederación Colombiana de Caucho
CCR4	*Chemokine receptor type 4*
cDNA	*Deoxyribonucleic acid copy*
cDNA-AFLPs	*Deoxyribonucleic acid copy - Amplified fragment length polymorphism*
Ced3	*Cell death protein*-3
CIRAD	Centre de Cooperation Internationale en Researche Agronomique pour le Développement
CMB	CIRAD-Michelin-Bahia
CMV	*Cucumber mosaic virus*
CPN 60-2	*Chaperonine*
C_p	*Crossing point*
C_T	*Threshold Cycle*
DE	Densidad de estromas
DEPC	*Diethyl pyrocarbonate*
DL	Diámetro de la lesion
DNA	*Deoxyribonucleic acid*
dNTPs	*Deoxynucleotides*
E1	*Ubiquitin-activating enzyme*
E2	*Ubiquitin-conjugating enzyme*
E3	*Ubiquitin-ligase*
ECP-5	*Extracellular protein – 5*
EDS1	*Recistance gene to Peropnospora parasítica*
EDTA	Äcido etilendiaminotetraacético
EFR	*LRR-RLK EF-Tu Receptor*
EIX	*Ethylene-inducing xylanase*
EST	*Expressed sequence tag*
ET	Etileno
ETI	*Effector-triggered immunity*
ETS	*Effector-triggered susceptibility*
FE	Factor de elongación
FLS2	*Flagellin sensing 2*
FX 2261	Clon de *Hevea brasiliensis.* Cruzamientos de la Ford
FX 3864	Clon de *Hevea brasiliensis.* Cruzamientos de la Ford
GB	Gen blanco
GCL009	GT1-Corpoica La libertad del 2009
GF	Gen de referencia

Glc	Glucosa
HCD	*Hypersensitive cell death*
HCN	Ácido cianhídrico
Hpi	Horas posinoculación
HPLC	*High-performance liquid chromatography*
HR	*Hypersensitive response*
IA	Intensidad de ataque
IAN 710	Clon de *Hevea sp*. Instituto de Pesquisas Agropecuarias do Norte
ISGR	*International Rubber Grup*
IE	Intensidad de esporulación
IRES	*Internal ribosome entry site*
ITS	*Internal transcribed spacer*
LPS	*Lipopolysaccharide*
LRR	*Leucine-rich repeat*
MAPKs	*Mitogen-activated protein kinases*
M4	Medio de cultivo para crecimiento de *M. Ulei*
Camps	*Microbe-associated molecular patterns*
MIMPS	*Microbe-induced molecular patterns*
MLA	*Resistance locus to Mildew powdery*
Mrna	*messenger Ribonucleic acid*
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADP-EM	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato – enzima málica
NBS	*Nucleotide binding site*
NCBI	*National center for Biotechnology information*
PAMPs	*Pathogen-associated molecular patterns*
PB 260	Clon de *Hevea brasiliensis* Prang Besar
PCR	*Polymerase chain reaction*
PDA	*Potato dextrose agar*
PR	*Pathogensis related*
PRRs	*Pattern recognition receptors*
PTI	*PAMP trigered immunity*
qRT-PCR	*quantitative Reverse transcription - polymerase chain reaction*
QTL	*Quantitative trait loci*
R	*Resistance gene*
rDNA	*ribosomal Deoxyribonuleic acid*
RFLP	*Restriction fragment length polymorphism*
RGA	*Resistance gene analogs*
RLK	*Receptor-like kinases*
RNA	*Ribonucleic acid*
RNA-seq	*RNA- sequence*
ROS	*Reactive oxigen species*
RP	Resistente parcial
RPM1	*Resistance gene to Pseudomonas syringae*
RPP5	*Recistance gene to Downy mildew*
RPS2	*Resistance gene to Pseudomonas syringae*
RRII	*Rubber Research Institute of India*
RRIM	*Rubber Research Institute of Malasia*
RRIM 600	Clon de *Hevea brasiliensis Rubber Research Institute of Malasia*
RRSL	*Rubber Research Institute of SirLanka*
RT	Resistente total
S	Susceptible
SAGE	*Serial analysis of gene expression*
SALB	*South american leaf blight*
SDS	Sodio dodecil sulfato
SSRH	*Short sequence repeat of Hevea*
STNC	Secretaria Técnica Nacional de Caucho
TDFHb	*Transcript-derived fragments of Hevea brasiliensis*
TDFs	*Transcript-derived fragments*
TE	Buffer Tris-HCl, EDTA
TIGR	*Plant Transcript Assembly*
TIR	*Toll/interleukin-1 receptor*

TL	Tipo de lesion
TLE	Tris-HCl, LiCL, EDTA
Tm	Melting Temperature
TMV	*Tobbaco mosaic virus*
Tris-HCl	Hidroximetil aminometano clorhidrato
UGT	*Glycosiltransferase*

Introducción

El caucho natural es una materia prima considerada como indispensable para nuestra civilización actualmente, su demanda industrial va en aumento al igual que la tendencia de los precios internacionales. Este es producido por diferentes especies vegetales siendo la más importante a nivel comercial el árbol de caucho natural (*Hevea brasiliensis*), ya que produce polímeros de isopreno de elevado peso molecular y sus rendimientos por hectárea son altos, haciendo su cultivo altamente rentable (Mooibroek & Cornish, 2000).

El árbol de caucho es originario del Amazonas y ha sido establecido a lo largo de la zona tropical terrestre, encontrándose las mayores áreas con plantaciones en países asiáticos como Malasia, Tailandia e Indonesia, que proporcionan alrededor del 65% del caucho mundial. Dentro de los países Americanos Brasil y Guatemala son los mayores productores que generan menos del 1% pese a tener suelos y clima aptos (IRSG, 2010). En el caso de Colombia desde el 2002 se ha venido incrementando las áreas de siembra y se espera llegar al establecimiento de 75.000 ha de caucho natural en los próximos años con apoyo del gobierno, cuyo objetivo es abastecer a mediano plazo la industria nacional y el ingreso al mercado internacional a largo plazo (Castellanos *et al*. 2010). Sin embargo, existen algunas limitaciones que han frenado la expansión del cultivo en toda América siendo una de las más importantes la enfermedad denominada mal suramericano de las hojas del caucho o SALB por sus siglas en inglés (Holliday, 1970).

El SALB es causado por el hongo ascomycota *Microcyclus ulei*, el cual es endémico de Centro y Sudamérica y fue inicialmente identificado en árboles de caucho del Brasil en 1904 (Chee & Holliday, 1986). Este ha sido reportado desde el Sureste de México (18º latitud norte) hasta el estado de Sao Paulo en Brasil (24º latitud sur). Se ha identificado como una de las cinco enfermedades más agresivas en plantas y se ha constituido en uno de los mayores inconvenientes para el desarrollo del cultivo de caucho en los países de América Latina (Gasparotto *et al*. 1997). De otro lado, los cultivos establecidos en los países asiáticos caracterizados por presentar altos rendimientos de producción de

caucho, son en su mayoría muy susceptibles a la enfermedad por lo que la aparición de fuentes de inóculo de *M. ulei* en este continente acarraría la devastación de las plantaciones (Edathil 1987).

Para el control de la enfermedad se ha recomendado que el árbol de caucho sea plantado en áreas reconocidas como zonas de escape al SALB, caracterizadas por una estación seca bien definida y un déficit hídrico mayor de 200 mm durante un periodo de cuatro meses. Sin embargo, autores como Gasparotto y Junqueira, (1994), han descrito que existe una alta variabilidad en aislamientos de *M. ulei* independientemente de la región agroclimática donde se encuentren.

El manejo químico de la enfermedad ha sido efectivo a nivel de jardines clonales y vivero, sin embargo a nivel de plantaciones dadas las características de los árboles que sobrepasan los 20 metros de altura, esta forma de manejo se hace no viable. Actualmente la mejor estrategia establecida para solucionar el problema de *M. ulei* por países como Brasil y Francia ha sido la selección y generación de clones resistentes al SALB con alta productividad, mediante programas de mejoramiento genético hasta ahora realizados de manera tradicional y debido de que se trata de un perenne, la obtención de resultados se ha demorado décadas (García *et al*. 2004). Estos programas podrían agilizarse si se tiene un mayor conocimiento molecular de la interacción *M. ulei – H. brasiliensis* y los genes involucrados en ésta.

Los trabajos realizados por el CIRAD en colaboración con grupos de investigación de Brasil (Le Guen *et al.* 2003; Le Guen *et al.* 2007; Lespinasse *et al.* 2000b), han permitido encontrar 8 QTLs asociados a la resistencia al SALB, mediante la evaluación de la F1 del cruce entre el clon RO 38 (híbrido inter-específico entre *H. brasiliensis* x *H. benthamiana)* resistente a algunas razas del hongo y un parental susceptible de *H. brasiliensis* PB 260, inoculado con aislamientos de *M. ulei* con diferente grado de virulencia (Lespinasse *et al.* 2000b). Sin embargo, aun se sabe muy poco de genes asociados con la resistencia y se desconocen factores asociados a patogenicidad del hongo. Este trabajo busca conocer la susceptibilidad de los clones de caucho natural comerciales más importantes del país a aislamientos de *M. ulei* obtenidos de la Orinoquía. Adicionalmente a partir de estos resultados se pretende contribuir al entendimiento molecular de la interacción *M. ulei – H. brasiliensis* mediante el análisis de la expresión diferencial génica de clones de caucho

natural susceptibles y resistentes a un aislamiento de *M. ulei* proveniente de la Orinoquía Colombiana.

Capítulo 1

1. MARCO CONCEPTUAL

PRIMERA PARTE

1.1 Interacción planta patógeno

Las plantas al igual que todos los seres vivos están necesariamente sometidas a la interacción con agentes tanto bióticos como abióticos que los rodean. En el caso particular de los bióticos las plantas han generado interacciones diversas de tipo simbióticas las cuales pueden ser comensales, mutualistas o patogénicas (Lewis 1985), estas últimas causantes de estrés con deterioro morfológico y fisiológico denominado enfermedad.

La enfermedad conlleva la aparición de síntomas en la planta como necrosis, amarillamiento, marchitamiento, enanismo, pudrición o deformaciones, entre otros, que pueden ser causadas por diferentes microorganismos patogénicos como virus, fitoplasmas, bacterias hongos y nematodos. Sin embargo la aparición de una enfermedad no es frecuente ya que no todos los fitopatógenos tienen la capacidad de atacar a todas las especies vegetales incluso a todos los individuos dentro de una misma especie. Las plantas a su vez han generado estrategias que le permiten defenderse de estos.

De manera general se pueden describir dos tipos de interacciones planta-patógeno en función de las respuestas de la planta al ataque del microorganismo. I) Las Interacciones compatibles en la cuáles un patógeno puede establecerse y enfermar a una planta, lo cual ocurre si las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo del

patógeno, si la planta no puede detectar al patógeno y si sus respuestas de defensa activadas son inefectivas, es decir que esta sea susceptible. II) Las interacciones incompatibles en las cuáles no hay aparición de la enfermedad porque se da un fenómeno de resistencia por parte de la planta, la cual puede ocurrir por varios mecanismos 1). Resistencia “no hospedero” en la cual la especie vegetal atacada no le proporciona al patógeno las condiciones necesarias para reproducirse, o posee barreras estructurales preformadas, sintetiza compuestos tóxicos o esta es activada. 2). Mantener la infección confinada tras el reconocimiento del patógeno que está atacando. 3). Condiciones medioambientales inestables que provocan la muerte del patógeno antes de poder colonizar al hospedero (Agrios 2005).

1.2 Inmunidad innata en las plantas

Cuando las plantas son atacadas por un potencial patógeno no adaptado, reacciones de defensa tempranas son activadas localmente con el fin de detener su establecimiento y colonización. La primera línea de defensa es el reconocimiento de estructuras específicas de microorganismos patogénicos como lo son los lipopolisacáridos (LPS), la flagelina y la quitina, los cuales han sido denominados patrones moleculares asociados a patogenicidad (PAMPS) o también descritas como patrones asociados a microbios (MAMPS) ya que esta primera línea no hace distinción entre simbiosis parasíticas o mutualistas (Zipfel & Felix 2005). Esta última implica adicionalmente eventos posteriores al reconocimiento inicial que determinan el nivel de respuesta del hospedero y la diferenciación entre microorganismos patogénicos, comensalistas o mutualistas (Staal & Dixelius 2007). En adición a los MAMPS los patógenos inducen patrones moleculares MIMPS derivados del hospedero como son los productos de degradación celular o proteínas blanco perturbadas por factores de virulencia los cuales son detectados por la planta (Mackey & McFall 2006). A diferencia de algunos animales las plantas solo tienen inmunidad innata pero tienen un impresionante arreglo de detectores de MIMPS e intentan suprimir PAMPs activando la inmunidad despertada o disparada por MAMPS o PTI (Por sus siglas en ingles *PAMP triggered immunity*) (Jones & Dangl 2006). Esta estrategia se basa en el nivel de variantes de la población vegetal y un rasgo singular de resistencia el cual es dependiente de la estructura poblacional del patógeno así como del modo de reproducción. A su vez la condición de estrés generada en un patógeno ante un hospedero que activa un sistema inmune innato es la razón para la evolución y

mantenimiento de la reproducción sexual pese al costo energético (Staal & Dixelius 2007).

El reconocimiento de PAMPS por parte de la planta se lleva a cabo extracelularmente por un tipo de receptores denominados PRRs (*Pattern recognition receptors*) (Zipfel 2008). Se ha encontrado que estos receptores realizan la activación de una cascada de quinasas accionando factores de transcripción WRKY, la acumulación de especies de oxigeno reactivas (ROS) y finalmente la respuesta inmune basal PTI. Sin embargo un sistema inmune más específico ha evolucionado en las plantas en el cual las proteínas denominadas de resistencia (R) reconocen proteínas efectoras del patógeno (Avr) intracelularmente, su mayoría están compuestas por dominios de unión a nucleótidos NBS (*nucleotide binding site*) y dominios LRR (*leucine-rich repeat*) con un dominio N terminal adicional que puede ser CC (*coil-coil*) o TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*). El reconocimiento de efectores del patógeno por parte de las proteínas R implica también producción de ROS y activación de genes de defensa pero difiere cuantitativa y cinéticamente de la defensa basal (Jones & Dangl 2006), usualmente desencadena la muerte celular programada de las células adyacentes a la infección restringiendo el crecimiento del patógeno, la cual es denominada respuesta hipersensible (Hofius *et al.* 2007). Algunos estudios entre los que se encuentra los realizados con la proteína R MLA de cebada que reconoce específicamente a Avr10 de *Blumeria graminis*, han permitido entender un poco el funcionamiento integrado de PRRs y NBS-LRR en la activación de la respuesta inmune de las plantas, en donde se sugiere que PTI es reprimida por factores de transcripción WRKY y MLA interfiere con esta actividad desreprimiendo PTI (Shen *et al.* 2007).

Uno de los modelos que describe la forma de acción del sistema inmune de las plantas contra el ataque de patógenos, es el propuesto por Jones y Dangl, (2006) denominado zig-zag el cual tiene en cuenta la co-evolución de los patosistemas. Este es representado en cuatro fases: en la primera MAMPs son reconocidos por proteínas PRRs permitiendo la activación de PTI, la cual es capaz de detener la colonización. En la fase dos algunos patógenos logran evadir el reconocimiento inicial y reprimen PTI, desplegando efectores que contribuyen a la virulencia y hacen efectivo el ataque desencadenando ETS (*effector-triggered susceptibility*). En la fase tres un efector determinado del patógeno es reconocido directa o indirectamente por una de las proteínas NBS-LRR resultando en la

activación de ETI (*effector-triggered immunity*). Esta es una PTI amplificada y acelerada que resulta en resistencia contra la enfermedad, obteniéndose usualmente HR (*hypersensitive response*) en el sitio de la infección. En la fase cuatro la selección natural favorece la aparición de patógenos capaces de evitar ETI, ya sea por diversificación del efector reconocido o mediante la adquisición de efectores adicionales que suprimen ETI. A su vez la selección natural favorece la generación de genes R permitiendo que ETI pueda ser activada nuevamente.

1.3 Proteínas PRR

Las proteínas PRRs se clasifican dentro de la clase de receptores transmembranales quinasa o receptores transmembranales de unión a proteína. Estos últimos aparentemente carecen de dominios de señalización internos (Zipfel *et al*. 2008). Estas generalmente están constituidas por un dominio extracelular LRR y un dominio quinasa intracelular (RLK). La familia de receptores quinasa ha tenido una enorme expansión en plantas, por ejemplo en *Arabidopsis thaliana* se encuentran cerca de 610 miembros de los cuales algunos están implicados en la respuesta a estrés biótico (Lehti-Shiu *et al.* 2009).

La proteína PRR más estudiada en plantas es el receptor para flagelina FLS2 (*Flagellin sensing 2*) de *A. thaliana* que reconoce un epitope bacteriano de 22 aa, su dominio LRR está constituido por 28 repeticiones el cual es el responsable del reconocimiento. Se han encontrado genes ortólogos a FLS2 en tomate, sin embargo el sitio de reconocimiento para flagelina es diferente (Chinchilla *et al.* 2006). Se han descrito otros receptores PRR como es el caso de la proteína EFR (*LRR-RLK EF-Tu Receptor*) que reconoce el factor de elongación Tu el cual está implicado en la traducción de mRNA bacteriano y es reconocido como un PAMPs en *A. thaliana* y otros miembros de la familia *Brassicaceae* (Kunze *et al.* 2004). Recientemente se encontró que el receptor Xa21 de arroz que se consideraba proveía resistencia raza específica contra *Xanthomonas oryza* (Wang *et al.* 1998) actúa como una PRR para una nueva proteína bacteriana Ax21 (Dodds & Rathjen 2010).

Se han encontrado proteínas PRRs que reconocen PAMPs de hongos como es el caso de LeEIX1 and LeEIX2 de tomate que permiten la percepción de EIX (*ethylene-inducing xylanase*) (Ron & Avni 2004) y la proteína CEBiP (*chitin elicitor binding protein*) descrita en arroz con alta afinidad al enlace β-1,4 del polímero N-acetilglucosamina que es el

mayor componente de la pared celular fúngica. Esta es una glicoproteina de membrana con dos motivos LysM encargados del reconocimiento (Shimizu *et al.* 2010).

1.4 Proteínas R

La mayoría de genes que codifican para proteínas R se encuentran agrupados en clusters dentro del genoma, aumentando la posibilidad de procesos de cambios de secuencias, conversiones, entrecruzamiento de genes y recombinación, a los ocurridos con loci simples de genes singulares. Lo cual contribuye a la generación continua de nuevos alelos de resistencia (Eckardt 2007) y explica la presencia de complejos multiloci en algunas especies vegetales como la familia Cf-4/9 en tomate (Parniske *et al.* 1997) y RPP13 en *A. thaliana* (Rose *et al.* 2004) entre otros.

Se han descrito diferentes clases de proteínas R las cuales pueden ser divididas en 8 grupos basados en la organización de sus motivos de aminoácidos y localización de dominios en la membrana (Gururani *et al.* 2012). El primer y segundo grupo corresponden a proteínas NBS-LRR que son los más extensos y se describirán posteriormente. El tercer grupo corresponde a proteínas que carecen del motivo NBS, presentan un dominio extra citoplasmático LRR (eLRR) y un dominio de unión a membrana (TrD), un ejemplo de este grupo son las proteinas Cf (Cf-9, Cf-4 y Cf-2) de tomate que le confieren resistencia contra *Cladosporum fulvum* (Joosten & De Wit 1999). La cuarta clase corresponde a proteínas un dominio extracelular LRR, un dominio TrD y un dominio intracelular serin-treonin-quinasa como Xa21 de arroz (Wang *et al.* 1998). La quinta clase de genes R contiene un dominio extracelular putativo celular LRR junto con un dominio PEST (Pro-Glu-SEr-Thr) para degradación de proteínas como es el caso de Ve2 de tomate y un motivo proteico corto (ECS) como en Ve1 y Ve2 (Thomma *et al.* 2011), sin embargo recientemente estas al igual que Xa21 se han propuesto como proteínas PRR.

La proteína RPW8 de *A. thaliana* es un ejemplo del grupo seis, estas presentan un dominio TrD fusionado a un dominio CC. El grupo siete está conformado por nuevo grupo de proteínas del tipo TIR-NBS-LRR las cuales tienen adicionalmente en el carboxi terminal un dominio de señal de localización nuclear NLS (*nuclear localization signal*) y unido a este un dominio WRKY (Wang *et al.* 2009). El grupo ocho corresponde a las

proteínas R que no poseen dominios del tipo NBS o LRR, un ejemplo es la proteína Hm1 de maíz que confiere resistencia contra el tizona de la hoja del maíz causado por el hongo *Cochliobolus carbonum* (Johal & Briggs 1992).

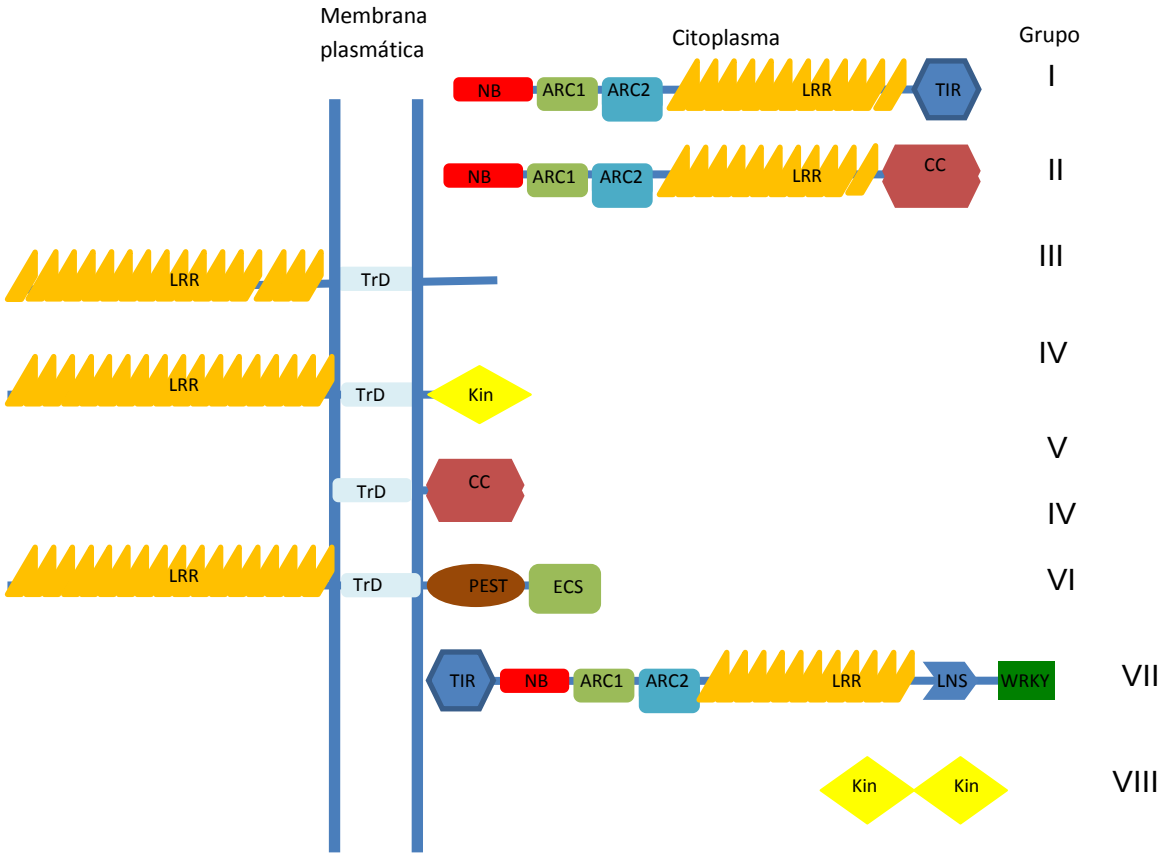


Figura 1-1. Esquema de proteínas R presentes en especies vegetales basado en arreglamientos de dominios funcionales. Dominios**: TIR** (*Toll/interleukin-1 receptor*)**, CC** (*coiled coil*)**, NB** (*nucleotide binding*)**, ARC1/2 , LRR** (*leucine rich repeat*)**, PEST** (*Protein degradation domain (proline-glycine-serine-threonine*); **ECS** (*Endocytosis cell signaling domain*); **NLS** (*Nuclear localization signal*)**, TrD** (*transmembrane*)**, Kin** (*kinase*)**, WRKY** *(WRKY transcription factor*) (Diagrama adaptado de Tameling & Takken, 2008 and Gururani *et al*. 2012).

Las proteínas R detectan patógenos específicamente que son capaces de neutralizar la respuesta activada vía PAMPS, reconocen directamente una proteína Avr de acuerdo al modelo gen por gen postulado por Flor, (1971). Sin embargo, se han descrito muy pocos casos de esta interacción directa, a pesar de esto se ha encontrado que variedades susceptibles es decir carentes del gen R en presencia de un avr expresan al máximo signos y síntomas, a diferencia de las variedades que expresan el correspondiente gen

R, lo cual implica un reconocimiento de la función de los efectores del patógeno a través de la detección de perturbaciones o modificaciones de blancos específicos del hospedero. Este modelo de reconocimiento ha sido denominado hipótesis del gen guardián (Dangl & Jones 2001) el cual plantea que: 1) las proteínas R forman parte de un complejo multiproteico el cual incluiría proteínas blanco de factores de virulencia. 2) Las proteínas Avr serian factores de virulencia con una o más proteínas blanco, 3) La perturbación de las proteínas blanco puede o no ser requerida para la virulencia. 4) La perturbación podría o no ser requerida para la activación de las proteínas R y finalmente 5) Algunas proteínas acompañantes unidas a las proteínas R de manera constitutiva podrían ser disociadas por la presencia de efectores para formar nuevas interacciones que permitirían la activación (Belkhadir *et al.* 2004).

La evidencia de esta hipótesis ha sido bien caracterizada en *A. thaliana* con el descubrimiento de RIN4. Esta es una proteína que interactúa físicamente con las proteínas R (NBS-LRR) RPM1 y RPS2 a nivel de membrana plasmática, es fosforilada por los efectores AvrB y Avrpm1 secretados al hospedero por *Pseudomonas siringae* durante la infección mediante el sistema de secreción tipo III. RIN4 también interactúa con Avrpt2 que es un efector del tipo cistein-proteasa el cual causa la desaparición postranscripcional de esta. La sobreexpresión de RIN4 bloquea a AvrRpt2-dependiente de RIN4 y la activación de RPS2. La desaparición de RIN4 conlleva a la activación de RPS2 desencadenando la respuesta de resistencia, de esta forma actúa como un regulador negativo de la respuesta de defensa (Mackey *et al.* 2003). Otro ejemplo es el clivaje realizado sobre PBS1 por parte de AvrPphB una cisteína proteasa de *P. syringae pv*. Tomato, la cual permite la activación de RPS5 (gen guardian) mediando la respuesta de resistencia. Recientemente se ha encontrado que AvrPphB se une a PBS1 clivandola y permitiendo la activación de RPS5, indicando que esta puede censar la integridad de PBS1 (Shen *et al.* 2002).

El modelo gen guardián crea un problema evolutivo, en el caso de RIN4 este evoluciona en ausencia de RPM1 y RPS2 para evadir la unión con la proteína efectora, pero en su presencia se favorecería la unión al efector para promover el reconocimiento (Dodds & Rathjen 2010). Para resolver este problema evolutivo se ha propuesto un nuevo modelo denominado señuelo (van der Hoorn & Kamoun 2008) en el cual hay duplicación del gen blanco del efector que evoluciona de manera independiente y permite flexibilizar las

restricciones evolutivas resultando en una proteína señuelo la cual sería la única involucrada en la percepción del efector.

Este modelo permite explicar la acción del proteína Pto de tomate que confiere resistencia a *P. syringae* mediante el reconocimiento del efector AvrPto el cual inhibe la actividad quinasa y bloquea la actividad de FLS2 y EFR. Adicionalmente se sabe que para el reconocimiento de AvrPto requiere la presencia de Prf (NB-LRR). Se ha encontrado que AvrPto contribuye a la virulencia en tomate y arabidopsis pero no en arabidopsis carente de FLS2 (Xiang *et al.* 2008). Lo anterior indica que FLS2 es un blanco operativo de AvrPto, en el caso de tomate se considera que ortologos de FLS2 y otras RLKs son blanco AvrPto y que Pto sería un señuelo siendo regulado por Prf y su acumulación dependería de esta.

Es importante tener claro que estos modelos son generalizaciones basadas en unos pocos ejemplos concretos, ninguno de los cuales aun se entiende completamente. Así aunque son herramientas conceptuales útiles, es poco probable que describan todos los eventos de reconocimiento de los efectores siendo muy restrictivos (Dodds & Rathjen 2010).

1.4.1 Proteínas NBS LRR

Las proteínas NBS-LRR son un grupo extenso de proteínas con un tamaño entre 860 y 1900 aminoácidos, estas presentan cuatro dominios distintos. Un dominio amino terminal que puede ser CC o TIR, un dominio NBS-ARC, uno LRR y uno carboxi-terminal variable (Tameling *et al*. 2008).

El dominio NBS está relacionado con dominio CARD/NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) de los mamíferos que también cumple funciones en la inmunidad innata. Presenta un sitio de hidrólisis de ATP, es conservado entre las proteínas R y proteínas (Apaf-1) y Ced3 (*cell death protein*-3). Forma parte de un dominio más grande denominado NB-ARC el cual consiste de tres subdominios NB, ARC1 y ARC2 (Tameling *et al.* 2006). El dominio NB de la familia de TIR-NB-LRR es más conservado que el dominio NB de la familia CC-NB-LRR y representa la proteína ancestral de los genes R (Staal and Dixelius, 2007).

Miembros de la familia CC-NB-LRR- y TIR-NB-LRR en plantas han sido asociados a la resistencia contra enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos, nematodos, oomicetes e insectos. En *A. thaliana* se han encontrado 149 genes NBS-LRR divididos entre 92 con un dominio N-terminal TIR, 51 con CC, y seis en los cuales este dominio ha desaparecido (Meyers *et al.* 2002). Las proteínas NB-LRR han sido relacionadas a resistencia contra patógenos biotróficos pero se ha encontrado en *A. thaliana* que pueden conferir resistencia a patógenos con estilo de vida necrotrófico (Staal *et al.* 2006). TIR no ha sido encontrado en monocotiledóneas y recientemente mediante el análisis del genoma de *Beta vulgaris* (dicotiledónea) mostró que también carece de estos dominios, indicando que las conclusiones hechas sobre la distribución de motivos de genes R entre monocotiledóneas y dicotiledóneas esta sobre simplificada por la limitada información genómica disponible (Staal and Dixelius, 2007). Los dominios TIR y CC se cree que están involucrados en interacciones proteína-proteína y componentes de la señalización corriente abajo del reconocimiento (Belkhadir *et al.* 2004). TIR, también ha sido relacionado con el reconocimiento específico del patógeno (Ellis *et al.* 1999).

El dominio LRR está formado de motivos individuales xxLxLxx que se repiten y forman estructuras beta-plegadas. Las repeticiones van desde 8 a 25 en el caso de *A. thaliana*, pero en otras especies este número puede ser más alto. Están asociados a interacciones proteína-proteína y unión a ligandos jugando un rol importante en el reconocimiento de las moléculas efectoras del patógeno y especificidad de la resistencia (Jones & Jones 1997).

1.4.2 Regulación de proteínas NBS-LRR

Las proteínas R tienen el potencial de activar la muerte celular programada por lo que necesariamente tienen que ser altamente reguladas, se ha identificado una regulación por autoinhibición en ausencia del patógeno. Estudios de interacción y mutagénesis en dominios LRR y NBS-ARC han permitido identificar que los amino terminal de ambos están involucrados en esta autoinhibición (Takken *et al*. 2009).

Como se mencionó anteriormente, el reconocimiento de los efectores por parte de las proteínas R puede ser directo o estas pueden interactuar con factores del mismo hospedero producto de la presencia de los efectores del patógeno (Dangl & Jones 2001), como un guarda censando perturbaciones dentro del hospedero. El reconocimiento del

efector requiere necesariamente la unión a nucleótidos [ADP/ATP]. En estudios realizados en la proteína de resistencia I de tomate se encontró que mutantes con la capacidad de hidrólisis de ATP disminuida y uniones altas de ADP a las proteínas R, presentan la activación constitutiva de la defensa (Tameling *et al.* 2006). Estos resultados permitieron plantear que las proteínas R son controladas mediante la unión a nucleótidos que actúan como un switch, en este modelo la unión de ADP a la proteína R representa el OFF y la unión de ATP representa el ON. El reconocimiento de un efector acciona un cambio conformacional que resulta en un estado abierto intermediario que permite al ADP ser cambiado por un ATP. Con el ATP unido a la proteína R esta adopta su conformación activa. La Posterior hidrólisis del ATP permite a que esta sea auto-inhibida (estado OFF), (Takken & Tameling 2009).

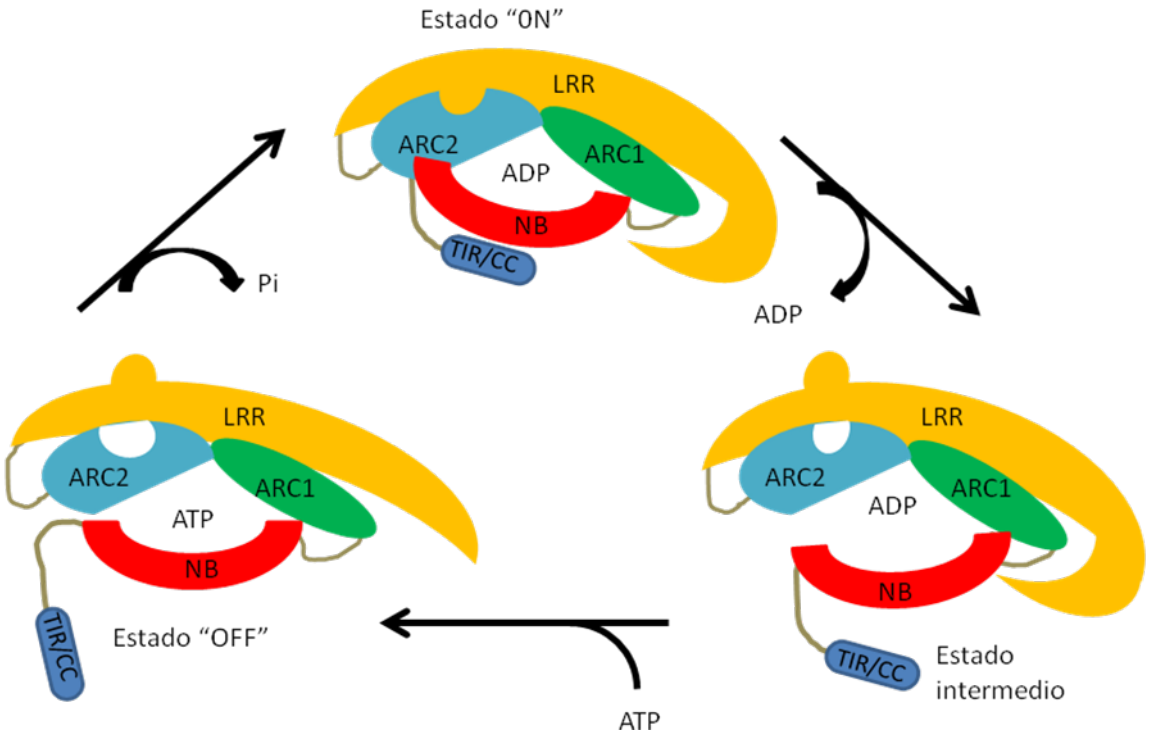


Figura 1-2 Modelo de activación de las proteínas NB-LRR (adaptado de Takken & Tameling 2009).

Estudios realizados en el locus RPP5 de *A. thaliana* conformado por siete genes diferentes TIR-NBS-LRR muy similares entre sí, mostraron que la expresión de estos obedece a una regulación coordinada a través de la retroalimentación entre dos mecanismos, una activación positiva postranscripcional y una negativa mediante silenciamiento por RNA (Eckardt 2007). Estos genes están intercalados con tres

secuencias relacionadas y dos genes que no son R (Noel *et al.* 1999) y se ha demostrado que confieren resistencia a diferentes hongos y bacterias patógenas.

Se sabe que el silenciamiento por RNA juega un rol importante en el sistema de defensa de las plantas contra el ataque de virus, mediante el silenciamiento postrancripcional de genes virales el hospedero limita la replicación y diseminación de este y a su vez se ha encontrado que algunos virus patogénicos son supresores del mecanismo de silenciamiento (Vance & Vaucheret 2001). También se ha descrito resistencia a bacterias mediante silenciamiento mediado por RNA (Katiyar-Agarwal *et al.* 2007). En el caso de la regulación negativa del locus RPP5, se ha encontrado síntesis de RNAs pequeños (21 a 24 nucleótidos) provenientes de secuencias similares a RPP5 que pueden formar RNAs de doble cadena y silenciar postrascripcionalmente los genes. Mutantes con el mecanismo de silenciamiento por RNA defectuoso, aumentan la transcripción de genes del locus (Eckardt, 2007).

1.5 Eventos de señalización y respuesta del sistema inmune

Posterior a los eventos moleculares de reconocimiento entre el patógeno y el hospedero, las plantas activan su respuesta inmune bien sea PTI o ETI utilizando diferentes vías de señalización las cuales se correlacionan (Tiffin & Moeller 2006). Estas han sido identificadas y caracterizadas particularmente en *A. thaliana*. Una comprende la señalización a través de MAPKs (mitogen-activated protein kinases). Las rutas de MAPK son componentes ubicuos de la transducción de señales en eucariotes, actúan en la transferencia de señales desde receptores ubicados en el exterior celular hasta la respuesta de esta. Las cascadas MAPK consisten de una MAPK quinasa-quinasa (MAPKKK), la cual fosaforila una MAPK quinasa (MAPKK), que a su vez fosforila una MAPK. Estas rutas regulan la actividad de varios sustratos semejantes a factores de transcripción y proteínas quinasa (Pitzschke *et al.* 2009). La cascada MAPK que actúa corriente debajo de la percepción de flagelina compromete las MAPKKs MKK4 y MKK5 corriente arriba de las Mapas MPK3 and MPK6, permitiendo la activación de factores de transcripción WRKY y culmina en la activación de los genes de defensa (Suarez-Rodriguez *et al.* 2007).

Otra ruta de señalización es activada por algunas proteínas citoplasmáticas R que involucra proteínas EDS1, PAD4, ácido salicílico (AS), NPR1 y WRKY (Durrant & Dong

2004). Sin tener en cuenta la vía de señalización activada en la detección o ataque del patógeno, la respuesta de defensa puede resultar en muerte celular programada, e incluye un flujo rápido de iones calcio al interior de la célula, liberación de ROS y sobreexpresión de proteínas relacionadas a patogénesis (PR), incluyendo quitinasas, β-1,3 glucanasas, inhibidores de proteasas y proteínas de transferencia de lípidos, muchas de las cuales tienen actividad biocida. Las PR y las otras proteínas asociadas a inmunidad son también sobreexpresadas como parte de la defensa basal en respuesta a estrés abiótico o expresadas constitutivamente en algunos tejidos (van Loon *et al.* 2006). Sin embargo, actualmente el conocimiento acerca de las vías de señalización que se desencadenan corriente debajo de la activación de las proteínas PRR y R es parcial.

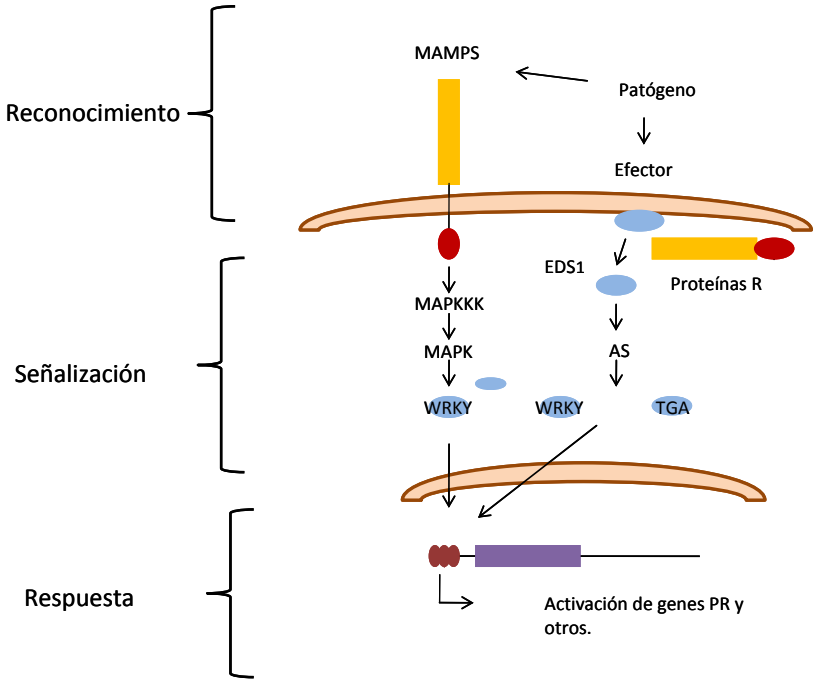


Figura 1-3 Esquema de la activación de la respuesta de defensa en *A thaliana*, activación por sobreexpresión de genes R (adaptado de Tiffin & Moller, 2006).

Algunas de las respuestas de la planta corriente abajo de PTI y ETI son mejor entendidas que las rutas de señalización, por ejemplo las rutas hormonales del AS y AJ (Acido jasmónico) – ET (etileno) las cuales son importantes reguladores de la expresión génica (Bari & Jones 2009). Estas dos rutas son antagónicas en cierta medida, el AS se

ha asociado con resistencia a patógenos biotróficos y AJ con resistencia a patógenos necrotróficos e insectos masticadores. Sin embargo, aunque existen diferencias sustanciales en las respuestas de expresión génica de estas vías y se han encontrado varios genes que actúan como marcadores específicos para la activación de cualquiera, se ha encontrado una considerable superposición entre estas. Estudios en mutantes múltiples en diferentes rutas mostró que en PTI las rutas de AS y AJ-ET son sinérgicas amplificando la respuesta. Esto puede explicar el por qué muchos efectores son capaces de suprimir PTI mediante la interacción con diferentes blancos; ya que la señal en sí es relativamente débil y el bloqueo de uno de los componentes es suficiente para perturbar sustancialmente la respuesta. A diferencia ETI es una repuesta fuerte e involucra actividad redundante de las rutas del AS y AJ-ET. En ausencia de señalización del AS la ruta del AJ-ET contribuye a mantener un buen nivel de resistencia (Dodds & Rathjen 2010).

A pesar de que se conoce en alguna medida el cambio de la expresión génica durante la activación de ETI y PTI aun no es claro que cambios principales conllevan a la restricción del crecimiento del patógeno. Se han realizado estudios que han permitido entender algunas de las respuestas específicas contra la invasión de patógenos, es el caso de las proteínas PEN2 y PEN3 en *A. thaliana* que están involucradas en la prevención de la penetración del hongo *Erysiphe cichoracearum* causante del mildeo polvoso. Se encontró que PEN2 es una enzima hidrilítica que produce glucosilanato a partir de un precursor inactivo y PEN3 es un transportador ABC que parece estar envuelto en la secreción de esta molécula en el sitio del ataque. Estas también son requeridas para la deposición de calosa en el sitio de la infección restringiendo el haustorio (Clay *et al.* 2009). Otros genes como Lr34 de trigo, que ha sido ampliamente utilizado en la agricultura debido a que confiere resistencia de amplio espectro contra roya, así como el moho polvoriento, también codifica para un transportador ABC (Krattinger *et al.* 2009).

1.6 Patógenos de las plantas

Los patógenos microbianos usualmente son clasificados en dos grandes grupos, los necrotróficos que después de colonizar causan la muerte del hospedero y los biotróficos los cuales se alimentan del hospedero vivo (Agrios 2005). Sin embargo, la distinción entre estos dos grupos es a veces no muy clara ya que hay patógenos que en el estado

inicial de la infección se comportan como biotróficos y posteriormente generan necrosis, a este grupo se le ha denominado patógenos hemibiotróficos (Perfect & Green 2001).

Inicialmente se estableció que los microorganismos biotróficos a diferencia de los necrotróficos, activan la muerte celular programada de la planta hospedero por reconocimiento de los efectores del patógeno mediante una proteína R (Dangl & Jones, 2001). Hoy se sabe que los organismos necrotróficos alteran la bioquímica de la célula de una manera similar a como lo realizan los biotróficos (Oliver & Solomon 2010).

1.6.1 Efectores microbianos

Los efectores microbianos son generalmente proteínas pequeñas secretadas al apoplasto o en la superficie de la pared de la célula hospedero, también estos pueden ser introducidos al citoplasma de la célula mediante estructuras especializadas que penetran la pared celular como es el caso de sistema de secreción tipo III en bacterias, haustorios en el caso de hongos, oomicetes y plantas parasíticas o estiletes en el caso de nematodos (Pritchard & Birch 2011). Los efectores son los principales elementos que producen los microorganismos para manipular la bioquímica de la planta (Chisholm *et al.* 2006), sin embargo aun se desconoce la mayoría de dianas de estos en la célula hospedero. Algunos son hospedero específico y de manera colectiva son esenciales para patogenicidad pero individualmente no, esta especificidad de reconocimiento depende de la composición del efector del patógeno invasor y de la proteína R del hospedero que puede haber sufrido variantes como mutaciones (Pritchard & Birch, 2011). A diferencia de los genes R de las plantas que son conservados en las diferentes especies vegetales los efectores son muy diversos tanto en estructura como en función (Kamoun 2007).

De manera general los efectores junto con moléculas pequeñas denominadas fitotoxinas que son introducidas por un microorganismo, interactúan con componentes de las rutas de señalización del hospedero perturbandolas y potencialmente generando un nuevo comportamiento bioquímico de este.

Algunos efectores actúan fuera de la célula huésped y otras moléculas pequeñas secretadas que se difunden libremente tales como la coronatina son capaces de modificar la bioquímica de la planta y por lo tanto pueden considerarse efectores pese a no ser proteínas (Slawiak & Lojkowska 2009). De otro lado las proteínas Avr son usualmente consideradas un subset de efectores las cuales como se sabe son

reconocidas por las proteínas R del hospedero generando resistencia. Sin embargo las proteínas Avr ACE1 de *Magnaporte oryzae* y AvrD de *P. syringae* son metabolitos secundarios que actúan como determinantes de avirulencia mas que como efectores (Midland *et al.* 1993; Valent & Khang 2010).

1.6.1.1 Efectores de hongos

Los efectores fúngicos pueden ser extracelulares los cuales son secretados dentro del apoplasto o el xilema de la planta y los efectores citoplasmáticos que son translocados dentro de la pared de la célula vegetal (Stergiopoulos & DE WIT 2009). El único efector fúngico conocido que no es secretado es ACE1 de *Magnaporthe grisea* el cual se ha asociado a la biosíntesis de un metabolito secundario no conocido el cual si es secretado (Bohnert *et al.* 2004). A pesar del bajo grado de conservación entre los efectores fúngicos, la mayoría corresponden a proteínas pequeñas translocadas dentro del huésped por mecanismos aun no muy claros, que involucran una secuencia señal (Stergiopoulus & De Wit 2009). Sin embargo, se han descrito efectores como el Avra10 and Avrk1 of *B. graminis* f. sp. Hordei que carecen de esta (Ridout *et al.* 2006).

Los efectores extracelulares son a menudo procesados en su extremo amino terminal o carboxi terminal por parte de proteasas de las plantas o fúngicas. La evidencia de este proceso de maduración en algunos casos está basado en predicciones *in silico* (Stergiopoulus & De Wit 2009). La validación experimental de secreción y procesamiento de efectores fúngicos se ha realizado en los efectores Avr y ECP de *C. fulvum* (Wit *et al.* 2009), efectores de *F. oxysporum* f. sp. Lycopersici y los efectores Nip de *R. secalis* (Wevelsiep *et al.* 1991).

Para el caso del efector Avr-Pita de *M. grisea* se ha predicho que es una proteína secretada y procesada, basados en que la proteína madura está constituida por 176 aa en tanto que la proteína secretada tiene un tamaño de 223 aa, la forma activa Avr-Pita$_{176}$ interactúa directamente con la proteína R Pi-ta, esta interacción ha sido demostrada a través de ensayos de doble híbrido (Jia *et al.* 2000).

Otra característica común en los efectores extracelulares así como la de los citoplasmáticos, es la presencia de residuos de cisteína que pueden estar envueltos en la formación de puentes disulfuro que proveen estabilidad en ambientes ricos en proteasas como lo es el apoplasto del hospedero. Análisis mutacionales en Avr4 y Avr9 de *C. fulvum*

han mostrado que estos residuos son requeridos para la estabilidad así como actividad de los efectores (Wit *et al.* 2009). Sin embargo estudios realizados en proteínas ECPs muestran que no todos los residuos de cisteína son necesarios para estabilidad así como en la inducción de HR en plantas que tienen proteínas R Cf-ECP (Wit *et al.* 2009).

SEGUNDA PARTE

1.7 El caucho natural

El caucho natural es un polímero de poliisopreno de origen vegetal, el cual se ha encontrado en aproximadamente 2500 especies (Polhamus 1962). Actualmente es usado en la producción de más de cuarenta mil productos dentro de los que se cuenta 400 dispositivos médicos (van Beilen & Poirier 2007), convirtiéndose en uno de los biopolímeros más importantes del cual depende la civilización humana moderna. Sus propiedades físico-químicas como resilencia, elasticidad, resistencia a la abrasión, eficiente dispersión del calor, resistencia al impacto y maleabilidad a bajas temperaturas no han podido ser remplazadas por el caucho sintético de origen petroquímico u otros biopolímeros como los PHA producidos por bacterias (Cornish 2001; Mooibroek & Cornish 2000).

A nivel comercial *H. brasiliensis* (conocido como árbol de caucho natural) es la especie vegetal más importante que se cultiva para obtener caucho natural por su alto contenido y calidad, ya que es una de las pocas especies en producir polímeros de elevado peso molecular (Backhaus 1985) y clones de alto rendimiento con los que se llega a obtener más de dos toneladas de caucho seco ha/año. Este árbol es originario de Suramérica y se siembra desde México hasta Brasil, pero las áreas más extensas de cultivos se ubican en algunos países tropicales asiáticos. El caucho natural es extraído mediante el rayado de la corteza de los árboles que se encuentran en producción, lo cual conlleva a la ruptura de las vasos laticíferos y permite la salida de una emulsión denominada látex que contiene partículas de poli-isopreno entre un 35 y 45% además de otros componentes como agua proteínas y azúcares (Chrestin *et al.* 1997).

El caucho natural se ha mantenido competitivo frente al caucho sintético a pesar del precio y las ventajas de este último como poca alergenicidad, se estima que alrededor del 40% del consumo mundial de caucho corresponde al caucho natural (Baudouin *et al.*

1997). Actualmente los países con mayor área sembrada son Indonesia con 3.515.000 ha, Tailandia con 2.314.000 ha, y Malasia con 1.218.000 ha, los cuales producen alrededor de 6.000.000 toneladas/año que corresponde al 70% de la producción total de caucho natural en el mundo (Tabla 1-1). Los mayores consumidores son China con 3.697.000 toneladas y Estados Unidos con 1.090.000 toneladas, el resto de producción es consumida por otros países (Tabla 1-2). Se observa que todo el caucho que se produce es consumido y de acuerdo con las proyecciones realizadas se estima un incremento de la áreas de 903.000 ha para el 2020 que permitirán suplir un consumo proyectado de 11.396.000 toneladas (IRSG 2010). Adicionalmente el precio de la tonelada por año ha ido en aumento (Tabla 1-3), para el 2010 se llegó a un valor de 3.750 dolares, haciendo este cultivo altamente rentable.

En Colombia desde el 2002 se ha incrementado el área de siembra de *Hevea spp*. en 3.928 ha por año, actualmente el país cuenta con 29.917 ha y se proyecta para los próximos años llegar a 75.000 ha (CCC 2011). Sin embargo, solamente un pequeño porcentaje se encuentra en producción que para el 2010 produjeron alrededor de 3.300 toneladas/ha con un precio de 5800 pesos por Kilo de caucho seco. Colombia consume alrededor de 16.895 toneladas de caucho natural (Castellanos *et al.* 2010), lo que implica alrededor del 80% de caucho requerido es importado. Se espera en los próximos años suplir la demanda interna de caucho cuando las plantaciones establecidas recientemente entren en producción, y se le apunta a la exportación de esta materia prima con los nuevos cultivos que se establecerán en los próximos años.

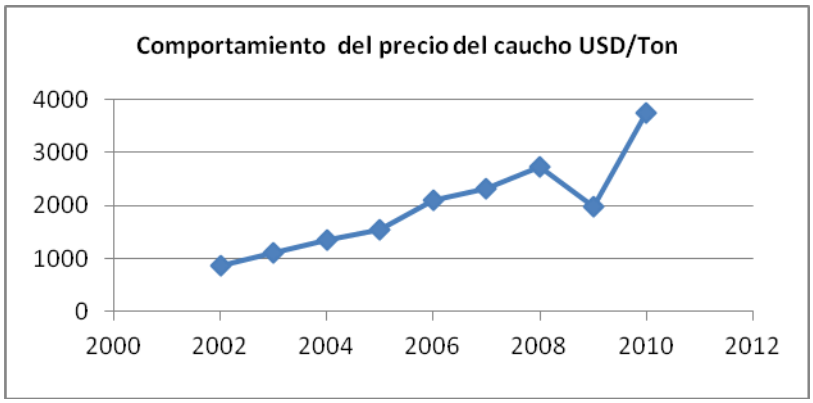
Tabla 1-1.Países con mayor área sembrada de caucho natural y producción mundial de caucho seco para el 2010, (IRSG, 2010).

AREA SEMBRADA		**PRODUCCION DE CAUCHO SECO POR ha**	
País	**ha en miles**	**País**	**Toneladas en miles**
Tailandia	2.314	Tailandia	2.993
Indonesia	3.515	Indonesia	2.107
Malasia	1.218	Malasia	895
India	692	India	821
Vietnam	715	China	654
China	899	Vietnam	691
Sr Lanka	112	África	472
Cambodia	132	América Latina	264
Filipinas	148	Otros	365
Myanmar	498		
Laos	250		
TOTAL	**10.493**		**9.262**

Tabla 1-2 Países con mayor consumo de caucho natural para el 2010 (IRSG 2010).

País	Toneladas en miles
China	3.697
Estados Unidos	1.090
Japón	581
Alemania	353
Corea	160
Indonesia	321
Malasia	566
Tailandia	315
India	493
Brasil	348
Otros países	2.104
Total	**10.028**

Gráfica 1-1. Comportamiento del precio del caucho natural en los últimos años.



El cultivo del árbol de caucho en el país se está desarrollando en cinco núcleos heveicolas que corresponden al Magdalena medio, Cordón cauchero cacaotero (Sur de Córdoba y Norte de Antioquia), Orinoquía, Amazonía y Magdalena centro. Actualmente los departamentos con mayor área sembrada son Meta y Santander con cerca del 50% de total establecido en el país. Hasta el momento el mayor productor es Caquetá que ha sido el departamento con mayor tradición en el cultivo del caucho del país con un modelo de agremiación de pequeños productores llamada ASOHECA, sin embargo las nuevas plantaciones establecidas en otros departamentos superarán en producción a este en los próximos años teniendo un gran impacto el departamento del Meta (Tabla 1-3).

Tabla 1-3. Área sembrada y producción en toneladas de caucho natural por departamento para el 2010 de acuerdo al Censo Nacional Cauchero (CCC 2011). *Departamentos incluidos por primera vez.

Departamento	Hectáreas sembradas	Producción (ton)	*Departamento	Hectáreas sembradas
Antioquia	2.577	240	Arauca	67
Bolívar	328	No Reporta	Boyacá	108
Caldas	1.385	105	Choco	218
Caquetá	4.310	1.375	Huila	5
Casanare	118	No Reporta	Quindío	2
Cauca	120	11	Valle	9
Cesar	318	No Reporta	**Total parcial**	**409**
Córdoba	1.378	No Reporta		
Cundinamarca	834	33		
Guaviare	844	40		
Magdalena	40	No Reporta		
Meta	9.998	770		
Nariño	167	No Reporta		
N. Santander	165	No Reporta		
Putumayo	436	25		
Santander	5.611	668		
Tolima	179	40		
Vichada	347	No Reporta		
Total parcial	**29.508**	**3.307**	**Total global**	**29.917**

1.8 El árbol de caucho natural

El género *Hevea* es originario del Amazonas el cual está ubicado dentro de la familia *Euphorbiaceae*, en este género se han descrito 10 especies: *H. benthamiana* Muell -Arg, *H. brasiliensis* (willd) Muell-Arg, *H. camargoana* Pires, *H. camporum* Ducke, *H. guianensis* Aubl, *H. Micropylla* Ule, *H. nítida* Mart. Ex Muell -Arg, *H. pauciflora* (Spruce ex Benth) Muell-Arg, *H. rigidifolia* (Spruce ex Benth), *H. spruceana* (Spruce ex Benth), (Compagnon 1998). Todas las especies producen látex en cantidad y calidad variables, sin embargo las más importantes por la cantidad y calidad son *H. brasiliensis* y *H. benthamiana.* Algunas de las otras especies incluida *H. benthamiana* han sido utilizadas como fuente de genes para el mejoramiento de *H. brasiliensis*, especialmente contra enfermedades (Alvarenga & do Carmo 2008). La distribución nativa del género cubre alrededor de 6 millones de Km^2 abarcando territorio de Venezuela, Colombia, Ecuador Perú, Bolivia, las Guyanas y Brasil. La especie con mayor área de distribución es *H. brasiliensis* y la de menor es *H. guinensis*, se ha considerado la región del alto Rio Negro en Brasil como su centro de diversidad (Compagnon, 1998).

Todas las especies tienen 36 cromosomas (2*n*=36x =9). *H. brasiliensis* se comporta como amphidiploide (Ong 1979). Sin embargo este argumento se discute a nivel molecular ya

que se ha encontrado en estudios de hibridización *in-Situ* dos distintos loci de la regiones de rDNA 18S-25S, y un locus de la región 5S que sugieren un posible origen alotetraploide con pérdida de una región 5S durante la evolución. Sin embargo, aun no se conoce un posible ancestro del género 2n=18, por lo que actualmente se considera al árbol de caucho como un amphidiploide. Se han considerado las especies como complejas ya que no existen barreras de hibridización entre estas (Priyadarshan & Goncalves 2003).

Los requerimientos básicos climáticos para el árbol de caucho son de 1000 a 3000 mm de lluvia, distribuidos entre 100 a 150 días al año, la temperatura entre 20 y 28 ^{o}C con una variación diurna de 7^{o}C y luminosidad de 2000 ha/año distribuida en 6 h diarias durante todos los meses. En condiciones nativas el árbol se encuentra hasta los 200 m sobre el nivel del mar, pero el cultivo puede establecerse hasta los 1200 m (Priyadarshan & Goncalves, 2003).

Hacia 1913 Brasil era considerado como el mayor productor de caucho natural en el mundo, el cual era obtenido de árboles nativos que crecían en la cuenca de río Amazonas, sin embargo el material introducido por WicKman en 1876 en el sudeste asiático permitió gradualmente a esta región convertirse en la mayor productora generando más del 90% del caucho mundial (Oghenekome 2004). Programas de mejoramiento genético mediante selección masal realizados por: Rubber Resaearch Institute of Malasia (RRIM), Rubber Research Institute of India (RRII), Rubber Research Institute of SirLanka (RRSL) y Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) de Francia, permitieron la liberación de clones élite con alto rendimiento que pasaron de producir 650 Ton/ha/Año de látex a 2000 Ton/ha/Año para 1920 (Series RRIM-700) y entre 1950 y 1990 a 2500 Ton/ha/Año (series RRIM 2000). En el caso de América durante las primeras décadas se realizaron varios intentos de establecimiento de plantaciones con clones de alto rendimiento provenientes de Asia, sin embargo estas no tuvieron éxito debido a la alta susceptibilidad de los clones a la enfermedad denominada Mal suramericano de las hojas del caucho (Candelo & Motta 1996).

1.9 Mal suramericano de las hojas del caucho (South American Leaf Blight - SALB)

El SALB es causado por el hongo ascomycota *M. ulei*, y ha llegado a ser considerado como una de las cinco enfermedades más agresivas en plantas. *M. ulei* es endémico de Centro y Sudamérica, fue inicialmente identificado en árboles de caucho del Brasil en 1904. Esta enfermedad se extiende desde el Sureste de México (18º latitud norte) hasta el estado de Sao Paulo en Brasil (24º latitud sur), cubriendo los países de Perú, Bolivia, Colombia, Venezuela, Guyana, Trinidad y Tobago, Haití, Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Salvador, Honduras, y Guatemala (Gasparotto *et al.* 1997). El SALB ha sido el mayor inconveniente para el desarrollo del cultivo de caucho en los países de América Latina restringiendo las plantaciones a zonas cuyas condiciones climáticas no favorecen el desarrollo de epidemias. Para el control de la enfermedad se ha recomendado que el árbol de caucho sea plantado en áreas reconocidas como zonas de escape al SALB, caracterizadas por una estación seca bien definida y un déficit hídrico mayor de 200 mm durante un periodo entre dos a cuatro meses (Compagnon 1998).

El informe más antiguo sobre los efectos destructivos del hongo *M. ulei*, en plantaciones de caucho, data de 1909 en la Guyana inglesa, seguido del caso de Surinam (antigua Guyana Holandesa), en 1911 en donde grandes plantaciones fueron abandonadas debido al ataque del hongo. Sin embargo, las mayores pérdidas debidas al SALB las sufrió la compañía Ford, en Brasil entre 1927 y 1933, periodo en cual la enfermedad arrasó con cerca de 3.200 ha, en su mayoría de clones de origen Asiático. En Belterra, en donde se sembraron alrededor de 6.500 ha entre 1934 y 1942; la plantación fue destruida en su totalidad por el *M. ulei*. En Panamá, la plantación de la Cia. Goodyear sembrada en 1935 fue abandonada en 1941 por el SALB (Araujo *et al.* 2001; Pinheiro & Libonati 1971).

1.9.1 Signos y síntomas

Las infecciones repetidas de SALB, causan defoliaciones sucesivas que conllevan al retraso del desarrollo de los árboles juveniles en plantación, en jardín clonal y vivero. En árboles adultos ocasiona la disminución de la producción de látex hasta en un 50% y en árboles muy susceptibles la muerte (Figura 1-4).

Figura 1-4. Individuos del clon FX-3864 atacados por el SALB, plantación de la Michelin-Bahía Brasil.

Las lesiones causadas por el crecimiento del hongo aparecen en las hojas, tallos, pecíolos, flores, inflorescencias y frutos jóvenes. Las manchas en las hojas se sitúan sobre la cara inferior y se encuentran esparcidas en toda la superficie foliar, son de color café grisáceo, variables en forma y tamaño con un diámetro que oscila entre 8 mm – 10 mm con alta esporulación en clones de caucho natural susceptibles. En clones resistentes entre 1,5 y 2,0 mm con ausencia o esporulación parcial (Araujo *et al.* 2001; Junqueira *et al.* 1989).

Aproximadamente a los 24 días después de la infección aparecen los estromas que son estructuras que le permiten al hongo sobrevivir por algunos meses, estos aparecen en la parte adaxial de los foliolos adultos que no se desprendieron en los primeros estadios de la enfermedad, tienen apariencia de peritecios de color negro que confieren a la hoja una textura granulada.

1.10 *Microcyclus ulei* agente etiológico del SALB

1.10.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica del hongo se ha realizado con base en la forma perfecta o fase telomórfica que es la correspondiente a *M. ulei*. La fase anamórfica o conidial ha sido denominada *Fusicladium heveae* (Figura 1-5) (Schubert *et al.* 2003). El hongo pertenece a la clase *Loculoscomycete*, orden *Dothideales* y familia *Mycosphaerellaceae*. El género *Microcyclus* ha sido incluido en esta familia por Ericsson y Hawksworth (1993), quienes lo consideraron la contraparte estromática de la familia *Mycosphaerellaceae*.

Clasificación taxonómica basada en caracteres morfológicos

Domínio: *Eukaryota*

Reino: *Fungi*

Phylum: *Ascomycota*

Subdivisión: *Pezizomycotina*

Clase: *Loculoascomycetes*

Orden*: Dothideales*

Familia: *Mycosphaerellaceae*

Género: *Microcyclus*

Especie: *ulei*

En el género *Microcyclus* se encuentran reportadas alrededor de 15 especies, correspondientes a hongos tropicales y subtropicales, que son patógenos biotróficos o necrotróficos de las hojas de sus hospederos. Un rango extenso de angiospermas está asociado con el género, y especies individuales están restringidas a un hospedero particular como es el caso de *M. ulei* (Cannon *et al.* 1995).

1.10.2 Morfología y fisiología

El hongo *M. ulei* es un hongo hemibiotrófico especializado que ataca únicamente plantas del género *Hevea* y dentro de éste, las especies *H. brasiliensis, H. guinensis, H. benthamiana, H. spruceana, H. camargaona, H. camporum* y sus híbridos. (Junqueira *et al.* 1989). Este hongo dentro de su ciclo de vida presenta dos tipos de esporas que son

conidias y ascosporas. La fase conidial del hongo corresponde a *Fusicladium macrosporun*- Kuyper o *Fusicladium heveae* (Schubert *et al*. 2003) y es la responsable de la enfermedad en el árbol de caucho (Gasparotto *et al.* 1984). Las conidias se forman de manera individual, generalmente septadas y a veces aseptadas, usualmente son curvadas o sigmoides, lisas y hialinas que después adquieren una coloración grisácea o verde olivo, con un tamaño aproximado de 15–65 x 6–11 µm (Shubert *et al*. 2003).

La forma telomórfica del hongo que es la denominada *M. ulei,* en hojas adultas forma los estromas que pueden ser color amarillo o café, globosos, generalmente adaxiales, carbonosos, superficiales amontonados y a veces formando anillos alrededor de las perforaciones de las hojas, con un tamaño entre 200 y 400 µm (Chee & Holliday 1986; Schubert *et al.* 2003). Los ascos son claviformes con un tamaño de 56-80 x 12-16 µm, con ocho esporas, las ascosporas son alargadas tabicadas con un tamaño de 18-22 x 5-8 µm (Cannon *et al.* 1995). El hongo produce cantidades grandes de conidias las cuales son diseminadas a través del agua lluvia o el viento siendo este último el responsable de la diseminación del inóculo dentro de las mismas plantaciones así como entre plantaciones localizadas a grandes distancias (Gasparotto *et al.* 1984).

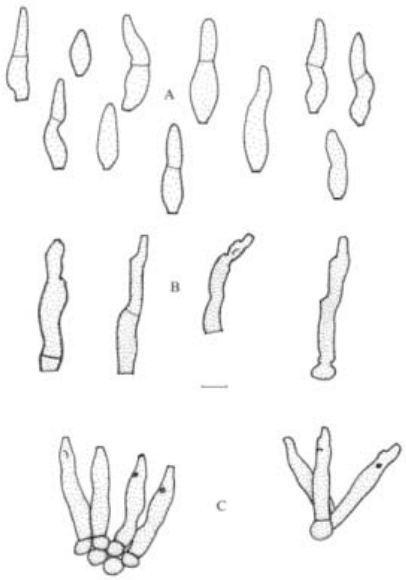


Figura 1-5. Estructuras microscópicas de *M. ulei*. **A.** Conidias de *M. ulei* **B.** Células conidiogenícas. **C**. Conidioforos (tomado de Shubert, *et al*. 2003).

1.10.3 Ciclo de la enfermedad

M. ulei tiene un ciclo de vida completo de aproximadamente cinco meses, el inóculo primario puede generarse a partir de las ascosporas liberadas desde los estromas

presentes en hojas adultas, la liberación está dada por el inicio del periodo de lluvias y aumento de la humedad relativa superior a 85 %. Los ascos en el aire son movilizados por el viento y la lluvia hacia foliolos jóvenes en los cuales se depositan (parte abaxial) y en presencia de una película de agua germinan en un periodo de 12 a 24 horas, el tubo germinativo penetra la epidermis de la hoja mediante formación de apresorio. La generación de conidias se da entre 6 y 12 días los cuales se desprenden de los conidióforos por el viento y las lluvias infectando otros foliolos para dar inicio a una epidemia. Aproximadamente 24 días después de la infección aparecen las estructuras estromáticas, en el interior de estos se forman los ascos que contienen las ascosporas en un periodo entre uno y cinco meses (Chee *et al.* 1986).

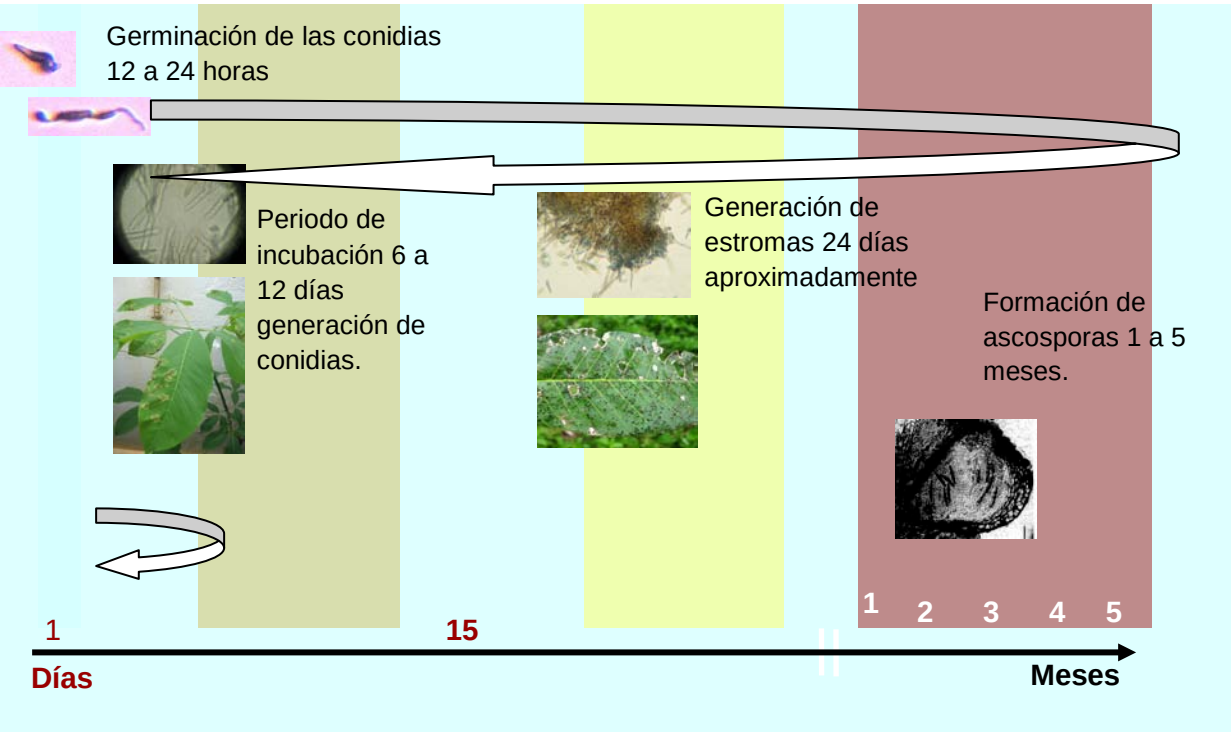


Figura 1-6. Esquema del ciclo de vida completo de *M. ulei*.

1.10.4 Variabilidad fisiológica

Desde la década de los sesentas del siglo pasado diferentes investigadores han reportado la variabilidad fisiológica de aislamientos de *M. ulei* obtenidos en diferentes regiones de Latinoamérica (Chee & Holliday 1986) y dependiendo del tipo de clones de *Hevea* que atacaban se hizo una clasificación inicial de 4 razas. Esta clasificación fue

realizada por Miller (1966), quien estableció una serie de clones diferenciadores (IAN 717, FX 3925, IAN 710 o IAN 713, MDF 180 y P 122) para la identificación de razas fisiológicas de *M. ulei,* teniendo como parámetros de evaluación el tamaño de la lesión y la intensidad de esporulación. En Brasil Sudhevea (EMBRAPA), la raza 4 fue subdividida en 4^a, 4^b y 4^c al incluir el clon F 4542 de *H. benthamiana*. Estudios posteriores realizados por Chee *et al,* (1986), identificaron 8 razas usando siete clones como diferenciales correspondientes a: IAN 717, FX 2804, IAN 710, FX 2261, FX 985, FX 25 y MDX 96, aumentando así el número de razas inicialmente establecidas por Miller.

Junqueira *et al*, (1989), analizaron la reacción de varios clones derivados de 9 especies de caucho a 52 aislamientos de *M. ulei* de diferentes regiones heveícolas del Brasil y determinaron cuatro grupos distintos, de acuerdo con la esporulación de los aislamientos sobre los foliolos: **Grupo I;** que corresponde a los aislamientos que esporulan en todos los clones con genes de *H. benthamiana* y algunas progenies de *H. brasiliensis* puros. **Grupo II:** aislamientos que esporulan en todas las progenies o en la mayoría de los clones de *H. brasiliensis*, excepto FX 985 y MDF 180. **Grupo III:** aislamientos que esporulan tanto en la mayoría de los clones híbridos de *H. benthamiana* como en la mayoría de los clones *H. brasiliensis,* excepto FX 985 y MDF 180 y **Grupo IV:** que esporulan solamente en los clones de *H. camporum*.

Posteriormente fue descrita la alta variabilidad fisiológica en aislamientos de *M. ulei* provenientes de diferentes regiones agroclimáticas del Brasil, desde aislamientos recolectados en las regiones húmedas y calientes de la región amazónica hasta las regiones semisecas del sur del Brasil. Así mismo se reportaron cambios de hospederos combinados con adaptación a un extenso rango de ambientes abióticos (Gasparotto & Junqueira 1994). Lo anterior se ratificó con los estudios realizados por Rivano (1997), quien trabajó con 16 aislamientos de *M. ulei* provenientes del interior de Floresta en la Guyana Francesa detectando 11 razas diferentes. El estudio hecho en la plantación de Michelin de Bahía por Mattos *et al*, (2003) incluyó 50 aislamientos de *M. ulei* los cuales fueron evaluados en 12 clones de *Hevea* correspondientes a *H. brasiliensis, H. pauciflora* y *H. benthamiana* utilizando metodologías similares a las manejadas por los estudios anteriormente mencionados. En este estudio fue posible distinguir 36 perfiles diferentes de virulencia lo cual permite suponer que se encontraron nuevas razas del patógeno. La alta variabilidad obtenida del poder patogénico, muestra la capacidad de adaptación que

tiene el hongo lo cual dificulta en un futuro la obtención de clones con resistencia durable (Mattos *et al*. 2003).

1.10.5 Factores asociados a patogenicidad

Los factores asociados a la patogenicidad de *M. ulei* se desconocen, pese a ser un hongo ampliamente estudiado en cuanto a su morfología, fisiología y epidemiología. Los únicos estudios que se han realizado para tratar de entender la bioquímica del patógeno relacionada a su capacidad de infección en *Hevea spp*., son los reportados por Lieberei *et al*, (1983), y Lieberei, (2006). En el primero se evaluó bajo condiciones in vitro la tolerancia de *M. ulei* al ácido cianhídrico (HCN). En el segundo estudio se midió la producción de HCN en clones de *Hevea spp*. resistentes y susceptibles al hongo mediante la inoculación de foliolos en cámaras húmedas, encontrando que los clones con elevada producción de HCN presentaron alta susceptibilidad al patógeno. Esta condición de producción de HCN como repuesta al ataque de algunos patógenos se presenta en algunas plantas del género *Manihot* (Hagen *et al.* 2003) y el género *Hevea* (Lieberei *et al.* 1983). En general especies vegetales con alta producción de HCN son resistentes al ataque de herbívoros pero aumentan la susceptibilidad al ataque de patógenos microbianos (Lieberei 2007). Sin embargo, otros estudios han demostrado que el aumento de la producción de HCN está relacionado con la resistencia a patógenos fúngicos en algunas plantas, como en *Linum usitatissimum* cuando es atacado por *Colletotrichum lini* y en *Lotus corniculatus* cuando es atacado por *Stephylium loti* (Rissler & Millar 1977).

Los estudios en *Hevea* arriba mencionados han permitido establecer el siguiente esquema del proceso de infección: 1) durante la penetración y colonización temprana del tejido foliar del árbol de caucho por parte de *M. ulei*, es liberado el HCN, a su vez el hongo adapta su metabolismo energético en presencia del ácido. En contraste, la respuesta de resistencia temprana de la planta se ve disminuida por el HCN. 2) Cuatro días después de la colonización, se producen los conidióforos. 3) Finalmente al siguiente día de la formación de los conidióforos, estos rompen la epidermis disminuyendo la concentración de HCN dentro del tejido foliar lo que permite el inicio del proceso de esporulación.

Otro mecanismo diferente asociado a la resistencia de *M. ulei* al HCN es la producción de una β-glucosidasa extracelular con actividad específica sobre los sustratos de los compuestos cianogénicos de la planta (Lieberei *et al.* 2006). Sin embargo, los estudios hasta ahora realizados no son suficientes para establecer la funcionalidad y especificidad de esta enzima.

1.11 Resistencia de *Hevea* al SALB

Las especies de *Hevea* presentan algunos individuos con resistencia al SALB lo cual ha hecho posible la selección de clones que presentan resistencia total o parcial así como la obtención de nuevos clones a partir de programas de mejoramiento genético utilizando como principal fuente de genes clones de la especies *H. benthamiana, H. pauciflora, H. camporum y H. brasiliensis* (Junqueira *et al.* 1992; Paiva & Kageyama 1993; Pinheiro & Libonati 1971).

La resistencia al SALB de especies de *Hevea* se asocia con el tamaño de las lesiones, el periodo de latencia y la esporulación reducida del hongo en las hojas. La determinación de los periodos de latencia y la esporulación se usan comúnmente en la evaluación de resistencia horizontal en otras enfermedades. La esporulación también ha sido considerada como un test sensible para la diferenciación de razas del patógeno. En la evaluación de clones de *Hevea* con diferentes razas de *M. ulei*, se ha encontrado que el tamaño de la lesión no es significante en tanto que la esporulación si. Hashim & Pereira, (1989), igual que Langford, (1945), sugieren tener en cuenta este último parámetro para evaluar la resistencia horizontal en clones de *Hevea* y su utilidad en la selección.

Existen otros parámetros asociados a la resistencia de *Hevea* a *M. ulei*, entre los cuales se encuentra la producción de escopoletina que puede actuar como una barrera química, su acumulación en las hojas ha sido utilizada como un componente adicional para la descripción de la resistencia junto con los parámetros arriba descritos así como la acumulación de lignina y el número de estromas (Garcia *et al.* 1999). La lignificación ha sido asociada con la respuesta hipersensible, la cual es inducida rápidamente después de la infección, los clones totalmente resistentes presentan una intensa lignificación, que le permiten rodear las esporulaciones (Garcia *et al.* 1995). Sin embargo, probablemente los procesos de lignificación jueguen un papel de menor importancia que la reacción hipersensible de producción de fitoalexinas como la escopoletina, que es dominante. Es decir las reacciones de defensa del árbol de caucho a *M. ulei* durante la infección

estarían envolviendo las rutas metabólicas de síntesis de los fenilpropanoides las cuales se estarían sobreexpresando (García *et al*. 1995).

A nivel genómico se desconocen los genes asociados a la resistencia y los estudios se han encaminado al entendimiento de la resistencia cuantitativa, actualmente pese a que el *H. brasilensis* es un perenne se ha logrado obtener un mapa genético a partir de 195 individuos de la F1 producto del cruce entre un parental con resistencia total al SALB RO 38 (híbrido inter-específico entre *H. brasiliensis* x *H. benthamiana)* y un parental susceptible de *H. brasiliensis* PB 260 (Lespinasse *et al.* 2000b). Se obtuvieron mapas para cada parental y uno consenso el cual ha sido saturado mediante marcadores tipo RFLP, AFLP, microsatélites e isoenzimas, obteniéndose 18 grupos de ligamiento que abarcan 2144 Centimorgan, en promedio con un marcador cada 3 Centimorgan.

Mediante el mapa obtenido para el parental resistente RO 38 y la evaluación de características cuantitativas asociados con resistencia al SALB como tipo de lesión (TL) y diámetro de la lesión (DL) al inocular la F1 con cinco cepas de *M. ulei,* se logró identificar seis QTL asociados con resistencia distribuidos en cinco grupos de ligamiento del mapa. Fue posible correlacionar un QTL ubicado en el cromosoma g13 cercano al marcador EM36/14 con las características fenotípicas DL y TL para las cinco cepas con un 91% de contribución a la variación fenotípica. Otros dos QTL fueron detectados para cuatro cepas uno para TL ubicado en g11 y uno ubicado en g12 para DL, los otros tres se ubicaron en los cromosomas g15, g13 y g10. Este estudio permitió la identificación de dos QTLs con un mayor efecto sobre la resistencia, mostrando que la resistencia cuantitativa es más oligogénica que poligénica (Lespinasse *et al.* 2000a). La evaluación sobre esta misma progenie en condiciones naturales y controladas con tres diferentes aislamientos, permitió confirmar el mayor efecto sobre la resistencia de el QTL ubicado en g13 cerca al marcador EM36/14, adicionalmente se estableció que este alelo denominado *M13-lbn* proviene desde el parental *H. benthamiana* del clon RO 38. (Le Guen *et al.* 2003, Le Guen *et al*. 2008).

1.11.1 Búsqueda de resistencia genética al SALB

Como consecuencia del fracaso con las plantaciones establecidas en Beltierra y Forlandia entre 1927 y 1933 por la compañía Ford, el departamento de agricultura de los Estados unidos en conjunto con el gobierno de Brasil dieron inicio en 1937 a un

programa de mejoramiento genético para buscar clones con resistencia al SALB. Los primeros clones seleccionados correspondieron a los árboles sobrevivientes de la epidemia devastadora de SALB ocurrida en las plantaciones de la Ford (Pinheiro & Libonati. 1971).

En la prospección realizada a lo largo de la selva Amazónica para la búsqueda de fuentes de resistencia al SALB, se encontró que las regiones de Acre ubicada en el Brasil y Madre de Dios ubicada en el Perú (área fronteriza con Colombia y Brasil), se ubicaron los árboles con mayor resistencia dentro de los que se incluían especies como *H. benthamiana* y *H. pauciflora*, los cuales fueron incorporados en los programas de mejoramiento (Pinheiro & Libonati.1971).

Entre 1947 y 1983 la Fairestone se vinculó a los programas de mejoramiento y participó en la selección de clones e intercambio de material vegetal con otros países de Suramérica. A pesar de los esfuerzos de estos programas fueron pocos los clones que se recomendaron para zonas con epidemias de SALB, bien sea por la baja productividad de látex de estos con respecto a los clones Asiáticos, o por la pérdida de la resistencia en corto tiempo.

De los primeros 70 años del programa de mejoramiento se seleccionaron 960 clones los cuales se establecieron en la hacienda en la Hacienda Tres pancadas (Actualmente plantación Michelin – Bahía programa CMB) quienes desde hace casi 20 años en conjunto con el CIRAD han continuado con el programa mejorando los niveles de rendimiento de látex y resistencia al SALB (Garcia *et al.* 2004).

1.12 Estudio molecular de interacciones planta -patógeno

Se ha propuesto que la similaridad entre los genes de resistencia descritos en diferentes especies vegetales posibilita la identificación de otros genes de resistencia mediante homología de secuencia (Kanazin *et al.* 1996; Staskawicz *et al.* 1995). La presencia de dominios conservados a permitido buscar genes R candidatos en otras especies vegetales mediante detección de RGAs (*resistance gene analogs*) por PCR utilizando iniciadores degenerados (López *et al.* 2003; Soriano *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2011). El diseño de éstos, ha sido realizado a partir de alineamientos de secuencias de los dominios conservados de genes R (Kanazin *et al.* 1996) como *RPS2* y *RPM1* de *A. thaliana* contra *P. syringae* (Bent *et al.* 1994), el gen *N* de tabaco contra *X. oryzae* (Dinesh-

Kumar & Baker 2000), y el gen *L6* de lino contra el hongo *M. lini* (Lawrence *et al.* 1995), entre otros.

Adicionalmente en las últimas décadas se han desarrollado tecnologías que permiten la evaluación de la expresión diferencial de los genes de una planta sometida a diferentes condiciones, dentro de las cuales se incluye el ataque de patógenos. Las más reconocidas de estas tecnologías son los microarreglos (Lopez *et al.* 2005; Wan *et al.* 2002) y chips de DNA "*Affymetrix*" los cuales permiten el análisis de miles de genes simultáneamente. Sin embargo requiere del conocimiento previo de las secuencias de los genes de la especie que se pretende evaluar o una estrechamente relacionada, para el caso de los chips y para los microarreglos por lo menos contar con los amplificados por PCR de los genes para su construcción.

Otras herramientas metodológicas que han permitido evaluar la expresión diferencial de genes en una planta sometida a estrés por el ataque de un patógeno pero sin el conocimiento previo de las secuencias son SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) (Fregene *et al.* 2004), Despliegue diferencial o "*differential display*" (Seehaus & Tenhaken 1998) y cDNA-AFLPs entre otras, esta última técnica ha demostrado ser más robusta y reproducible que las otras técnicas mencionadas, y ha permitido la detección de genes expresados diferencialmente en interacciones planta patógeno como *Solanum tuberosum – Phytophthora infestans* (Avrova *et al.* 2003), yuca - *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis (Santaella *et al.* 2004). Adicionalmente se debe mencionar que los resultados la expresión diferencial de genes de un organismo sometido a una determinada condición de estrés debe ser validado con otra metodología que los confirme dentro de las más usadas se encuentra qRT-PCR (Rinaldi *et al.* 2007; Santaella *et al.* 2004).

En los últimos cinco años las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento han facilitado el estudio de la expresión génica de eucariotes en organismos no modelo. Mediante la secuenciación del RNA tecnología denominada RNA-seq, se ha logrado tener una mayor cobertura de los transcriptomas, ensamblaje de novo, estimación de la abundancia de cada transcrito y la detección de isoformas génicas, limitantes que presentan las tecnologías convencionales como SAGE y microarreglos. (Trapnell *et al.* 2010; Wang *et al.* 1998). La tecnología RNA-seq consiste en convertir el RNA total o una fracción de este, en una librería de cDNA mediante el uso de Poly T, posteriormente el cDNA es segmentado y se ligan adaptadores en ambos extremos, cada molécula

amplificada o no, es secuenciada mediante tecnologías de alto rendimiento obteniéndose así secuencias cortas a partir de un extremo o de los dos. Estas presentan un tamaño entre 30 y 400 bases dependiendo de la plataforma usada. Dentro de estas plataformas se encuentran ILUMINA/SOLEXA, "*Applied Biosystems Solid"* y Roche 454, las cuales tienen un menor costo que la metodología de secuenciación tradicional, con la cual años atrás la secuenciación de una Mb tenía un costo por encima de $ 1000, hoy día SOLEXA logra la secuenciación de una Mb por $ 5, haciendo esta tecnología más asequible (Wall *et al.* 2009).

Las técnicas de secuenciación de alto rendimiento arriba mencionadas también han permitido ampliar el conocimiento a nivel de los patógenos ya que mediante estas se han obtenido genomas rápidamente, cuyo análisis ha hecho posible la predicción de efectores y secretomas que junto con los datos de transcriptomas han tenido un gran impacto en el mayor entendimiento de las interacciones planta patógeno.

Capítulo 2

METODOLOGIA

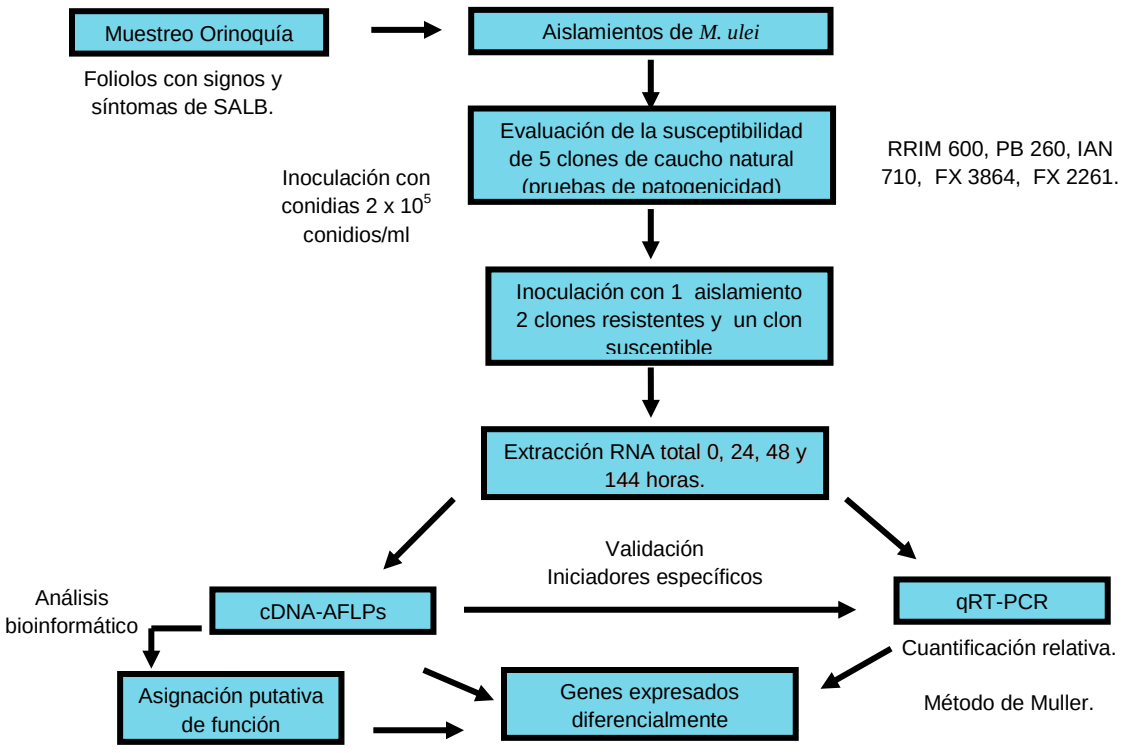


Figura No 2-1. Esquema general metodológico.

2.1 Objetivo No1 Determinar los niveles de susceptibilidad de los clones comerciales de *H. brasiliensis* a diferentes aislamientos de *M. ulei* provenientes de la Orinoquía Colombiana, en condiciones controladas.

2.1.1 Aislamientos de *M. ulei*

Los aislamientos de *M. ulei* se obtuvieron a partir de material foliar afectado de los clones GT 1 y RRIM 600 provenientes de jardines clonales de Corpoica la libertad y Cauchopar ubicados en la Orinoquía Colombiana. Una vez se obtuvieron cultivos in vitro puros se identificaron por morfología del estado asexual *F. heveae* (Shubert *et al.* 2003) y análisis de la región ITS completa utilizando primers universales ITS1/ITS4 (White *et al.* 1990). Se utilizó la metodología para extracción de DNA propuesta por Stirling, (2004) y de amplificación por PCR propuesta por Pérez-Vera *et al*, (2005). Los amplímeros obtenidos se secuenciaron en sentido derecho y reverso por duplicado, posteriormente se ensamblaron y se analizaron mediante Blastn contra la base de datos del GenBanK.

Para las pruebas de patogenicidad en condiciones controladas dos aislamientos (GCL009 y RCP009) se repicaron en tubos con medio de crecimiento sólido M4 (Anexo A), después de 45 días de incubación a 24^{o}C en oscuridad, se tomaron los cultivos (estructuras estromáticas y conidióforos) y se maceraron con micropistilo en tubos de 2 ml con 1 ml de agua estéril. Posteriormente el macerado se paso a un erlenmeyer de 250 ml con 50 ml medio de esporulación (anexo A) y se incubaron a 24^{o}C en oscuridad durante 12 días, se expusieron a luz blanca durante 90 minutos dos días consecutivos, al día 15 las conidias (Lieberei *et al*.1983) se extrajeron del medio con una solución de tween al 0.05%, la solución de esporas se ajustó al 2 x10^{5} conidias/ml (Mattos *et al*. 2003).

2.1.2 Material vegetal

Las plantas de caucho utilizadas (clones RRIM 600, PB 260, FX 3864, IAN 710 y FX 2261) fueron obtenidas de la colección del Instituto Sinchi de Florencia, y las empresas la Voragine y Mavalle SA, las plántulas se transplantaron en recipientes plásticos de 50 x 50 cm y se adaptaron por seis meses a condiciones de invernadero, fueron fertilizadas cada dos meses con fertilizante edáfico triple 15 y fertilizante foliar quincenalmente. La identidad de los clones se verificó mediante la amplificación por PCR de cuatro microsatélites específicos AY486867, AY486866, AY486754 y AY486707 (ID en el

GenBank) utilizando los primers (Tabla 2-1) y condiciones de amplificación propuestos por García *et al*, (2011). Como patrón de referencia se utilizó material vegetal de los mismos clones proveniente de la plantación Tres pancadas de Michelin ubicada en Bahía - Brasil.

Tabla 2-1. Primers usados para la evaluación de la identidad de los clones de caucho natural utilizados en las pruebas de patogenicidad en condiciones controlads.

Microsatélites ID del GenBanK	Primers	Secuencia
AY486867	SSRH102 **F**	5'-CCAAGCCAATCATCAGGAAT-3'
	SSRH102 **R**	5'-AGCAGCCCATGATACAACTG-3'
AY486866	SSRH103 **F**	5'-TCCTCTCCTCGTCAACATCC-3'
	SSRH103 **R**	5'-TGTCATTCGAACTCCGTCAA-3'
AY486754	SSRH358 **F**	5'-TCCGCTCTAGCTTCTTCCTG-3'
	SSRH358 **R**	5'-GCCGCATAAGAGTGAACGA-3'
AY486707	SSRH403 **F**	5'-TGCCATCCTGCAGTTATCAG-3'
	SSRH403 **R**	5'-GCACATATG AGGAAGCCACA-3'

2.1.3 Pruebas de patogenicidad en condiciones controladas

Las inoculaciones con conidias de los aislamientos GCL009 y RCP009 de *M. ulei* sobre los clones RRIM 600, IAN 710, PB 260, FX 3864, FX 2261, se realizaron en cubículos de 2 x 0.8 m en soporte metálico recubiertos con plástico negro, con luz y cortina de agua, se mantuvieron condiciones de humedad >85%, temperatura entre 22 y 26 ^{o}C y fotoperiodo de 12 horas. Se aplicó la solución de conidias 2 x10^5 conidias/ml (Mattos *et al*. 2003; Sambugaro *et al*. 2003) sobre foliolos en estadio B2 con ayuda de una micropipeta, se realizó una reinoculación a las 12 horas y las primeras 24 horas posinoculación con el fin asegurar el éxito de la infección.

La evaluación de la respuesta de los cinco clones a los dos aislamientos de *M. ulei* se realizó mediante la escala de intensidad de esporulación (IE) (Mattos *et al.* 2003; Sambugaro *et al*. 2003) Figura 2-2.

Caja 2-1. Para la evaluación de la resistencia de material vegetal de especies de *Hevea spp*. al SALB en condiciones controladas y en condiciones de campo, se han diseñado tres diferentes escalas que permiten medirla con base a los signos y sintomas asociados a la enfermedad como son: Intensidad de esporulación (**IE**) propuesta por Mattos *et al*, (2003) basada en la escala propuesta por Junqueira *et al*, (1985), de acuerdo con la figura 2-1. **1** y **2** se consideran material con resistencia, **3**, **4** y **5** material susceptible y **6** material altamente susceptible. Las otras dos correponden a la escala de intensidad de ataque (**IA**) propuesta por Chee, (1976) la cual se divide en cinco clases dependiendo del porcentaje de area foliar afectada y la escala de densidad de estromas (**DE**) en donde se tiene en cuenta el numero de estructuras estromáticas formadas por foliolo.

1. Lesiones necróticas sin esporas.

2. Lesiones no necróticas sin esporas.

3. Esporulación pobre en la superficie abaxial de la lesión.

4. Esporulación fuerte cubriendo la superficie abaxial de la lesión

5. Esporulación muy fuerte cubriendo toda la superficie abaxial de la lesión.

6. Esporulación muy fuerte en la superficie abaxial y adaxial de la lesión

Figura 2-2. Escala de evaluación de IE propuesta por Junqueira, (1985) y modificada por Mattos *et al*, (2003).

2.2 Objetivo No2 Identificar genes expresados diferencialmente en clones de *H. brasiliensis* susceptibles y resistentes durante los primeros días del ataque causado por el hongo *M. ulei* causante del Mal Suramericano de la hoja del Caucho.

2.2.1 cDNA-AFLP

Para la búsqueda de genes expresados diferencialmente mediante cDNA-AFLPs se seleccionaron tres clones y el aislamiento de *M. ulei* GCL009 de acuerdo al comportamiento observado en las pruebas de patogenicidad. Como material susceptible se escogió el clon RRIM 600, el clon FX 3864 como material con resistencia parcial y el clon FX 2261 con resistencia total a este aislamiento de *M. ulei.* Nuevamente se inocularon plantas por duplicado de los clones en las mismas condiciones descritas en el númeral 2.1.3. Se procedió a realizar la extracción del RNA total a diferentes tiempos de la infección.

2.2.1.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNA se realizó mediante la metodología fenol/SDS (Kingston 2000). Se pesaron 0.5 g de hojas frescas, provenientes de los clones RRIM 600, FX 3864 y FX 2261 a diferentes tiempos posinoculación (0, 24, 48 y 144 h), en tubos de microcentrífuga de 2 mL. Posteriormente se maceraron con ayuda de esferas de cuarzo de 2 mm en el equipo mini bind-beater por 1 min. Inmediatamente se adicionó 1 mL de Buffer de extracción para RNA (0.18 M de Tris-HCl, 0.09 M LiCl, 4.5 mM EDTA, 1% de SDS, pH:8.2) se homogenizó y adicionó 300 μL de fenol equilibrado con solución TLE (0.2 M Tris-HCl, 0.1M LiCl, 5 mM EDTA pH a 8.2), la mezcla se homogenizó mediante agitación por inversión durante *2* min, se adicionó 300 μL de cloroformo y se mezcló por inversión durante 1 min, las muestras se incubaron a 50°C. por 20 min y se centrifugarón a 13000 rpm por 20 min a 4°C. La fase acuosa se saco con ayuda de una pipeta sin tomar o generar disturbio en la interfase, se transfirió a un tubo tipo eppendorf limpio y estéril. La extracción con fenol se realizó tres veces, por último se realizó una extracción con cloroformo. El RNA se precipitó con un volumen de isopropanol y se incubó a -20 °C por 12 h.

Caja 2-2. Fundamento de la técnica de cDNA-AFLPs. Se basa en la técnica de AFLPS (*Amplified fragment length polimorphism*) descrita por Vos *et al*, (1995). En la cual se obtienen huellas genéticas de ADN genómico, la misma metodología puede ser utilizada sobre cDNA para análisis de transcriptomas y ha sido aplicada de manera confiable para la busqueda de genes expresados diferencialmente.

Esta metodología selecciona fragmentos de cDNA previamente digeridos con enzimas de restricción mediante PCR utilizando los siguientes pasos. 1) **Digestión** del cDNA con dos enzimas de restricción de baja y alta frecuencia de corte, en el caso de genomas vegetales se recomiendan la *EcoR*I (baja frecuencia) y *Mse*I (alta frecuencia).2). **Ligación** de adaptadores de DNA complementarios a los sitios de restricción los cuales tienen adicionalmente una secuencia complementaria a primers conocidos. 3). **Preamplificación** por PCR utilizando primers con o sin una base de selección al extremo de la secuencia. 4). **La amplificación** teniendo como molde los amplímeros obtenidos en la preamplificación del paso anterior, utilizando primers con 2 o 3 bases de selección,. 5) Los productos obtenidos son **separados** por un sistema de electroforesis y **visualizados** mediante autorradiografía, fluorocromos o tinción con nitrato de plata entre otros métodos. 5) **Selección y elución** de los amplicones con intensidad diferencial en los diferentes tratamientos de las muestras 6) Finalmente clonación y secuenciación de los amplicones efluidos denominados TDFs. (*Transcription-derived fragments*) (Figura 2-3).

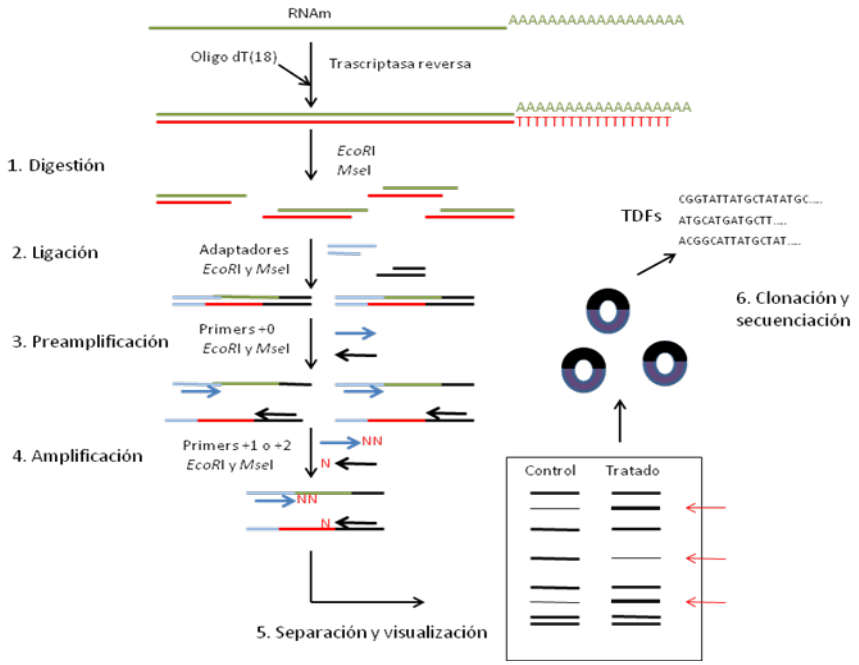


Figura 2-3. Pasos metodológicos de la técnica de cDNA-AFLPs.

El RNA precipitado se recogió por centrifugación a 13000 rpm y se lavó tres veces con 500 µL de etanol al 70% (con agua tratada con DEPC). El RNA obtenido se solubilizó en 100 µL de agua tratada con DEPC y se purificó mediante columnas mini RNAeasy de quiagen. Posteriormente se realizó su cuantificación por fluorometría con el equipo Qubit® de (invitrogen) utilizando el kit Quant-iT^{TM} RNA BR Assay.

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

2.2.1.2 Síntesis de cDNA de doble cadena

Se tomó 1 µg de RNA total de cada una de las muestras obtenidas en los diferentes tiempos posteriores a la inoculación de los clones, el RNA se llevó a 8 µL con agua tratada con DEPC y se adicionó 1 µL de Buffer de DNasa y 1 µL de DNasa I (invitrogen), se incubó por 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se inactivo con la adición de 1 µL de EDTA (25 mm) y posterior incubación a 65^{o}C por 10 min.

Para la síntesis del cDNA se utilizó el kit Superscript Double-Stranded cDNA Synthesis (invitrogen). Para la primera cadena se adicionó al RNA tratado con DNasa 1 µL de oligo-dT(18n) de una concentración 100 µM se incubó a 70 ^{o}C por 5 min e inmediatamente se colocó sobre hielo. Posteriormente se adicionó 4 µl de Buffer 5X, 0,5ul de transcriptasa reversa Superscript (200 U/µL), 1 µL de DTT (0,1 M), 0,5 µL de dNTPs (10 mM) y se llevó a un volumen final de 20 µL con agua tratada con DEPC, las muestras se incubaron 10 min a 25 ^{o}C, 60 min a 42 ^{o}C y finalmente 10 min a 70 ^{o}C.

Con el fin de verificar la síntesis de la primera cadena se realizó la amplificación por PCR del gen β-actina mediante los primers actinaHb-F 3´-GACCTTGCTGGTCGTGATCT-5´ y actinaHb-R 3´-GCAGTTTCCAGTTCCTGCTC-5´ diseñados a partir de la secuencia DQ306817.1 reportada en el GenBank la cual corresponde a cDNA de *H. brasiliensis* con homología a genes de actina de otras especies vegetales. El volumen final para la PCR fue de 10 µL la cual contenía: 0,5 µL del cDNA heteroduplex, 1 µL de Buffer (10X), 0,3 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 0,2 µL de dNTPs (20 mM), 0,25 µL de cada uno de los primers (20 mM) y 0,5 µL de Taq polimerasa (5U/ µL) (Invitrogen). El programa de amplificación consistió de un ciclaje con temperatura inicial de 94 ºC por 5 min, 40 ciclos con una fase de denaturación a 94 ^{o}C por 30 seg, de fusión a 55 ºC por 40 seg y extensión a 72 ºC por

40 seg, finalmente una extensión de 72 ºC por 5 min. Con el fin de descartar DNA contaminante se incluyó en esta PCR una muestra con 1 µL del RNA Tratado con DNasa.

La síntesis de la segunda cadena se realizó utilizando la combinación de las enzimas polimerasa I de *Escherichia coli*, RNAsa H y ligasa, el volumen final de la reacción se realizó en 80 µL el cual contenía: 8 µL de Buffer de ligasa 10X, 16 µL de buffer de transcriptasa reversa 5X, 0,3 µL de dNTPs (20 mM), 0,5 µL de DNAligasa, 3 µL de DNA polimerasa y 0,5 µL de RNAsa 26 µL de agua HPLC la mezcla se adicionó sobre los 20 µL de la síntesis de la primera cadena y se incubó a 16 ^{o}C por 20 min.

El cDNA obtenido se purificó con 80 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 24:24:1, se mezcló por inversión 2 min, se centrifugó y el sobrenadante se paso a un tubo de 1,5 mL, el cDNA se precipitó con 250 µL de etanol absoluto y 30 µL de acetato de Amonio 7,5 M, se centrifugó a 13000 rpm por 20 min, el pellet se seco a 65 ^{o}C por 15 min y se resuspendió en 5 µL de buffer TE.

2.2.1.3 Reacción de digestión-ligación

Las condiciones de mezcla de reacción y tiempos de termociclaje para la obtención de cDNA-AFLPs se realizaron de acuerdo con el protocolo para AFLPs propuesto por Vos *et al*, (1995) con algunas modificaciones. Todo el cDNA de doble cadena se digirió con 0,5 µL de la enzima *EcoR*I (12 U/µL) de Promega y 0,5 µL de *Mse*I (5 U/µL) de Invitrogen en una mezcla de reacción con un volumen final de 12,5 µL utilizando 1,25 uL de buffer react 10X, se incubó por 2 h a 37 ^{o}C y finalmente 20 min a 70 ^{o}C con el fin de inactivar las enzimas.

Para la ligación se adicionó al cDNA digerido 2,0 µL de adaptador *Eco*RI (5 µM) y 2,0 µL de adaptador *Mse*I (50 µM) (Anexo C), Buffer de ligasa 10X y 0,1 µL de DNA ligasa, se llevó a un volumen final de 25 µL, se incubó a 20 ^{o}C durante 2 h. Posteriormente se realizo una dilución 1 en cinco en TE para realizar la preamplificación con primer +0.

2.2.1.4 Preamplificación con primer +0

Para la preamplificación se utilizaron los primers propuestos por Vos, *et al*, (1995), sin bases de selección, la reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 µL, usando 2,5 µL Buffer de 10X, 1 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 0,3 µL de dNTPs (20 mM), 1,25 µL de cada

uno de los primers (10 µM), 2,5 U de Taq DNA polimerasa de (invitrogen) y 5 µL de la dilución del cDNA digerido y ligado con adaptadores complementarios a los primers. Para la amplificación se utilizó una temperatura inicial de 94 ^{o}C por 5 min, seguidos por 25 ciclos con condiciones de tiempos y temperaturas de 94 ^{o}C por 30 seg, 56 ^{o}C por 30 seg y 72 ^{o}C por 30 seg, finalmente 72 ^{o}C por 10 min.

10 µL del preamplificado se evaluaron en gel de agarosa al 1,5 % con el fin de se verificar la presencia de amplicones. Para la amplificación final se adicionó a los 15 µL restantes de preamplificado, 90 µL de TE.

2.2.1.5 Amplificación con primers con 2 y 3 bases de selección

Se evaluaron 11 combinaciones de primers con dos y tres bases de selección (tabla 2-2) en volumenes de reacción de 20 µL conteniendo 2 µL de Buffer 10X, 0,8 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 0,5 µL de cada uno de los primers (20 µM), 0,3 µL de dNTPs (20 mM), 0,2 µL de *Taq* DNA polimerasa, como DNA molde se utilizaron 5 µL de la dilución de preamplificado y se completó el volumen con agua HPLC. En el programa de amplificación se realizó un paso de 94 ˚C por dos 2 min seguido de 12 ciclos con una temperatura de 94 ˚C por 30 seg, 65 ˚C por 30 seg disminuyendo la temperatura 0.7 ˚C por ciclo y 72 ˚C 2 min. Posteriormente se realizaron 23 ciclos a 94 ˚C por 30 seg**,** 56 ˚C por 30 seg y 72 ˚C por 2 min, finalmente un paso a 72 ˚C por 10 min.

Los amplímeros obtenidos se separaron en geles de poliacrilamida al 4% (proporción 19:1) corridos en condiciones denaturantes (urea 7M), con Buffer TBE 0,5 X por dos horas a 90 W constantes. Posteriormente fueron visualizados mediante tinción de los geles con nitrato de plata.

Tabla 2-2. Combinaciones de primers con dos y tres bases de de selección usados para la obtención de perfiles de expresión por cDNA-AFLPs.

Primers *Eco*RI	**Primers *Mse*I**
Secuencia 5'- GACTGCGTACCAATTC-3'	Secuencia 5'-GATGAGTCCTGAA-3'
Primers con tres bases	**Primers con tres bases**
M-CTA	E-AAC
M-CTC	E-ACA
M-CGT	E-ACT
M-CAC	E-ACG
Primers con dos bases	**Primers con dos bases**
E-AA	M-CA

Primers *Eco*RI	**Primers *Mse*I**
Primers con dos bases	**Primers con dos bases**
E-CT	M-AG
E-AA	M-CC
E-CT	M-GG
E-AA	M-AC
E-AT	M-CA
E-AC	M-TG
E-CT	M-AT
E-AC	M-GT

2.2.1.6 Obtención de TDFs (*Transcription-derived fragments*)

Los perfiles electroforéticos obtenidos se analizaron visualmente y las bandas expresadas diferencialmente en cada uno de los tratamientos se efluyeron de los geles de poliacrilamida en 15 µL de agua HPLC por 12 h a 4 ^{o}C. Posteriormente los tubos se centrifugaron por 5 min a 13000 g y se tomaron 5 µL del sobrenadante los cuales se usaron como templete para hacer nuevamente amplificación por PCR con las condiciones descritas para la Amplificación con primers +2.

Los amplímeros obtenidos se corrieron en geles de agarosa al 1,5% para corroborar el tamaño de los fragmentos de DNA, se cuantificaron por fluorometría con el equipo Qubit® (Invitrogen), utilizando el kit Quant-iT^{TM} dsDNA HS y se enviaron a secuenciar en ambos sentidos a Macrogen® (20 µL de cada una de las reacciones en una concentración de 50 ng/µL).

2.2.2 Asignación de función génica

Todas las secuencias obtenidas fueron revisadas y editadas manualmente mediante el programa Bioedit http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedir.html, posteriormente ensambladas con bl2seq (Altschul *et al.*1990) y Cap3 http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.ph, para obtener una secuencia consenso. La secuencia consenso generada para cada TDF se analizó mediante alineamientos con Blastn y tBlastx en la base de datos TIGR *Plant Transcript Assembly* http://blast.jcvi.org/euk-blast/plantta_blast.cgi, las secuencias que no se les pudo asignar función se analizaron con Blastn, Blastx y tBlastx contra la base de datos del GenBank y Pythozome http://www.phytozome.net.

2.3 Objetivo No3 Validar mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR) los posibles genes de *H. brasiliensis* que presenten expresión diferencial durante los primeros días del ataque del hongo *M. ulei*, detectados con la técnica de cDNA-AFLPs.

2.3.1 Diseño de primers

A partir de las secuencias obtenidas (TDFs) y las funciones asignadas se seleccionaron 12, para las cuales se diseñaron primers utilizando los programas PrimerQuest® y Oligoperfect®, estos fueron enviados a sintetizar y se evaluaron sobre DNA total de los tres clones de caucho natural y cDNA heteroduplex obtenido a partir de los tres clones inoculados y muestreados a diferentes tiempos 0, 24, 48 y 144 hpi (horas posinoculación). De igual forma se seleccionaron primers para la amplificación de genes de referencia β- actina y factor de elongación.

Para asegurar la máxima especificidad y la eficiencia de los primers durante la amplificación de los TDFs asi como de los genes de referencia se uso un set astringente de criterios durante el diseño incluyendo Tm 59 ^{o}C, largo 20 y 24 nucleótidos, 45 a 55 % de contenido de GC y tamaños esperados de amplimeros entre 60 y 150 pb (Udvardi *et al.* 2008).

2.3.2 qRT-PCR

Se realizó la retrotranscripción a partir de 1 µL de RNA total previamente tratado con DNasa I de epicentre®, utilizando el kit MonsterScript^{TM} 1st –Strand cDNA Synthesis de epicentre®, se adicionó al µg de RNA 1 µL de primer oligo dT(21) (10 µM) y se llevó a un volumen de 15 µL con agua libre de RNAasas, se incubó a 65 ^{o}C por 2 min y posteriormente se pasó a hielo por 1 min, se adicionaron 4 µL de buffer monsterScript DX (5X) y 1 µL de transcriptasa reversa, la reacción se incubó a 42 ^{o}C por 5 min y después a 60 ^{o}C por 40 min, finalmente se calentó la reacción a 90 ^{o}C por 5 min.

La PCR en tiempo real se realizó en un volumen final de 10 µL de reacción el cual contenía 5 µL de SYBR Green I Master lightCylcer® de Roche, 0,12 µL de cada uno de los primers (20 µM), 2 µL de cDNA heteroduplex (dilución 1/10) y se completó a volumen con agua libre de RNAasas. El programa de termociclaje se llevó a cabo en el equipo LightCycler® 480 de Roche, el cual correspondió a: un paso inicial de incubación a 95 ^{o}C por 10 min con rampa de 4.4 ^{o}C/seg seguido de 45 ciclos a 95 ^{o}C por 10 seg con rampa de 4.4 ^{o}C/seg, 59 ^{o}C por 15 seg con rampa de 2.2 ^{o}C/seg y una extensión de 72 ^{o}C por 15 seg con rampa de 1,5 ^{o}C/seg en donde se realizó la medición de la señal de fluerescencia. La curva melting se realizó mediante un ciclo de de 95 ^{o}C por 1 seg con rampa de 4.4 ^{o}C/seg, 65 ^{o}C por 1 min y 97 ^{o}C en modo de adquisición continua,

finalmente un paso de enfriamiento a 40 ^{o}C por 10 seg con rampa de 1.5 ^{o}C/seg. Para cada juego de primer evaluado experimentalmente se obtuvo la eficiencia mediante la realización de curvas estándar utilizando diluciones seriadas de DNA 340, 34, 3.4, 0.34 y 0.034 ng/µL, y aplicando la formula E=10 (-1/slope).

Caja 2-3 Fundamento de la técnica qRT-PCR. La técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es un poderoso y sensible método de análisis de ácidos nucléicos independiente de geles, ya que se incorporan fluorocromos a la reacción que permiten la detección y cuantificación simultanea del DNA o cDNA blanco. Se basá en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre fluorocromos a una determinada distancia, y se realiza en un termociclador que permite la detección de la fluorescencia. La qPCR ha sido ampliamente aplicada en la cuantificación de la expresión génica siendo una de las técnicas más importantes actualmente, esta aplicación es conocida como qRT-PCR (*reverse-transcription quantitative PCR*) que permite medir no solo los niveles de mRNA sino también miRNAs y otras especies de RNA.

Se han desarrollado diferentes sistemas de fluorescencia para el qPCR dentro de las que se encuentran las sondas de hidrólisis Taqman (TaqMan; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) , sondas de hibridización (LightCycler; Roche, Indianapolis, IN, USA), horquillas fluorescentes y agentes intercalantes como *SYBR green*.

El *SYBR green* emite fluorescencia cuando esta unido a la doble cadena de DNA de manera similar como lo hace el bromuro de etidio. Después de la replicación durante la PCR múltiples moléculas de *SYBR Green* se unen al producto y emiten una señal fluorescente fuerte que es fácil de detectar. Este tipo de fluorocromos son menos costosos que la sondas y pueden ser utilizados en cualquier reacción ya que no se unen a secuencias específicas. Sin embargo tienen la limitante que no pueden ser utilizados en ensayos múltiples (VanGuilder *et al.* 2008).

Análisis de datos. Los datos obtenidos a partir de qRT-PCR pueden ser analizados en dos vías una cuantificación absoluta en la cual se establece el número de copias de RNA en una muestra específica y una relativa en donde una de las muestras experimentales es el calibrador (control, no tratado o tiempo 0), entonces cada uno de los valores de la muestras a normalizar es dividido por el valor de la muestra calibradora, generando niveles de expresión relativa. La mayoría de análisis de expresión génica se realiza mediante la cuantificación relativa.

Para realizar una cuantificación absoluta se requiere una curva estándar de RNA del gen de interés, la cual se puede realizar mediante diluciones seriadas de una cantidad conocida de RNA (número de copias). En el caso de la cuantificación relativa el método más común se conoce como $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen 2001). Este método asume que la reacción de PCR ocurre con un 100% de eficiencia en donde se toma en cuenta el inicio de la fase exponencial de la reacción, en la cual se supone no hay sustratos limitantes y no hay degradación de los productos, este método tiene en cuenta el C_T de cada una de las muestras que se define como el ciclo de la PCR en el cual se da un aumento significativo de la fluorescencia por encima del umbral respecto al background. Para la cuantificación relativa también se requiere de un gen que sea expresado a nivel constante entre todas las muestras, este control interno o referencia (GR) es usado para corregir cualquier diferencia entre las muestras. Una vez se tiene el valor de C_T de cada una de las muestras se

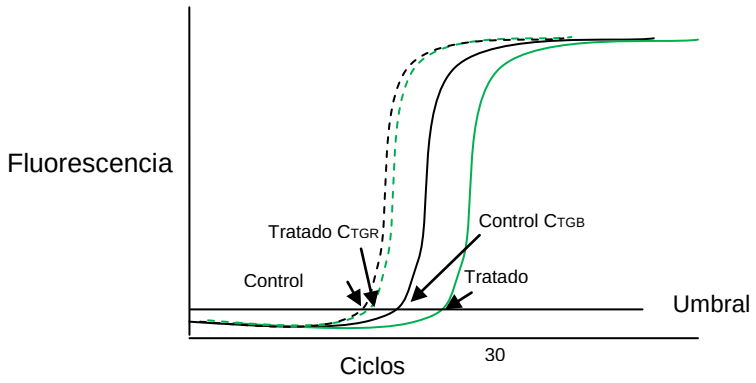
puede generar un nivel de expresión relativa del gen de interés o blanco (GB), utilizando la siguiente ecuación.

Ecuación 2-1. Calculo de la expresión relativa

$$2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-(C_{TGB} - C_{TGR})tratado _ (C_{TGB} - C_{TGR})control}$$

En la gráfica 2-1 Se tienen dos muestras control y tratado (diferente condición respecto al control puede ser un tiempo diferente, aplicación de una sustancia de interés entre otras) y se ha medido un gen blanco y un gen de referencia.

Gráfica 2-1. Esquema de curvas de amplificación obtenidos en PCR en tiempo real.



$\Delta\Delta CT = (C_{TGB} - C_{TGR})tratado _ (C_{TGB} - C_{TGR})control$

$\Delta\Delta CT = (24 - 20) - (22-20)$

$\Delta\Delta CT = (4 -2)$

$\Delta\Delta CT = (2)$

$2^{-(4-2)} = 0,25$

Significaría que el nivel de expresión del gen de interés está en un 25% con relación a la muestra control.

Adicional a este método se han descritos otros alternativos igualmente validos, que asumen valores de eficiencia diferentes al 100% como es el método de Pfaffl, (2001) o métodos como el propuesto por Muller *et al*, (2002) que incluyen el cálculo del error estándar de la expresión normalizada mediante la aplicación de la ecuación de Gauss

2.3.3 Calculo de expresión diferencial

Para la selección del gen de referencia se evaluaron los primers diseñados a partir de los genes Houskeeping β-actina y factor de elongación sobre el cDNA de los diferentes clones a las diferentes horas posinoculación, con las condiciones descritas en el numeral anterior. Se seleccionó el gen que presentó menos variación el cual fue utilizado como gen de referencia para la evaluación de la expresión de los genes blanco seleccionados (TDFs).

Para evaluar la expresión diferencial de los genes blanco seleccionados se montaron en una misma placa de PCR de 96 pozos los genes blanco junto con el gen de referencia sobre el cDNA de cada clon (resistente parcial o total y susceptible) en los diferentes tiempos posinoculación por triplicado, como se muestra en la Figura 2-4. Los controles de RNA tratado con DNasa I se amplificaron por PCR convencional utilizando temperaturas de asociación y posteriormente se visualizaron en geles de agarosa al 1.2 %.

Figura 2-4. Esquema utilizado para montar los ensayos de qRT-PCR en placas de 96 pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	$S_0$1	$S_0$2	$S_0$3	S_{24}1	S_{24}2	S_{24}3	S_{48}1	S_{48}2	S_{48}3	S_{114}1	S_{114}2	S_{114}3
B	$RT_0$1	$RT_0$2	$RT_0$3	RT_{24}1	RT_{24}2	RT_{24}3	RT_{48}1	RT_{48}2	RT_{48}3	RT_{114}1	RT_{114}2	RT_{114}3
C	$S_0$1	$S_0$2	$S_0$3	S_{24}1	S_{24}2	S_{24}3	S_{48}1	S_{48}2	S_{48}3	S_{114}1	S_{114}2	S_{114}3
D	$RT_0$1	$RT_0$2	$RT_0$3	RT_{24}1	RT_{24}2	RT_{24}3	RT_{48}1	RT_{48}2	RT_{48}3	RT_{114}1	RT_{114}2	RT_{114}3
E	$S_0$1	$S_0$2	$S_0$3	S_{24}1	S_{24}2	S_{24}3	S_{48}1	S_{48}2	S_{48}3	S_{114}1	S_{114}2	S_{114}3
F	$RT_0$1	$RT_0$2	$RT_0$3	RT_{24}1	RT_{24}2	RT_{24}3	RT_{48}1	RT_{48}2	RT_{48}3	RT_{114}1	RT_{114}2	RT_{114}3
G	CR_{FE}1	CR_{FE}2	CR_{TDF3}1	CR_{TDF3}2	CR_{TDF5}1	CR_{TDF5}2						
H												

Gen de referencia factor de elongación (FE) en el clon susceptible (S) RRIM-600 y el resistente total FX-2261 (RT) a 0, 24, 48 y 114 h posinoculación por triplicado. DF2 en el clon susceptible (S) RRIM-600 y Fx2261 (RT) a 0, 24, 48 y 114 h posinoculación por triplicado. TDF5 en el clon susceptible (S) RRIM-600 y Fx2261 (RT) a 0, 24, 48 y 114 h posinoculación por triplicado. Control de reactivos (CR) para cada juego de primers utilizado en la PCR.

Para la estimación de la expresión relativa de cada gen blanco respecto al gen de referencia se aplicó el método de Muller *et al*, (2002) (Ecuación 2-2 y 2-3) mediante el software Q-Gene (Muller *et al*. 2002).

Ecuación 2-2. Cálculo de la expresión normalizada promediando los tres valores de las replicas de cada C_T

$$MNE = \frac{(E_{GB})^{CTGB\ promedio}}{(E_{GR})^{CTGR\ promedio}}$$

Ecuación 2-3. Ecuación para el cálculo del error estándar de la expresión normalizada

$$\Delta MNE = \frac{(E_{GB})^{CTGB\ promedio}}{(E_{GR})^{CTGR\ promedio}} \sqrt{(\ln(E_{GB}) * \Delta CT_{GB\,promedio})2 \quad (ln(E_{GR}) * \Delta CT_{GR\,promedio})2}$$

MNE. Medida normalizada de la expresión; **E_{GB}**. Valor de la eficiencia calculada en la PCR para el gen blanco; **E_{GR}** Valor de la eficiencia en la PCR para el gen de referencia; **CT_{GB}**. Ciclo de la PCR en el que inicio la amplificación del gen blanco; **CT_{GR}**. Ciclo de la PCR en el que inicio la amplificación del gen de referencia.

2.3.4 Validación del TDFMu1

Para la validación del TDFMu1 (*Transcription-derived fragment* – *M. ulei* - denominadas así a las secuencias con similaridad a proteínas fúngicas) se realizó PCR utilizando primers (Tabla 5-1) diseñados a partir de la secuencia obtenida (Anexo E), y DNA de los aislamientos de *M. ulei* RCP009 y GCL009. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 µL, usando 2,5 µL Buffer de 10X, 1 µL de $MgCl_2$ (50 mM), 0,3 µL de dNTPs (20 mM), 1,25 µL de cada uno de los primers (10 µM), 2,5 U de Taq DNA polimerasa acuprime de (invitrogen) y 5 µL de DNA (5ng/µL). Para la amplificación se utilizó una temperatura inicial de 94 ^oC por 5 min, seguidos por 34 ciclos con condiciones de tiempos y temperaturas de 94 ^oC por 30 seg, 57 ^oC por 30 seg y 72 ^oC por 30 seg, finalmente 72 ^oC por 10 min.

El amplímero obtenido se clonó en el plásmido pGEM-T Easy® (Promega) y se secuenció. La secuencia obtenida se comparó con el TDFMu1 original mediante el programa bl2Seq. Adicionalmente se realizó amplificación por PCR sobre DNA obtenido de plantas sanas y enfermas de los clones RRIM 600, FX 3864 y FX 2261, como control se amplificó la región ITS de plantas y aislamientos de *M. ulei* utilizando primers universales ITS1/ITS4 (White *et al*. 1990). Se utilizó la metodología para amplificación por PCR propuesta por Pérez-Vera *et al*, (2005). Finalmente se evaluó la expresión por qRT-

PCR sobre cDNA de los clones RRIM 600, FX 3864, FX 2261 inoculados con el aislamiento GCL009 a las 0, 24, 48 y 144 hpi.

RESULTADOS Y DISCUSION

Capítulo 3

SUSCEPTIBILIDAD DE CLONES DE CAUCHO NATURAL A AISLAMIENTOS DE *M. ulei* PROVENIENTES DE LA ORINOQUIA COLOMBIANA

Capítulo 4

IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN CLONES DE *H. brasiliensis* SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A *M. ulei*

Capítulo 5

VALIDACIÓN DE GENES DE EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN LA INTERACCIÓN *M. ulei-H.brasiliensis*

Capítulo 3

3. SUSCEPTIBILIDAD DE CLONES DE CAUCHO NATURAL A AISLAMIENTOS DE *M. ulei* PROVENIENTES DE LA ORINOQUIA COLOMBIANA

3.1 Aislamientos de *M. ulei.*

De 20 aislamientos obtenidos a partir de foliolos infectados se seleccionaron seis que mostraron abundante esporulación en cultivo in vitro (Tabla 3-1 y Anexo B), los aislamientos presentaron una estructura macroscópica con formación de estromas de color café oscuro hasta gris oscuro con presencia de micelio corto de color café o grisáceo con apariencia aterciopelada. A nivel microscópico se observó micelio dematiaceo con septos y presencia de conidióforos en forma de botella, desarrollo simpodial de conidias solitarias, septadas o sin este, sigmoides o curvadas, lisas y hialinas con un tamaño entre 15–65 x 6–11 µm característicos de *F. heveae* (Figura 3-1).

Tabla 3-1. Aislamientos de *M. ulei* que presentaron abundante esporulación.

Aislamiento	Procedencia	Fecha de colección	Región	Clon desde donde fue aislado
IBUN-SINCHI Mu1	Mavalle S.A	1-04-2006	Puerto López – Meta	GT1
IBUN-Mu67	Mavalle S.A	14-05-2006	Puerto López – Meta	RRIM 600
IBUN-Mu75	Cauchopar	25-06-2006	Paratebueno-Cundinamarca	Vivero
IBUN-Mu93	Mavalle S. A.	24-09-2007	Puerto López – Meta	Vivero
GCL009	Corpoica La libertad	2009	Villavicencio – Meta	GT 1
RCP009	Cauchopar	2009	Paratebueno-Cundinamarca	RRIM 600

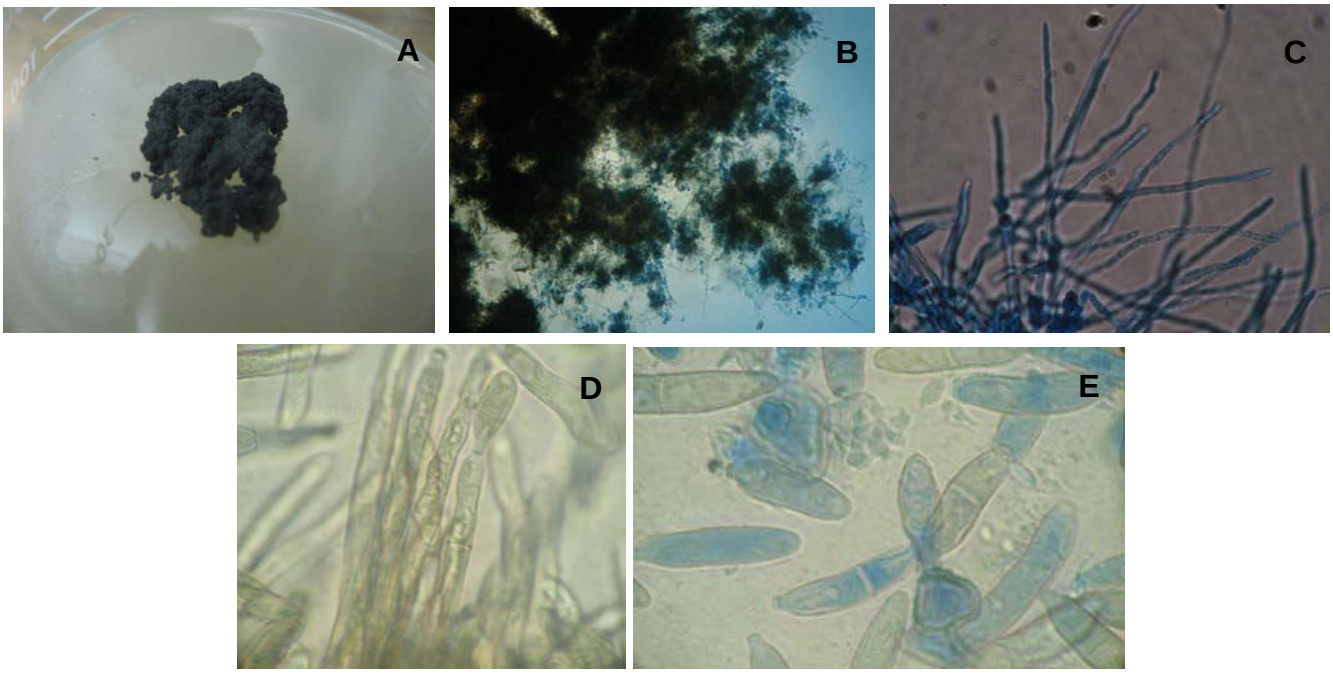


Figura 3-1. Estructuras macro y microscópicas de *M. ulei* in vitro. **A.** Estroma de *M. ulei* obtenido en medio de mantenimiento (45 días). **B.** Estroma de *M. ulei* (100x)**. C.** Micelio de *M. ulei* (450x). **D.** Formación de conidias y conidioforos de *M. ulei*. (1000x). **E.** Conidias de *M. ulei* obtenidas in vitro (1000x).

Mediante la amplificación por PCR con los primers universales ITS1/ITS4 se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 510 pb (Figura 3-2). El análisis realizado contra la base de datos del GenBank de la seis secuencias ITS consenso (Anexo D), cuatro de las cuales se indexaron en el GenBanK, mostró un mayor porcentaje de identidad con especies del género *Mycosphaerella*. La obtención de la secuencia ITS por primera vez descrita para *M. ulei* permitió establecer que el gen rRNA 5.8S corresponde a una secuencia de 161 pb, La región ITS1 a un fragmento con un tamaño entre 150 y 159 pb y la región ITS2 a un fragmento entre 168 y 170 pb. Tamaños similares han sido publicados para algunas especies de la familia *Mycosphaerella* como *Pseudosercospora fijiensis* que corresponde al estado anamórfico de la especie *Mycosphaerella fijiensis*.

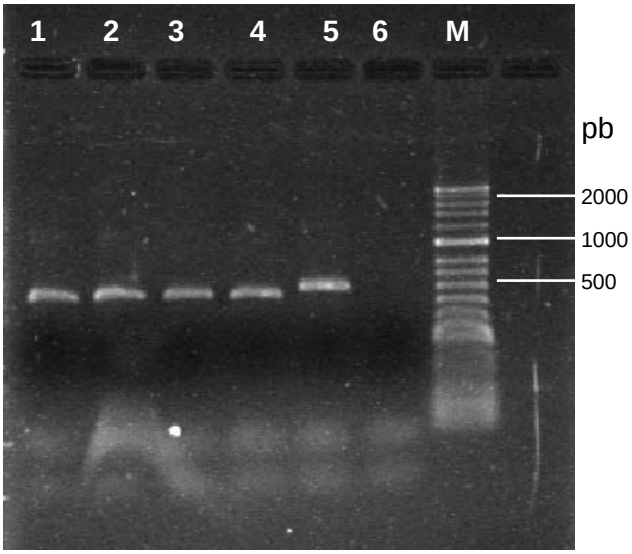


Figura 3-2. Amplímeros obtenidos de la región ITS. Carril (1 al 4) aislamientos de *M. ulei* IBUN-SINCHI Mu1, IBUN-Mu67, IBUN-Mu75 y IBUN-Mu93 respectivamente. (5) *Asperguillus níger*, (6) control de reactivos de la PCR, (M) marcador de peso molecular hiper ladder II de BioLine. Registro fotográfico tomado en el equipo GelDoc System de BioRad®.

La especie más cercana fue *Stigmina* sp. (estado anamorfo de *Mycosphaerella polymorpha)*, con un porcentaje de identidad del 87% y un valor E de $6e^{-159}$, adicionalmente se relacionaron con un alto porcentaje de identidad algunas especies de *Septoria y Pseudocercospora* que corresponden a estados anamórficos o imperfectos de algunas especies de la familia *Mycosphaerella*. Estos resultados son congruentes con los mostrados por Feau *et al*, (2006) quienes evaluaron 36 morfo-especies del género *Septoria* mediante el análisis de las secuencias de la región ITS, mtSSU-rDNA y β-

tubulina encontrado alta heterogeneidad así como origen polifilético de las especies y algunos fueron relacionados con linajes de *Mycosphaerella*. La comparación con otras secuencias ITS de especies del género *Fusicladium* en el cual está clasificado el estado anamórfico del hongo *M. ulei* no mostró alta identidad, confirmando que la clasificación de *M. ulei* se debe hacer con base en su fase teleomórfica o sexual (Cannon *et al*.1995).

El análisis de agrupamiento realizado entre los seis aislamientos mostró que RCP009 proveniente de Paratebueno - Cundinamarca (recolectado en 2009), fue el aislamiento que se agrupó con mayor distancia genética (Figura 3-3) con relación a los otros cinco aislamientos de Villavicencio y Puerto López Meta (recolectados entre 2006 y 2009), que fueron muy similares genéticamente y se consideraron como grupo I. A su vez RCP009 (grupo ll) mostró con relación a los demás aislamientos un menor tiempo de formación de conidias 10 días en condiciones in vitro y un porcentaje de germinación de 100% de las conidias obtenidas in vitro, este porcentaje fue evaluado a las 24 h pos siembra en placas de agar PDA. En tanto que en los demás aislamientos (grupo l) se observaron conidias a los 12 - 14 días y el porcentaje de germinación estuvo entre el 70 y el 80%.

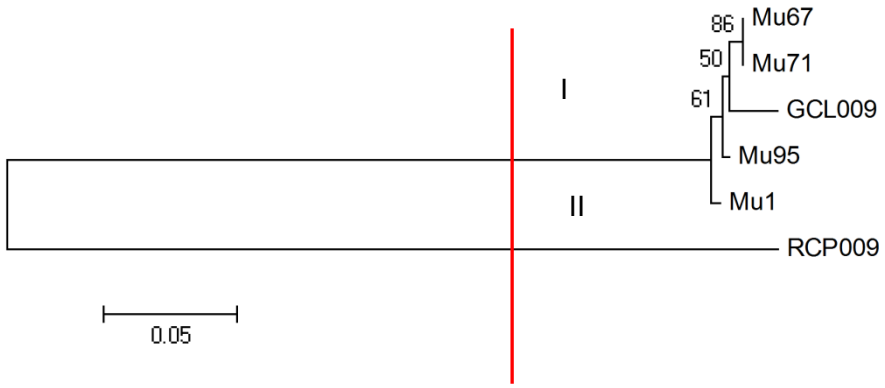


Figura 3-3. Análisis de agrupamiento realizado con los aislamientos de *M. ulei* seleccionados. Se aplicó un alineamiento múltiple con Muscle con 300 iteraciones mediante el programa Workbench 6.0, el dendograma se realizó con el programa MEGA 4.1utilizando el algoritmo Neibor Joininig y un Boostrap de 10000.

El desarrollo morfológico de *M. ulei* en condiciones in vitro realizado por Lieberei *et al*, (1984) quienes evaluaron diferentes medios y condiciones de cultivo reportan un tiempo de germinación de conidias entre 12 y 24 h el cual es similar al tiempo encontrado en este trabajo. Los tiempos de generación de conidias in vitro establecidos por esto mismos autores en medios de cultivo estándar, vario entre 7 y 24 días. Sin embargo, los tiempos

obtenidos no fueron asociados a la capacidad de infección ya que no se realizaron pruebas de patogenicidad. En el estudio realizado por Junqueira *et al*, (1986) se encontró un porcentaje de germinación in vitro de aislamientos obtenidos de diferentes regiones de Brasil entre el 70 y el 87%, no se reporta ningún aislamiento con un porcentaje del 100% como es el caso del aislamiento RCP009. Tampoco reportan ensayos que asocien porcentaje de germinación in vitro con capacidad de infección.

A partir de los resultados de desarrollo in vitro (porcentaje de germinación y formación de conidias) y del análisis de agrupamiento de la región ITS de los seis aislamientos se escogieron dos correspondientes a: RCP009 único aislamiento del grupo II y GCL009 aislamiento del grupo I el cual presentaba menor número de repiques in vitro. Los dos aislamientos fueron utilizados para realizar pruebas de patogenicidad con el fin de establecer la susceptibilidad de cinco clones de caucho natural a estos.

3.2 Material vegetal

La confirmación de la identidad varietal de los clones RRIM 600, PB 260, FX 3864, IAN 710 y FX 2261 mediante cuatro microsatélites amplificados por PCR (AY486867 primers SSRHb102; AY486866 primers SSRHb103; AY486754 primers SSRHb358 y AY486707 primers SSRHb403)**,** permitió confirmar la identidad respecto a los patrones de referencia provenientes de la plantación de Tres Pancadas de la Michelin en Bahía Brasil. Se descartaron las plántulas que presentaron algún alelo diferente a los esperados (Figura 3-4). La tabla 3-2 muestra el tamaño de los alelos obtenidos para cada clon con cada uno de los microsatélites amplificados.

En la figura 3-4 se muestran los perfiles electroforéticos obtenidos para tres de los cinco clones evaluados en donde se observa que los individuos 1 del clon FX 3864 y el 3 del clon IAN 710 presentan alelos en posiciones diferentes con relación al patrón de referencia. En algunos casos los perfiles obtenidos de algunos individuos considerados de un determinado clon coincidieron con los de otro, se observa que el individuo 3 del IAN 710 presentó alelos que coincidieron con el patrón de referencia del clon FX 3864 por lo que se consideró como un individuo de este clon. Los anteriores resultados evidencian la desorganización de jardines clonales de donde proviene el material vegetal. Estos resultados corroboran los obtenidos mediante el análisis de muestras foliares de 9 jardines clónales del país a través de marcadores tipo microsatélites, en donde se

encontró no conformidad para algunos de los materiales vegetales hasta de un 50% (MADR 2010).

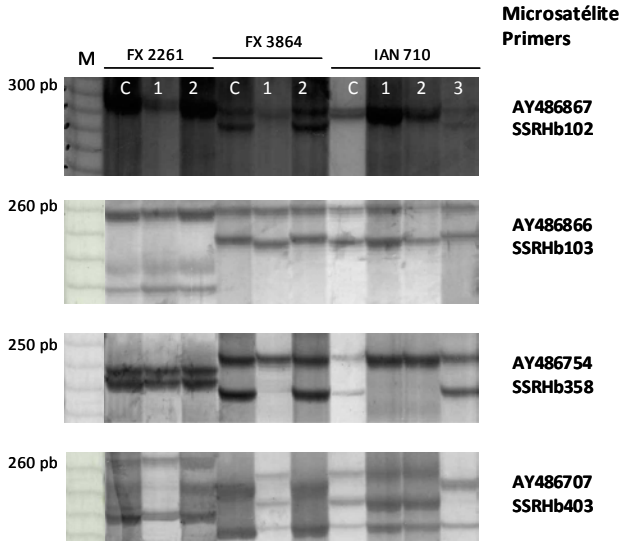


Figura 3-4. Perfiles electroforéticos obtenidos con los cuatro microsatélites amplificados en tres de los clones evaluados FX 2261, FX 3864, IAN 710. M. Marcador de peso molecular ladder 10 pb® (Invitrogen) **C**. Patrón de referencia de cada clon. **1**, **2** y **3**. Ejemplo de perfiles obtenidos de algunos individuos evaluados por clon. La electroforesis se realizó en geles de acrilamida al 7% teñidos con nitrato de plata.

Tabla 3-2. Tamaños de alelos (pb) obtenidos para los patrones de referencia de cada clon, con cuatro microsatélites evaluados.

Microsatélites ID del GenBank	**AY486867**		**AY486866**		**AY486754**		**AY486707**	
Primers	**SSRHb102**		**SSRHb103**		**SSRHb358**		**SSRHb403**	
Clones	**Tamaño de alelos en pb**							
RRIM 600	290	288	235	235	238	238	248	239
PB 260	279	278	282	235	240	240	252	238
IAN 710	272	270	262	262	236	220	248	224
FX 3864	278	270	262	246	236	222	250	226
FX 2261	288	286	258	252	232	200	262	234

Los resultados adicionalmente muestran la utilidad de los marcadores moleculares tipo microsatélites para la identificación varietal de clones de caucho, la cual es muy importante en el establecimiento de cultivos comerciales. A nivel de plantaciones la siembra equivocada de material implica un gran riesgo para el desarrollo de epidemias de *M. ulei* ya que el establecimiento de material altamente susceptible en zonas de no escape al SALB, conlleva un manejo difícil del cultivo con aplicaciones intensivas de fungicidas aumentando los costos de mantenimiento o la perdida de los árboles al quinto año de siembra.

3.3 Pruebas de patogenicidad en condiciones controladas.

La evaluación de la susceptibilidad a los aislamientos de *M. ulei* RCP009 y GCL009 de cinco clones de caucho natural, se hizo mediante inoculación de conidias obtenidas in vitro en condiciones controladas, los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3-3. El control de viabilidad del inóculo medido a través del porcentaje de la germinación de conidias y realizado mediante siembra de 20 µl de este en cajas de petri con medio PDA, fue del 80% para GCL009 y del 100% para RCP009 (Figura 3-5), coincidiendo con los resultados previamente obtenidos de desarrollo morfológico in vitro de los aislamientos.

Los clones PB 260 y RRIM 600 considerados como altamente susceptibles a cualquier aislamiento de *M. ulei*, presentaron aparición de los primeros síntomas de deformación foliar en el caso de RCP009, a los 4 días de ser inoculado y 6 días en el caso de GCL009 (Figura 3-6). De acuerdo con lo reportado por Lieberei, (2007), en estos clones susceptibles la penetración ocurre durante las primeras horas con o sin formación de apresorio y posteriormente se lleva a cabo la elongación de las hifas por el espacio apoplástico (tercer y quinto día) con la subsecuente formación de pseudohifas. La IE evaluada 15 días posinoculación fue de 5 (Figura 3-7), lo cual permitió asegurar que la capacidad de infección de estos dos aislamientos se mantuvo después de haber sido transferidos a in vitro.

El clon IAN 710 forma parte de una línea de clones híbridos inter-especie *H. brasiliensis x H. benthamiana*, con resistencia total o parcial a algunos aislamientos de *M. ulei* de diferentes regiones de Brasil y susceptible a otros (Mattos, *et al* 2003, Furtado, 1995). En este estudio no presentó síntomas visibles con el aislamiento GCP009 ni esporulación (IE=1), en tanto que con el aislamiento RCP009 6 días posteriores a la inoculación se

observó la aparición de los primeros síntomas (Figura 3-8) y se obtuvo una IE de 5 (Figura 3-9).

El clon FX 3864 ampliamente difundido en Brasil y en la Altillanura Colombiana, ha sido considerado como susceptible a aislamientos presentes en diferentes regiones caucheras de Brasil y con resistencia parcial a otros, desde hace varias décadas (Furtado 1995; Mattos *et al.* 2003). Sin embargo en la altillanura Colombiana hasta el 2010 fue considerado resistente total, en este año se reportó por primera vez la presencia de individuos del clon con lesiones esporuladas (García *et al*. 2011). Las pruebas de patogenicidad realizadas en esta investigación mostraron que con el aislamiento GCP009 no se presentaron síntomas y se obtuvo una IE=1, con el aislamiento RCP009 se obtuvo la aparición de síntomas a los 6 días posinoculación y se observó la formación de estromas a nivel microscópico 15 días posinoculación (Figura 3-10). De acuerdo con la IE=3 se consideró este clon como susceptible a este aislamiento.

Se sabe que la formación estructuras estromáticas con pseudotecios y ascosporas se da en clones que presentan foliolos con baja incidencia de la enfermedad, estos foliolos se mantienen en los árboles a diferencia de los que presentan alta severidad los cuales caen (Lieberei, et al, 2007). De acuerdo con Chee & Holliday, (1986) en hojas levemente infectadas los estromas son visibles en la parte adaxial y en estos se desarrolla el estado sexual del hongo. Los clones que presentan abundante formación de estromas constituyen un alto riesgo para el desarrollo de epidemias en plantación ya que permiten la sobrevivencia de *M. ulei* en periodos largos de sequía y la posterior liberación de las ascosporas. Estas en condiciones favorables se convierten en el inoculo primario.

Tabla 3-3. Reacción de cinco clones de caucho natural a la inoculación con dos aislamientos de *M. ulei*.

			Aislamientos de *M. ulei*			
			GCL009		RCP009	
Clon	**Parentales**	**Especie de Hevea**	**Reacción**	**IE**	**Reacción**	**IE**
RRIM 600	Tjir1 X PB86	*H. brasiliensis* x *H. brasiliensis*	S	5	S	5
PB 260	PB5/51 x PB/578	*H. brasiliensis* x *H. brasiliensis*	S	5	S	5
IAN 710	PB 86 x F409	*H. brasiliensis X H. benthamiana*	R	1	S	4
FX 3864	PB 86 x B 38	*H. brasiliensis* x *H. brasiliensis*	R	1	S	3
FX 2261	F 1619 x Avros 1883	*H. brasiliensis* x *H. brasiliensis*	R	ND	ND	1 (HR)

S, Presentaron esporulación del patógeno IE>2. **R,** Ausencia de lesiones no esporulación o IE =2. **IE** Intensidad de esporulación. **HR**, respuesta hipersensible. **ND,** no determinado.

Figura 3-5.

Figura 3-6.

Figura 3-7.

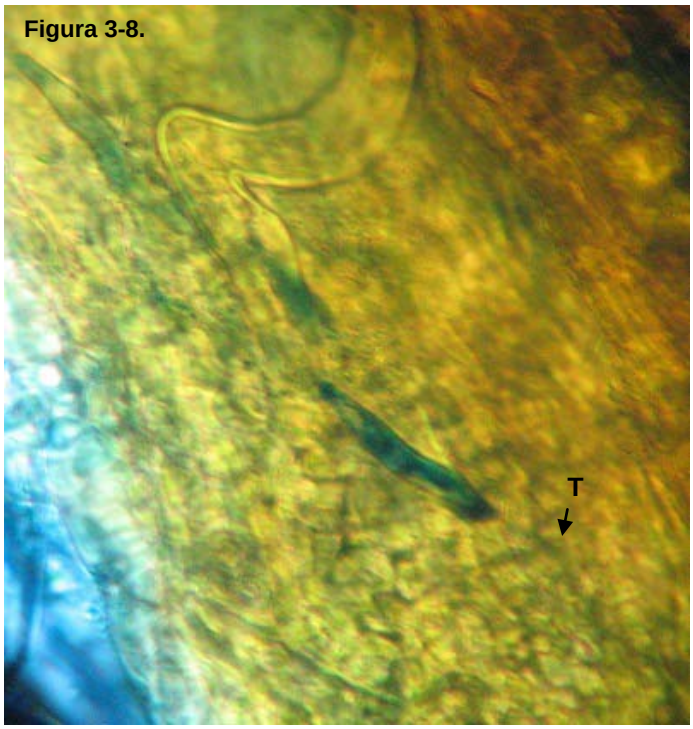


Figura 3-8.

Figura 3-5. Control de viabilidad del inóculo. Germinación Conidias germinadas in vitro del aislamiento de *M. ulei* RCP009 a las 24 horas después de la siembra en medio PDA (100x).

Figura 3-6. Foliolos del clon RRIM-600 a los 6 días posinoculación con el aislamiento de *M. ulei* RCP009.

Figura 3-7. Lesiones esporuladas en el clon RRIM-600 a los 12 días posinoculción con el aislamiento de *M. ulei* RCP009 (10x).

Figura 3-8. Conidias del aislamiento de *M. ulei* RCP009 a los 6 días posinoculación en el clon IAN 710. Tinción con azul de lactofenol, (1000x). **T.** Tubo germinativo.

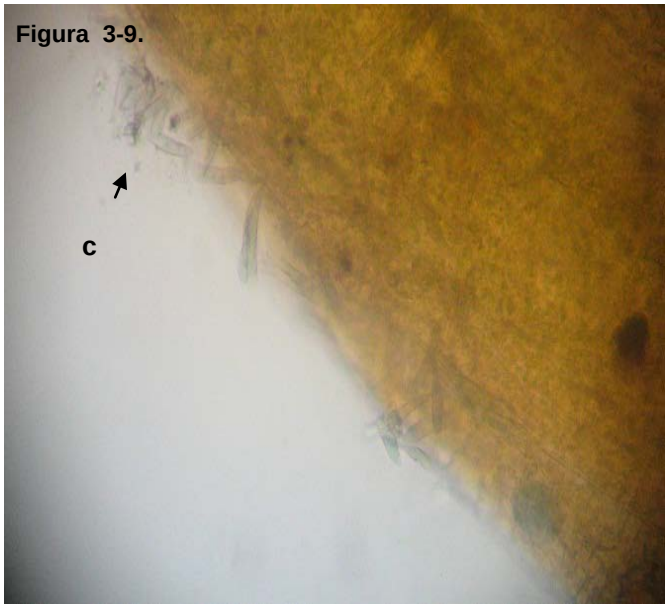


Figura 3-9.

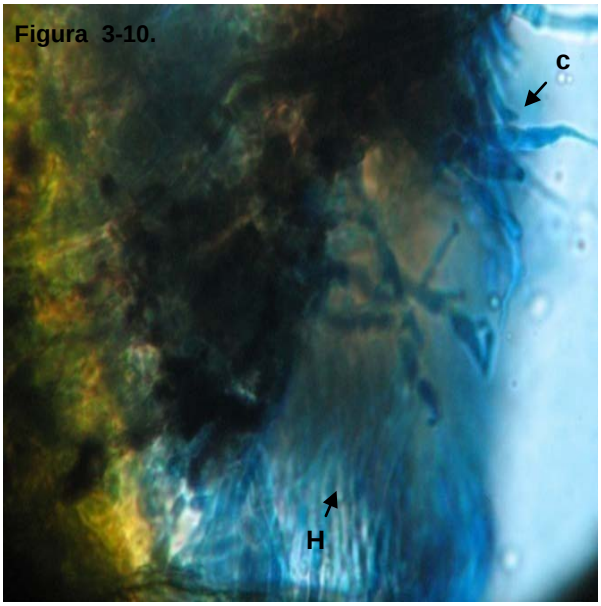


Figura 3-10.

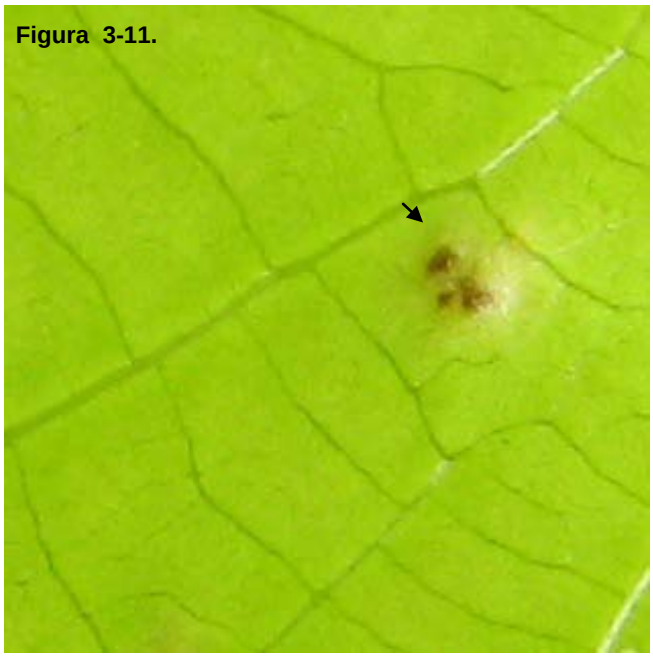


Figura 3-11.

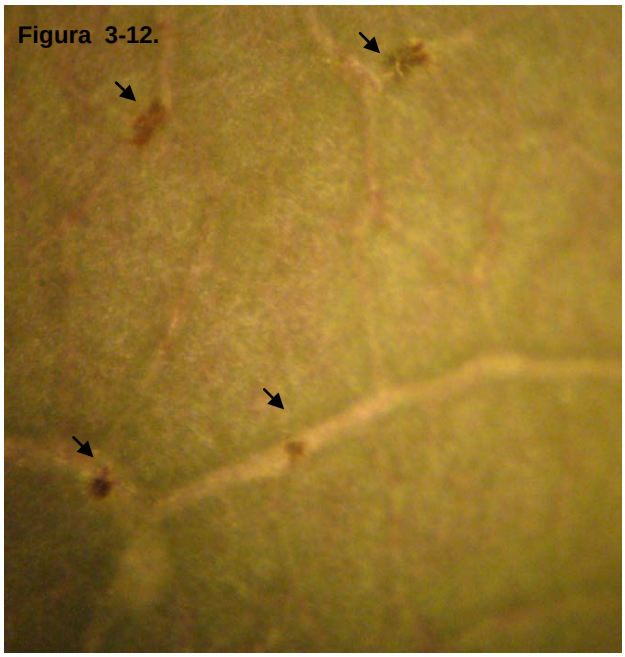


Figura 3-12.

Figura 3-9. Esporulación del aislamiento de *M. ulei* RCP009 a los 12 días posinoculación en el clon IAN 710. Tinción con azul de lactofenol (450x). **c**. Conidias.

Figura 3-10. Formación de estructuras estromáticas en el clon FX 3864 a los 15 días posinoculación con el aislamiento de *M. ulei* RPC009. Tinción con azul de lactofenol. (1000x). **C**. Conidioforos. **H**. Hifas formando una estructura estromática.

Figura 3-11. Manchas necróticas foliolo (parte adaxial) del clon FX 2261 a los 15 días posinoculación con el aislamiento de *M. ulei* GCP009.

Figura 3-12. Manchas necróticas foliolo (parte abaxial) clon FX 2261 a los15 días posinoculación con el aislamiento de *M. ulei* GCP009.

El clon FX 2261 considerado con resistencia total o parcial a algunos aislamientos de *M. ulei* de Brasil, presentó resistencia total al aislamiento GCL009, esta fue la única interacción en la cual se observó formación de manchas necróticas 15 días posteriores a la inoculación con un tamaño entre 1 y 3 mm que corresponderían a una respuesta de hipersensibilidad (Figuras 3-11 y 3-12). No fue posible determinar la susceptibilidad al aislamiento RCP009 por el bajo número de plántulas con las que se contaba de este clón. La respuesta de resistencia del clon FX 2261 de acuerdo con García *te al*. (1995) esta relacionada con la rápida producción y mayor concentración de escopoletina con relación a clones susceptible. La actividad antifúngica de esta fitoalexina fue evaluada in vitro encontrandose que inhibe la germinación y la elongación del tubo germinativo. También se asocio la resistencia con la acumulación de lignina en el sitio de la penetración.

Los resultados obtenidos respecto a *M. ulei* muestran que los dos aislamientos evaluados presentan una diferencia en su virulencia ya que RCP009 fue capaz de infectar y generar esporas en el clón IAN 710 a diferencia de GCP009 que no lo infecto. La mayor virulencia observada en el aislamiento RCP009 se podría asociar a su capacidad para esporular en un menor tiempo (periodo de latencia) en condiciones in vitro y su porcentaje de germinación (100%) respecto al otro aislamiento evaluado.

3.4 Conclusiones

El análisis de la región ITS completa (ITS1/5.8S/ITS2) de los seis aislamientos permitió inferir que estos corresponden a una misma especie y confirma la utilidad de este tipo de secuencia para análisis a este nivel, adicionalmente fue posible confirmar la inclusión del género *Microcyclus* dentro de la familia *Mycosphaerella*, clasificación realizada por Cannon *et al*, en 1995 a través de caracteres morfológicos.

La interacción compatible observada en condiciones controladas entre el clon FX 3864 y el aislamiento de *M. ulei* RCP009, correspondiente a una intensidad de esporulación de tres. Confirma los resultados previamente reportados por García et al, (2011), quienes informan la aparición de individuos de este clon con lesiones esporuladas en la altillanura Colombiana en donde se consideraba resistente total a las poblaciones de *M. ulei* presentes.

La evaluación de los dos aislamientos frente al clon IAN 710 (hibrido inter-especie *H. brasiliensis* X *H. benthamiana*) de caucho natural con resistencia a algunas razas de *M. ulei*, mostró que estos presentaron virulencia diferencial, RCP009 generó signos y síntomas de SALB en tanto que GCL009 no. Resultados similares fueron observados con el clon FX 3864

Capítulo 4

4. IDENTIFICACIÓN DE GENES EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN CLONES DE *H. brasiliensis* SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A *M. ulei*

4.1 cDNA-AFLPs

Los perfiles electroforéticos obtenidos mediante cDNA-AFLPs para cada uno de los clones RRIM-600 (S), IAN-710 (R), FX-3864 (R) inoculados con el aislamiento de *M. ulei* GCL009 y analizados a los tiempos de 0, 24, 48 y 144 horas posinoculación (hpi), mostraron un bajo número de bandas (entre 2 y 6) al realizar la amplificación con primers que tenían tres bases de selección: E-AAC/M-CTA; E-ACA/ M-CTC; E-ACT/M-CTG y EAA-G/M-CTT (Figura 4-1), por lo que se decidió realizar las demás amplificaciones con primers con dos bases de selección únicamente. El estudio realizado por Santaella *et al*, (2003) utilizando cDNAS-AFLPs para evaluar la expresión diferencial génica de una interacción incompatible *Xanthomonas axanopodis* - Cassava reportan el uso de prmers con dos y tres bases de selección obteniéndose un mayor número de bandas con los primeros. Sin embargo en este trabajo se recomiendan algunos juegos de primers que incluyen tres bases de selección como altamente informativos.

A partir de las amplificaciones con 13 combinaciones de primers con bases de selección (Tabla 2-2) se escogieron y extrajeron de los geles de poliacrilamida teñidos con nitrato de plata un total de 99 bandas expresadas diferencialmente-TDFs (Figuras 4-1, 4-2, 4-3 y 4-4) en los tres clones a los cuatro tiempos posinfección. Estas se reamplificaron por PCR y se seleccionaron aquellos amplicones que presentaron una banda única en geles de agarosa al 2 % (Figura 4-5), se descartaron los que presentaron bandas inespecíficas y se reamplificaron aquellas que presentaron amplímeros con concentraciones bajas.

Se secuenciaron un total de 60 fragmentos con pesos entre 500 y 80 pb. De los fragmentos secuenciados, 6 de ellos: TDFHb10, TDFHb28B, TDFHb61, TDFHb73, TDHbF78 y TDFHb79 no presentaron una secuencia limpia y no fue posible analizarlos. Las secuencias consenso obtenidas mediante la edición manual con el programa Bioedit, y posteriormente ensambladas con los programas bl2seq y cap3 se muestran en el anexo E. Se obtuvieron 45 singletones y 4 contigs. La tabla 4-1 muestra de manera cualitativa la expresión de los TDFs obtenidos por cDNA-AFLPs a los diferentes tiempos posinoculación. El análisis funcional realizado a las secuencia consenso obtenidas para cada TDF con Blastn y tBlastx en la base de datos TIGR, Pithozome y NCBI se describen en la tabla 4-2. Para la asignación de función se consideraron los E-value < 10^{-2}, del total de secuencias obtenidas no fue posible asignar función o relacionar con secuencias de otros genomas al 16% (8/49).

El 40% de las secuencias presentaron similaridad a proteínas que aun no tienen una función anotada o no fue posible clasificar, entre estas las secuencias de los TDFHb27 y TDFHb29 presentaron similaridad con secuencias expresadas en relaciones simbióticas y la secuencia del TDHb55-56 con la del TDFHb70 presentaron similaridad a secuencias expresadas en interacciones planta-insecto. Su posterior estudio podría contribuir al entendimiento de estos dos tipos de interacciones.

Dos secuencias correspondientes al TDFMu1 y el TDFMu2 presentaron similaridad con secuencias de hongos ascomycotas, las 39 restantes corresponden a secuencias de diferentes especies vegetales siendo las más representadas *Ricinus cummunis* (4), *Populus trichocarpa* (4) *Manihot esculenta* (3) *Gossypium hirsutum* (2) *Citrus clementina* (2), y *Hevea brasiliensis* (2). Las 22 restantes mostraron homología con 22 especies diferentes respectivamente.

El TDFMu1 fue similar a la proteína extracelular ECP-5 de *Cladosporium fulvum* hongo causante del moho de la hoja del tomate (Butler & Jones 1949), forma parte de un grupo de cinco efectores que *C. fulvum* secreta al apoplasto de *Lycopersicum esculentum* (Joosten & De Wit 1999), estos han sido detectados en interacciones compatibles, además se ha demostrado que son reconocidos por las proteínas R Cf-ECP de *Solanum pimpinellifolum* que son del tipo RLK (KRUIJT *et al.* 2005; Soumpourou *et al.* 2007; van Esse *et al.* 2006).

E- AAC/M-CTA

Figura 4-1. Perfil electroforético con E-AAC/M-CTA. $S_{0\ -\ 144}$ clon susceptible RRIM-600 en los diferentes tiempos hpi con el aislamiento de *M. ulei* GCL009. $RT_{0\ -\ 144}$ clon IAN-710 resitente total en los diferentes tiempos (hpi). Gel de acrilamida al 4% teñido con nitrato de plata.

E- CT/M-AT

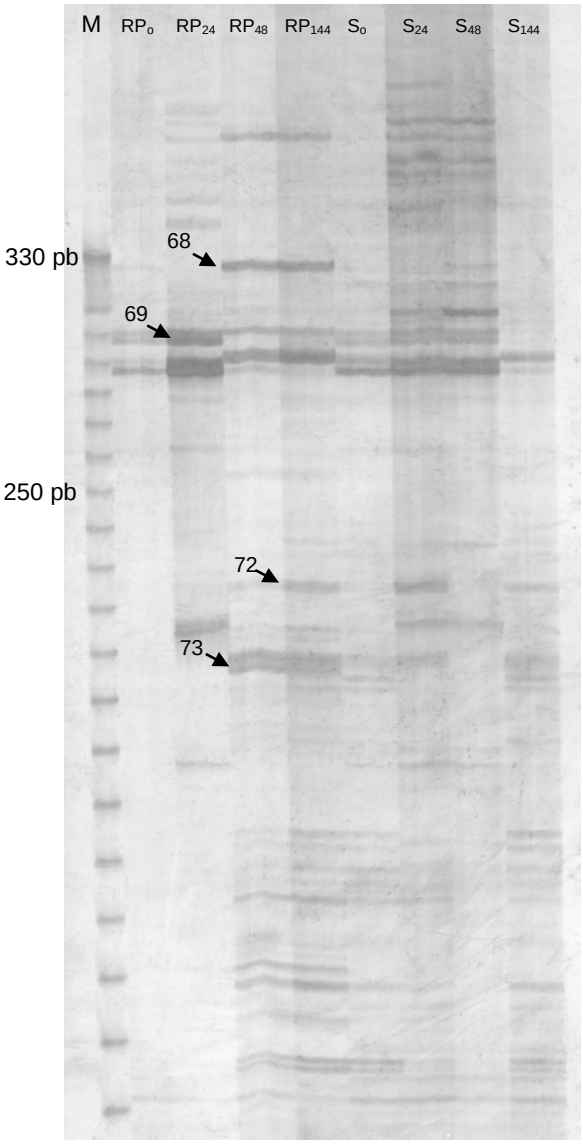


Figura 4-2. Perfil electroforético con E- CT/M-AT. $S_{0\ -\ 144}$ clon susceptible RRIM-600 en los diferentes tiempos hpi. $RT_{0\ -\ 144}$ clon IAN-710 resistente parcial en los diferentes tiempos (hpi). Gel de acrilamida al 4% teñido con nitrato de plata.

E-AA/M-AC

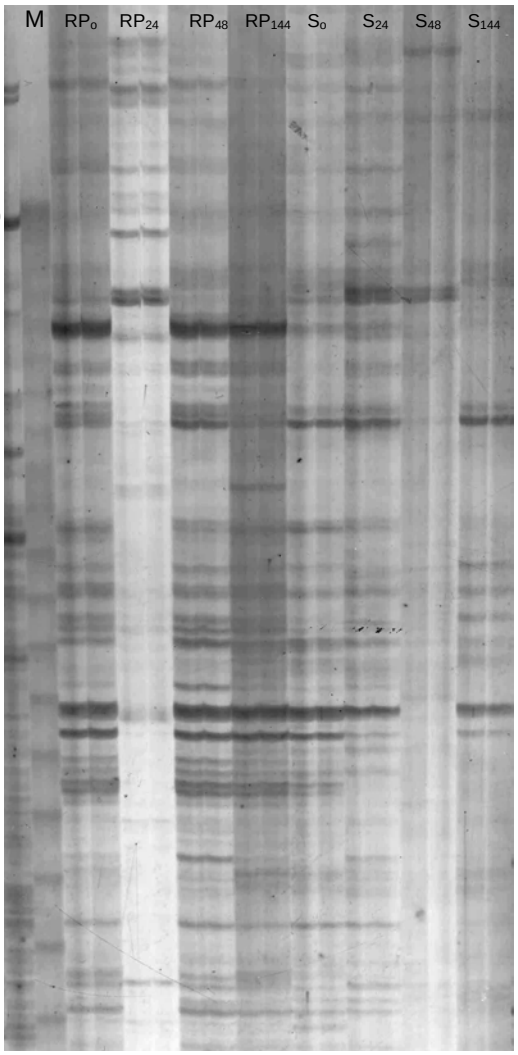


Figura 4-3. Perfil electroforético con E- CT/M-AT. $S_{0\ -\ 144}$ clon susceptible RRIM-600 en los diferentes tiempos hpi. $RT_{0\ -\ 144}$ clon FX-3864 resistente parcial en los diferentes tiempos (hpi). Gel de acrilamida al 4% teñido con nitrato de plata.

E-CT/M-GG

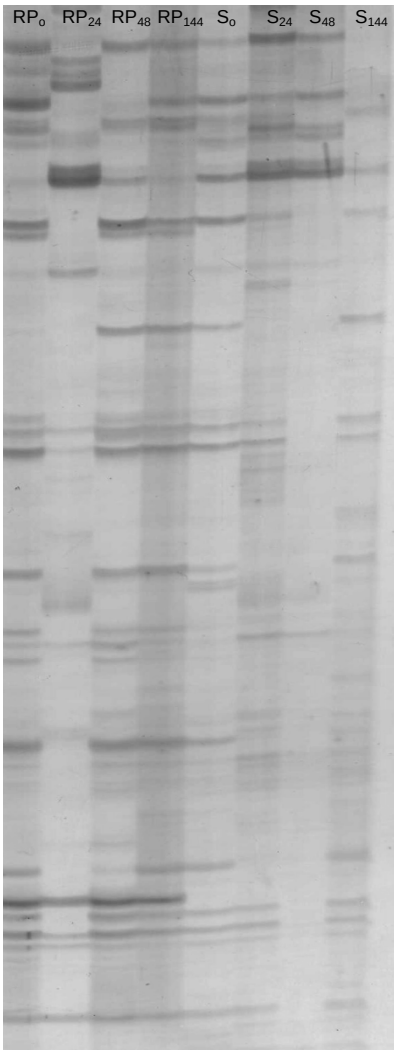


Figura 4-4. Perfil electroforético con E- CT/M-AT. $S_{0\ -\ 144}$ clon susceptible RRIM-600 en los diferentes tiempos hpi. $RT_{0\ -\ 144}$ clon FX-3864 resistente parcial en los diferentes tiempos (hpi). Gel de acrilamida al 4% teñido con nitrato de plata.

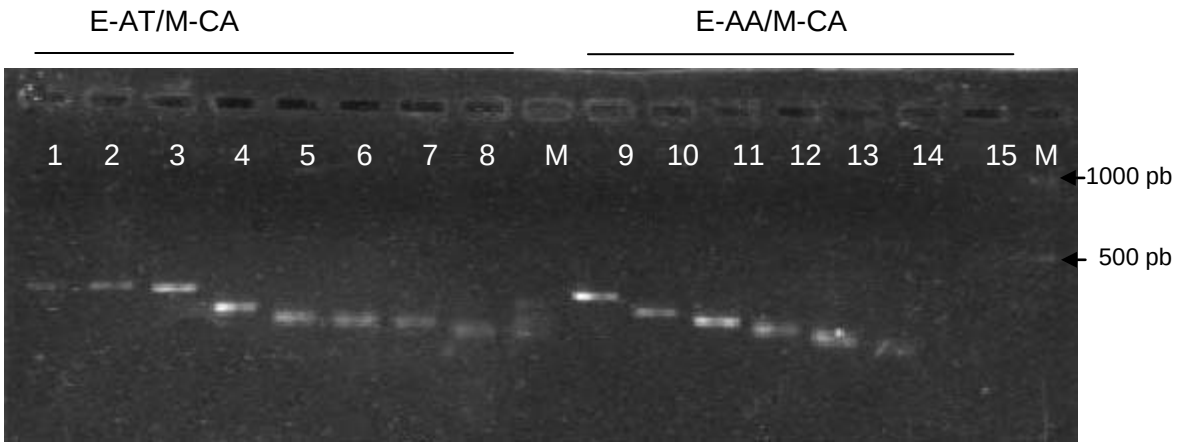


Figura 4-5. TDFs efluidos de geles de acrilamida y amplificados por PCR. **1** al **8**. TDF1-8 obtenidos con la combinación de primer E-AT/M-CA. **9** al **15.** TDF9-15 obtenidos con la combinación de primers E-AA/M-CA. **M**. Marcador de peso HyperLadder IV® (BioLine). Gel de Agarosa al 2% teñido con Sybr Safe™ (Invitrogen).

Tabla 4-1. Expresión diferencial cualitativa a los t 0, 24, 48 y 144 hpi en los clones RRIM 600 (S), IAN 710 (R) y FX 3864 (R). La X indica el tiempo al cual hubo sobreexpresión (mayor intensidad observada de la banda) en los perfiles electroforéticos con cDNA-AFLPs.

CLON		RRIM 600 (S)				IAN 710 (R)			
No	**TDF**	**0h**	**24**	**48h**	**144h**	**0h**	**24h**	**48h**	**144h**
1	TDFMu1		x	X	x		x	X	
2	TDFHb3		x			x			
3	TDFHb4						x	X	
4	TDFHb5						x	X	
5	TDFHb7	x	x						
6	contig1						x		
7	TDFHb11						x		
8	TDFHb12						x		
9	TDFHb13						x		
10	TDFHb14						x		
11	TDFHb15		x						

CLON		RRIM 600 (S)				FX 3864 (R)			
No	**TDF**	**0h**	**24**	**48h**	**144**	**0h**	**24h**	**48h**	**144h**
12	TDFHb17A					x			X
13	TDFHb18A	X					x		
14	TDFHb19A							X	
15	TDFHb20A						x		
16	Contig2(TDFHb						x		
17	TDF Hb21B						x		
18	TDFHb26B						x		
19	TDFHb27								
20	TDFHb29B		x	x			x	X	X

CLON		RRIM 600 (S)				FX 3864 (R)			
No	TDF	0	24h	48	144	0h	24h	48h	144h
21	TDFHb30B						x		
22	TDFHb37						x		
23	TDFHb38						x		
24	TDFHb39					x	x		
25	TDFHb40						x		
26	TDFHb41a		x	x			x		
27	TDFHb41		x	x			x		
28	TDFHb42a						x		
29	TDFHb42						x		
30	TDFHb43							X	
31	TDFHb44						x		
32	Contig 3						x		
33	TDFHb48	x			X			X	
34	TDFHb49							X	
35	TDFHb51						x		
36	TDFHb53						x		
37	TDFHb54		X	x				X	
38	Contig4	x	X	x					X
39	TDFHb57	X				x		X	
40	TDFHb59	X			X		x		
41	TDFHb63	X						X	X
42	TDFHb64	X				x		X	X
43	TDFHb65					x	x	X	X
44	TDFHb67						x	X	
45	TDFHb68							X	X
46	TDFHb70							X	X
47	TDFHb77			X			x		
48	TDFHb98		X	X			x		
49	TDFHb99		X	X			x		

TDFMu1 fue detectado a las 24 horas posinoculación en la interacción de los clones RRIM 600 y IAN 710 con GCL009, se sugiere que esta podría corresponder a un proteína efectora de *M. ulei*. Homólogos de este tipo de proteínas extracelulares también han sido reportados en otras especies de la familia *Mycosphaerellaceae* como es el caso de *M. fijiensis* (Stergiopoulos *et al.* 2010).

Dentro de las proteínas asociadas a defensa expresadas diferencialmente en los clones con resistencia más relevantes se encontraron los TDFHb5 y TDFHb68 que presentaron similaridad con proteínas R de especies vegetales. En el caso del TDFHb5 correspondiente a un fragmento de 163 pb sobrexpresado en el clon IAN 710 a las 24 h posinoculación, presentó similaridad (E value de $1.2e^{-06}$) con un dominio LRR del gen *Hcr2-5D* o *Cf-5* de *L. esculentum (Gossypium hirsutum*), homólogo al gen *Cf-2* el cual confiere resistencia contra algunos aislamientos de *C. fulvum* (Thomas 1998). Con un E value de $7.7e^{-07}$ el TDFHb68 de 260 pb, fue sobreexpresado a las 24 y 48 h posinoculación y presentó similaridad con una proteína R con dominio NBS de *Euphorbia*

eusula. Aunque la sobreexpresión de este tipo de genes ha sido poco reportada se ha encontrado que el fragmento NB-ARC-LRR del gen *Rx* de papa, que le confiere resistencia contra PVX cuando es sobrexpresado en *N. bethamiana* genera HR (Rairdan *et al.* 2008).

Los estudios realizados mediante comparación de perfiles de expresión por cDNA-AFLPs de plantas de tomate con el gen *Cf-4* que confiere resitencia contra *C. fulvum* y plantas con el *Cf-4-Avr4* permitieron encontrar una proteína del tipo CC-NB-LRR cuya sobreexpresión fue necesaria para la producción de HR. Corroborando que la sobreexpresión de estas proteinas también sucede naturalmente, adicionalmente permite inferir la posibilidad de identificación de posibles proteínas R mediante esta técnica.

Tres secuencias presentaron similaridad con factores de transcripción como el TDFHb3 con un valor E de $1.7e^{-32}$, que presentó similaridad con el dominio C3HC4 también denominado *zinc-finger*. Estos son muy diversos funcionalmente, se ha descrito que están involucrados en unión a ácidos nucleicos, en interacciones proteína _ proteína y unión a pequeños ligandos como lípidos (Grishin 2001), están asociados a la regulación de procesos celulares como replicación y reparación, traducción, muerte celular programada, ubiquitinación y metal regulación (Krishna *et al*. 2003). El TDFHb42a con un valor E del $5.3e^{-3}$ también presentó similaridad con secuencias de este tipo.

EL TDFHb38 con un valor E de $2.0e^{-31}$ presentó similaridad con proteínas NOT (dominio NOT2/NOT3/NOT5) el cual es conservado en plantas y animales, estas proteínas originalmente fueron encontradas en *Saccharomyces serevisiae* como represores negativos de la RNA polimerasa II (Albert *et al.* 2000). Ha sido encontrado sobrexpresado en respuesta a sequía y en raíces y retoños de plántulas de *Citrullus colocynthis* previamente tratadas con ácido salicílico (Si *et al.* 2009).

Otras secuencias mostraron similaridad con proteínas involucradas en el metabolismo central, por ejemplo el TDFHb18A que presentó un valor E de $2e^{-36}$ con enzima Málica dependiente de NADP cuya función predominante es la producción de piruvato por oxidación en el ciclo de ácidos tricarboxilicos en la mitocondria (Artus & Edwards 1985), isoformas NADP-ME en plantas se encuentran ubicadas en plastidios y en el citosol, en plantas C4 y algunas CAM se encuentran en cloroplastos participando en el metabolismo fotosintético. En el citosol y plastidios de tejidos no fotosintéticos de plantas C3, C4 y

CAM desempeñan diferentes funciones que aun no han sido elucidadas, se ha sugerido que estas isoformas pueden estar involucradas en respuesta de defensa de las plantas, síntesis de lignina durante las primeras horas de la infección (Schaaf *et al.* 1995), balance del pH citosólico (Martinoia & Rentsch 1994) y cierre de los estomas (Laporte *et al.* 2002; Wheeler *et al.* 2005).

Tabla 4-2 Asignación de función génica obtenida para los TDFs

No ID	N-TDF	Tamaño	Mejor BLAST (Hit)	E Value
Genes R				
DT574966	TDFHb5	163	LRR domain Hcr2-5D/*Lycopersicon esculentum*	1.2e-06
DV132446	TDFHb68	230	NBS-type resistance protein...(*Euphorbia eusula*)	7.7e-07
Metabolismo				
DR171673	TDFHb13	439	NADH dehydrogenase subunit. (*Triphysaria versicolor*)	4.4e-30
TA6251_3983	TDFHb18a	224	NADP-dependent malic enzyme *(Manihot esculenta)*	2e-36
TA21271_3694	TDFHb37	232	5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate amidotransferase...	8.4e-21
TA13478_4097	TDFHb54	226	Cluster: Phenylpropanoid:glucosyltransferase 2;.(*Nicotiana*	4.3e-09
EB686819	TDFHb63	91	F7F22.17, putative [Asparagus officinalis (Garden	0.00044
Transcripción				
TA5520_3988	TDFHb3	301	Protein binding protein, Zinc finger, C3HC4 type (*Ricinus*	1.7e-32
DV138706	TDFHb38	207	Euphorbia esula|NOT2/NOT3/NOT5 (*Medicago truncatula*)	2.0e-31
TA35463_3635	TDFHb42a	96	Hypothetical protein At3g18640.(*Gossypium hirsutum)*	0.0053
Efectores fúngicos				
CAC01610.1	TVFMu1	333	Extracelular Protein 5 (*Passalora fulva)*	3e-11
Degradación de proteínas				
DT517279	Contig 4	140	Ubiquitin activating enzyme-like protein (*Populus*	2.6e-26
EC603965	TDFHb65	88	Multicystatin Cys proteasa/*Vigna unguiculata* (*Hevea*	0.0023
Regulación				
BG444709	TDFHb20a	141	Polypyrimidine tract-binding (*Gossypium arboretum*) protein	0.052
No conocidas				
TA44050_4113	TDFHb7	140	*Solanum tuberosum* genome	0.064
TA32899_3750	TDFHb8-9	342	Retrotransposon-like gene (*Malus x domestica)*	4.9e-23
DW008546	TDF Hb21B	200	Hypothetical protein, PGEC979H09.4 (*Gossypium*	1.5e-12
TA562_3933	TDFHb26B	732	Unknown protein (*Eucalyptus gunni*i)	2.6e-29
AW736167	TDFHb27	424	Orf122 [*Chlorobium tepidum*] (*Medicago truncatula*)	1e-24
DY762998	TDFHb29B	146	*Glycine max*	8.5e-06
TA9664_3695	TDFHb30B	182	Hypotetic protein... 676 (*Populus trichocarpa x Populus*	1.8e-24
TA1423_13427	TDFHb41	437	Cluster: Hypothetical protein T5K6 80... (*Cichorium intybus*)	7e-39
XP_002521724.1	TDFHb43	360	conserved hypothetical protein [*Ricinus communis*]	0.005
DB994984	TDFHb44	270	*Bruguiera gymnorrhiza*	0.0011
TA6444_3983	Contig 4	226	Cluster: hypothetical protein. (*Manihot esculenta*)	3.5e-42
XP_002519057.1	TDFHb57	180	Conserved hypothetical protein (*Ricinus communis*)	0.057
BQ489145	TDFHb59	154	*Beta vulgaris*	0.037
	TDFHb64	82	*Manihot esculenta* scaffold08271 (Phytozome)	0.0187
TA201_3981	TDFHb67	111	*Hevea brasiliensis*	0.00014
DT519880	TDFHb70	105	*Populus trichocarpa x Populus deltoides*	1.6e-05
EH764506	TDFHb77	240	Cluster: ENSANGP000000148 (*Centaurea solstitialis*)	5.5e-15

No ID	N-TDF	Tamaño	Mejor BLAST (Hit)	E Value
No conocidas				
DV667846	TDFHb98	195	*Coffea canephora*|Cluster: Putative retrotransposon	2.4e-06
CX074408	TDFHb99	387	*Citrus sinensis*|Polyprotein 1 [Petunia vein clearing virus]	2.5e-05
CBF84162.1	TVFMu2	157	TPA: conserved hypothetical protein [*Aspergillus nidulans*	0.0006
Sintesis de proteínas				
TA5838_85681	TDFHb16-20	148	Hypothetical protein ribosomal s12... (*Citrus clementina*)	2.4e-76
TA29060_3750	TDFHb17A	317	RNA polymerase beta (*Malus x domestica*)	7e-53
DY291987	TDFHb42 –74	233	Chaperonin CPN60-2, mitocondrial precursor. (*Citrus*	9.3e-05
Transducción de señales				
TA5736_3983	TDFHb39	232	Cluster:CCR4-associated factor 1-like protein (*Manihot*	4.2e-18
Sintesis de esfingolipidos				
DV218432	TDFHb41a	143	Neutral ceramidase-like (*Vitis vinífera*)|	9.0e-17
Crecimiento				
EE255086	TDFHb49	182	Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase	9.9e-18
TA5039_3983	TDFHb51	334	Cluster: Syringolide-induced protein 19-1-5 (*Manihot*	1.4e-59
TA548_3981	TDFHb53	214	Alpha-expansin 9 (*Hevea brasiliensis*) (ubicados en pared	2.7e-39
Secuencias sin homología				
	TDFHb11	134		
	TDFHb12	110		
	TDFHb14	48		
	TDFHb15	30		
	TDFHb19A	236		
	TDFHb40	171		
	TDFHb48	105		

Adicionalmente se encontraron secuencias asociadas al metabolismo secundario, como el TDFHb54 con similaridad a la glycosiltransferasa dos la cual está involucrada en la ruta de los fenilpropanoides (UGTs). Estas catalizan la transferencia de Glc a numerosos sustratos y regulan compuestos que son importantes en la defensa de las plantas contra patógenos como fitoalexinas (Dixon & Paiva 1995). Durante la HR una de las rutas activadas más importantes es la de fenilpropanoides. En tabaco los genes *Togt1* y *Togt2* que son inducidos por AS y durante una HR codifican UGTs que actúan eficientemente sobre hidroxicumarinas especialmente como escopoletina y ácido hidroxicinámico en plántulas resistentes a TMV (tobbaco virus mosaic), líneas antisentido TOGT mostraron que las UTGs son necesarias para el almacenamiento de escopoletina exhibiendo hipersensibilidad a TMV (Chong *et al.* 2002).

Otros TDFs presentaron similaridad a proteínas asociadas a otras rutas metabólicas como la NADH deshidrogenasa la cual se encuentra localizada en la membrana mitocondrial y cataliza la transferencia de electrones de NADH a la coenzima Q. (Nakamaru-Ogiso *et al.* 2010) y la 5-fosforibosi-1-pirofosfato amidotransferasa

involucrada en el metabolismo de ácidos nucleicos la cual cataliza la primera reacción para la síntesis de novo de las purinas (Boldt & Zrenner 2003).

De los dos TDFs que presentaron similaridad con genes asociados a degradación de proteínas el TDFHb45 presentó similaridad con E1 (*ubiquitin-activating enzyme*) que actúa como primer activador del sistema ubiquitin/26S proteasoma el cual constituye la principal ruta de degradación de proteínas y está involucrado en la regulación de numerosas funciones celulares (Zeng *et al.* 2006). La ubiquitinación de proteínas blanco es realizado por tres reacciones enzimáticas secuenciales, inicialmente E1 proteína conservada de 76 aminoácidos cataliza la activación de una molécula de ubiquitina, posteriormente es transferida a E2 (*ubiquitin-conjugating enzyme*), finalmente E3 (*ubiquitin-ligase*) se une a E2 que cataliza la formación de la unión con la proteína sustrato, posteriormente una cadena de múltiples ubiquitinas se une a la proteína blanco que usualmente es dirigida al proteosoma 26S dende es degradada (Marx 2002). El aislamiento de *NtUBA1* y *NtUBA2* que codifican para E1 en tabaco BY-2 y son sobreexpresados después de la infección con TMV (*Tabbaco mosaic virus*) y en menor medida al ser inoculados con CMV (*cucumer mosaic virus*), dan soporte a la idea de que el ubiquitin-proteosoma juega un papel importante en la respuesta de defensa a enfermedades de plantas (Takizawa *et al.* 2005).

El TDFHb39 presentó similaridad (E $4.2e^{-18}$) a CCR4–Associed to factor 1 (CAF1), este junto con CCR4 participan en la regulación de genes mediante la degradación del RNA por deadenilación de acuerdo a estudios realizados en *Saccharomyces cerevisiae* (Tucker *et al.* 2001). En plántulas de *A thaliana* ecotipo C24 que posee el gen R *RCY1* el cual le confiere resistencia al virus del mosaico del pepino CMV-Y, homólogos de CAF1 se han encontrado sobreexpresados en los tiempos 3, 5 y 18 phi con CMV-Y (Marathe *et al.* 2004). También se ha encontrado sobreexpresado en plántulas con tratamientos de hormonas, diferentes regímenes de luz y compuestos químicos indicando su participación en la degradación del mRNA (Ma & Bohnert 2007).

En las secuencia analizadas también se encontraron tres genes asociados a crecimiento correspondientes al TDFHb53 ($2.7e^{-39}$) con similaridad a un alfa expansina y los TDFHb49 ($9.9e^{-18}$) y TDFHb51 ($1.4e^{-59}$) con similaridad a una xiloglucan endotransglicosilasa la cual corta y religa polímeros de xiloglucano uno de los componentes principales de la pared, participando en la homeostasis de crecimiento

(UniprotKb). Estudios realizados en soja inoculada con elicitores conocidos como siringolidos expresados por *Pseudomonas syringae* pv. glycinea que contiene el gene D (avrD) de avirulencia e inducen HCD (hypersensitive cell death) mostraron una fuerte inducción de una xiloglucan endotransglicosilasa en la variedad Harosoy que contiene el gen R *Rpg4* (Hagihara *et al.* 2004).

Se encontrarón tres secuencias asociadas a síntesis de proteínas el TDFHb17A (7e-53) con similaridad a la subunidad beta de la RNA polimerasa, el TDFHb16-20 (2.4e-76) con similaridad a la proteína ribosomal S12 y la chaperonina mitocondrial CPN 60-2 (9.3e-05) encargada de la importación y ensamblaje macromolecular de proteínas (uniprot Kb), su sobreexpresión a sido asociada a defensa, plantas transgénicas de *Capsicum annuum* que sobrexpresan CAF-1 aumentaron la expresión de esta proteína (Sarowar *et al.* 2007). La evaluación proteómica de plantas de maíz infestadas con *Blissus leucoterus* mostró la sobreexpresión de la chaperonina CPN60 -2 (Ghimire *et al.* 2009).

Finalmente el TDFHb41a presentó similaridad a ceramidasas neutras, estas enzimas son las responsables de metabolizar la ceramida a esfingosina por ruptura de la unión N-acil entre esfingosido y el acido graso, en la síntesis de esfingolipidos (Pata *et al.* 2008). En animales Se ha encontrado que la ceramida esta implicada en la muerte celular programada (Futerman & Hannun 2004; Hannun & Obeid 2002). Pese ha que las ceramidasas presentes en plantas han sido menos estudiadas se ha encontrado que estas pueden generar muerte celular programada (Liang *et al.* 2003; Townley *et al.* 2005), de igual forma la identificación de un elemento IRES en la región 5´UTR de OSCDase una ceramidasa encontrada en arroz, sugiere que esta sujeta a regulación a nivel de traducción como parte de la maquinaria de muerte celular programada de las plantas (Pata *et al*. 2008).

De todos los 49 genes encontrados y cuya función fue pósible asignar (22), se seleccionaron 12 para la evaluación y cuantificación de su expresión por qRT-PCR, en los clones RRIM 600, FX 3864 y FX 2261 a los cuatro diferentes tiempos phi. Se seleccionaron los TDFs con similaridad a proteínas R de otras especies vegetales, proteínas reportadas como diferencialmente expresadas en interacciones planta - patógeno y el TDFMu1.

4.2 Conclusión

Los perfiles de expresión obtenidos por cDNA-AFLPs a los cuatro tiempos 0, 24, 48 y 144 hpi de los clones IAN 710 (R), FX 3864 (RP) y RRIM 600 (S) mostraron ser una metodología útil en el estudio de la interacción *M. ulei – H. brasiliensis* ya que permitieron encontrar algunos genes asociados a la respuesta de defensa de la planta que involucran dos factores de transcripción, dos genes R, un gen asociado a la ruta de los fenilpropanoides, un gen del metabolismo central , uno asociado a degradación de proteínas vía ubiquitinación, uno asociado a la degradación de mRNA por deadenilación y otro inducido por siringilidos, adicionalmente se encontraron dos genes que podrían estar asociados a la patogenicidad del hongo. Sin embargo debido a que es una técnica de tipo cualitativa se requiere de la confirmación de la expresión encontrada por otro método cuantitativo como qRT-PCR.

Capitulo 5.

5. VALIDACIÓN DE GENES DE EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN LA INTERACCIÓN *M. ulei-H. brasiliensis*

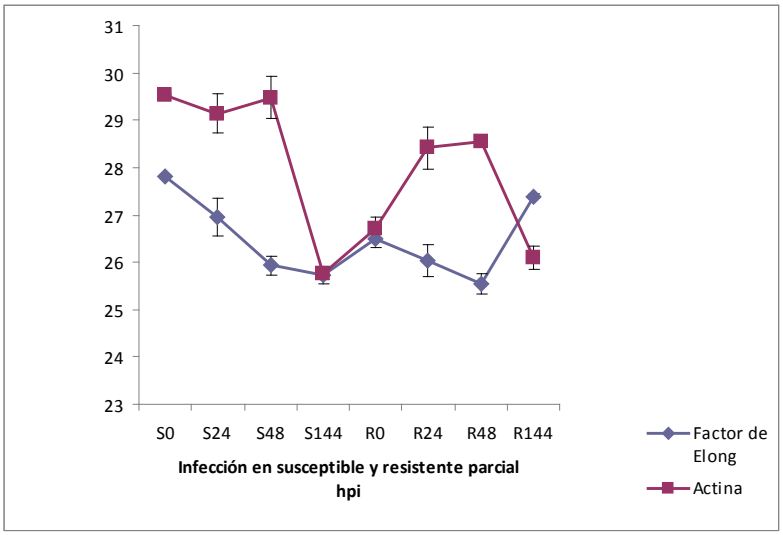
5.1 Validación de la expresión génica por qRT-PCR

Para la validación de los resultados de expresión diferencial de los 49 transcritos obtenidos por cDNA-AFLPS se seleccionaron dos factores de transcripción correspondientes al TDFHb3 con similaridad al dominio C3HC4 y el TDFHb38 con similaridad al dominio NOT. Dos genes R correspondientes al TDFHb5 con similaridad al dominio LRR de *Cf-5*, el TDFHb68 con similaridad una proteína tipo NBS. Dos genes asociados a síntesis de proteínas el TDFHb16-20 con similaridad a la proteína ribosomal 2S y el TDFHb17A con similaridad a la subunidad beta de la RNA polimerasa, ya que se ha encontrado que en interacciones incompatibles hay un aumento en la síntesis de proteinas. Un gen asociado a degradación de proteínas correspondiente al TDFHb45 con similaridad a la enzima E1 activador de ubiquitinación. Dos genes asociados a metabolismo central correspondientes al TDFHb18A con similaridad a una enzima málica dependiente de NADP y el TDFHb37 con similaridad a una ribosil-amidotransferasa. Un gen asociado a metabolismo secundario correspondiente al TDFHb54 con similaridad a una glicosiltransferasa asociada a la ruta de los fenipropanoides y un gen asociado a crecimiento correspondiente al TDFHb51 con similaridad a una xiloglucan-endotransglicosilasa, proteína inducida por siringolidos (Tabla 4-2).

Finalmente se seleccionó el TDFMu1 correspondiente a uno de los dos transcritos encontrados asociados con *M. ulei*, adicionalmente se detectó en el genoma del patógeno y en plantas infectadas.

5.1.1 Selección del gen de referencia

De los tres juegos de primers evaluados para la selección del gen de referencia: dos correspondientes a β-actina y uno para la amplificación del factor de elongación (Tabla 5-1), se descartaron los primers diseñados desde la secuencia de β-actina de *H. Brasiliensis* (ID DQ306817) porque presentaron mayor formación de díameros y una menor una eficiencia, (Anexo F). Los dos juegos restantes de primers se probaron con cDNA de la planta con resistencia parcial y la susceptible a los diferentes tiempos posinoculación. La gráfica 5-1 muestra que factor de elongación presentó menor variación del cp que β-actina en los diferentes tiempos phi, debido a estas características se seleccionó como gen de referencia para hacer la cuantificación relativa de los TDFs previamente seleccionados a partir del análisis de función realizado; resultados similares fueron observados con la réplica del ensayo.



Gráfica 5-1. Evaluación de la estabilidad de la expresión de los genes de referencia β-Actina y Factor de elongación en los clones RRIM-600 (S) y FX-3864 (R) a las 0, 24, 48 y 144 hpi con el aislamiento de *M. ulei*. GCL009.

5.1.2 Diseño de primers

A partir de los TDFS seleccionados se realizó el diseño de primers mediante los programas Primerquest® de IDT y Oligoperfect®. La secuencia de los primers obtenidos se describe en la tabla 5-1.

Tabla 5-1. Secuencias de primers diseñados para la evaluación por qRT-PCR de los TDFs seleccionados

Nombre	Secuencias	tamaño esperado	Tm	Programa de diseño	No de bases
HbREF (AB074308)	F 5'-GTAGACAGCACGGTTGTTGCATCT-3'	164	59.2	IDT	24
	R 5'-ACCTTAGCAAGTATCTTGGTCTGCCC-3'		60.1		26
ActHb (DQ306817)	F 5'-GACCTTGCTGGTCGTGATCT-3'	155	60.27	Oligoperfect	20
	R 5'-GCAGTTTCCAGTTCCTGCTC-3'		60.00		20
Act-Arab	F 5'-GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG-3'	108	58.2	NA	23
	R 5'-AACGACCTTAATCTTCATGCTGC-3'		55.7		23
TDFHb2	F 5`- TGGACAGGAACGTAGGTGGCA – 3`	177	57.47	oligoperfect	21
	R 5`- TACCGTCAACCGACCGCTCT – 3`		57.54		20
TDFHb3	F 5`-GGCTTCTTTGGTGAGACTGG – 3`	189	59.84	Oligoperfect	20
	R 5`- ATACTTTCCGGTCCCCTCAT – 3`		59.65		20
TDFHb5	F 5'-CCCAAGTAATCCGGCAAACTTCCA-3'	93	59.3	IDT	24
	R 5'GCGTACCAATTCATCAAGATGCCTCACG-3'		61.1	IDT	28
TDFHb16-20	F 5'-ACCAAGTTCGGGATGGATTGGTGT-3'	114	60.4	IDT	24
	R 5'-GGGCCTCACAATCACTAGCCAATA-3'		58.5	IDT	24
TDFHB17A	F 5'-CCGATAAGCGCCAAGTGCATCATA-3'	163	59.2	IDT	24
	R 5'-TGAGTCCTGAGTAACAAGCGGGAA-3'		59.5	IDT	24
TDFHb18A	F 5'-ACTTTCTTGTTCCTTGGTGCTGGG-3'	181	59.5	IDT	24
	R 5'-AGGGCTGCTTGAAGTGTTGAAGTG-3'		59.6	IDT	24
TDFHb20A	F 5'-GTGTGAGCGGAGGGTAACAACAAA-3'	130	59.3	IDT	24
	R 5'-CCGAACACATTCATCCAGGCATCT-3'		59.1	IDT	24
TDFHb37	F 5'-TAGTGGCTGCACTTGGTTATCCCT-3'	99	59.8	IDT	24
	R 5'-TTGTGACGGCACGATGAATGTCCT-3'		60.6	IDT	24
TDFHb38	F 5'-GAGCTTCATCCTTTGGCATGCTGT-3'	151	59.8	IDT	24
	R 5'-TCTGATGAGCCAGCTAAGGGTGAT-3'		59.4	IDT	24
TDFHb45	F 5'-TTGTAATTGTCAGTTGCTGCACCCGC-3'	80	61.7	IDT	26
	R 5'-TGCTACACGCTTTGATAACTTGCG-3'		57.7	IDT	24
TDFHb51	F 5'-GTGTGGAAATCTGCAGTTGGGTCA-3'	101	59.9	IDT	24
	R 5'-TTTGAGTGGCGACCCTTACATCCT-3'		59.4	IDT	24
TDFHb54	F 5'-TTCCCTTGTGTGGAGGCTGGATTA-3'	156	59.8	IDT	24
	R 5'-CGCAACTAGACAATTGGGCCGATA-3'		59.0	IDT	24
TDFHb68	F 5'-TGGTTATGGCTACGGTGTCTCGAA-3'	130	59.5	IDT	24
	R 5'-ATCAACACCTGATGTAGCCGCGAT-3'		60.3	IDT	24

5.1.3 Cuantificación relativa de la expresión de los TDFs y seleccionados

La cuantificación de la expresión de los TDFs seleccionados realizada sobre los clones RRIM 600 (S) FX 3864 (RP) y FX 2261 (RT) se calculó con relación al gen de referencia factor de elongación de *H. brasiliensis* a través del software Q-gene que realiza el calculo de la expresión relativa teniendo en cuenta el modelo propuesto por Muller *et al*, (2002), el cual asume que la eficiencia de la amplificación es diferente de 2 para cada juego primers y se requiere el cálculo para cada uno (Anexo F).

No fue posible realizar la evaluación del TDFHb37 con similaridad a una amidotransferasa ya que con los primers diseñados no se obtuvo amplificación en ninguna de las dos replicas biológicas utilizadas. La cuantificación de la expresión El TDFHb5 con similaridad al dominio LRR del gen *Cf-5*, no fue posible debido a que las amplificaciones presentaron más de dos Tm por muestra indicando la obtención de múltiples amplicones y estos variaron en las replicas inclusive de la misma placa.

A

B

```
>TDFHb5 Hevea (ORF 3)
LRTNSSRCLTYNLDFLSLSHNGISGSLPDYLGNFKGLTFLDLSANSFYGPIPS
```

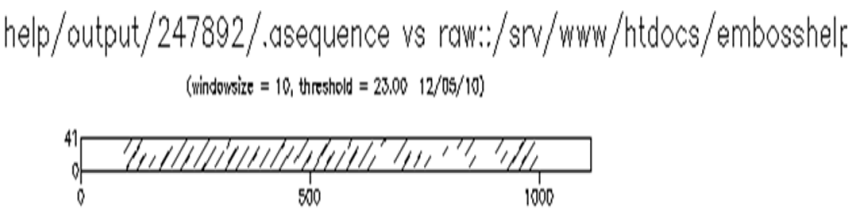


Figura 5-1. Comparación de las secuencias proteicas de Cf-5 de *L. esculantum* y TDFHb5 **A.** Estructura proteica de Cf-5 la cual tiene 24 LRRs distribuidas en la mayor parte de la secuencia. Reporte Prosite. **B**. Peptido obtenido a partir del TDFHb5. **C**. Gráfica del alineamiento realizado entre TDFHb5 y Cf-5.

Este resultado se debe a que el TDF encontrado corresponde a un dominio repetitivo el cual está presente alrededor de 24 veces en la secuencia del gen *Cf-5* (Figura 5-1 A), la traducción del transcrito con el tercer marco abierto de lectura directo generó un péptido de 53 residuos (Figura 5-1 B) y al realizar el alineamiento con la secuencia proteica de Cf-5 se observaron múltiples sitios complementarios (Figura 5-1 C), el análisis de la secuencia de DNA del gen mostró de manera similar múltiples regiones con secuencias repetidas correspondientes al motivo proteico. La evaluación también fue realizada sobre DNA y cDNA del clon IAN 710 en los diferentes tiempos phi obteniéndose resultados

similares. Lo anterior impide mediante la secuencia encontrada una cuantificación correcta de la expresión ya que probablemente el gen evaluado sobre cDNA de *H. brasiliensis* también contenga múltiples repeticiones LRR.

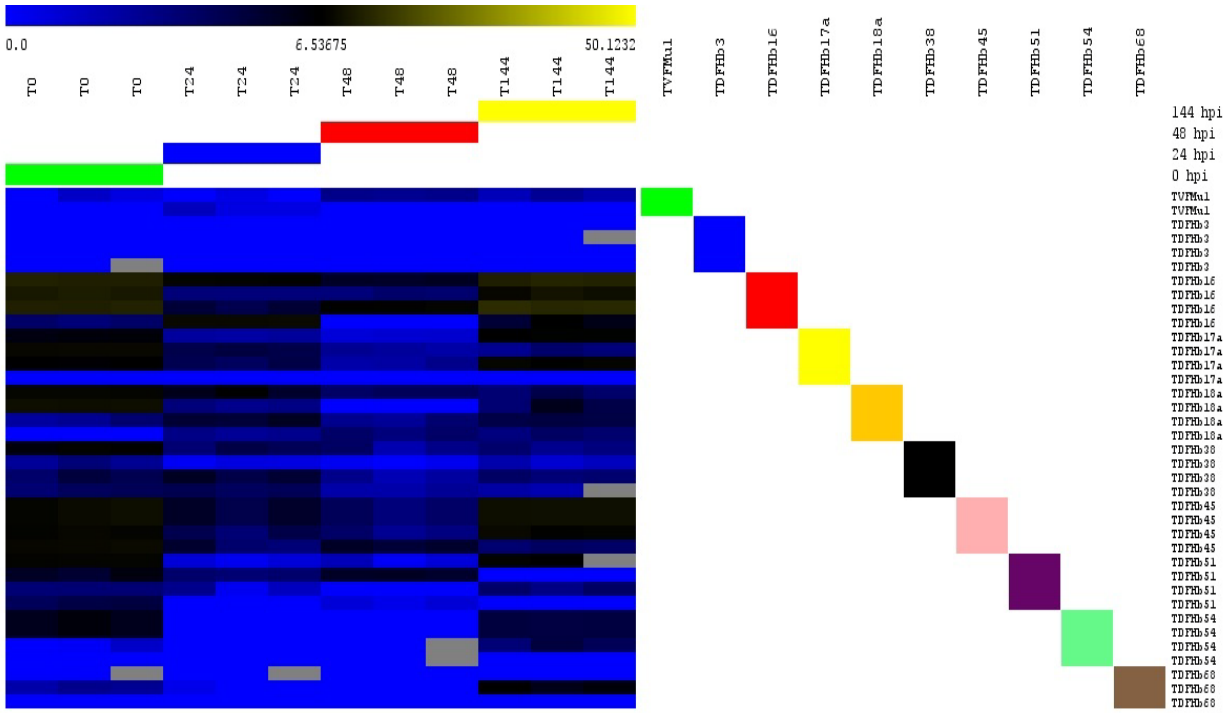
La significancia de la expresión diferencial de cada uno de los diez genes que se evaluaron por qRT-PCR en los tres clones a los cuatro diferentes tiempos phi, fue realizada mediante el software Multiexperiment viewer® versión 4.4, utilizando el estadístico de anova a una vía con un valor P de 0.05 y con corrección de Bonferroni ajustado. El análisis estadístico mostró que hubo diferencias significativas en la expresión de la mayoría de las evaluaciones correspondientes a los cuatro tiempos sobre los tres clones (Figura 5-2 A). Sin embargo, para el TDFMu1 evaluado en el clon S no se obtuvo diferencia significativa en la expresión en los diferentes tiempos, lo mismo ocurrió para el TDFHb68 con este mismo clon (Figura 5-2 B).

De manera general se observó un comportamiento de inhibición de la expresión a las 24 y 48 h en el clon S, con RP también se presentó inhibición pero esta fue menor, resultados que son concordantes con los obtenidos por cDNA-AFLPs donde se observa mayor intensidad de las bandas a las 24 y 48 h en el clon RP, que fue con el que se obtuvieron la mayoría de los TDFs. Posteriormente se observó la recuperación de los niveles transcripcionales para cinco de los genes evaluados, comportamiento también observado de manera cualitativa para la mayoría de los genes por cDNA-AFLPs. Resultados similares de inhibición de la expresión génica fueron reportados para el clon PB 314 considerado como susceptible en el que observó la disminución de la expresión de la mayoría de los genes en tiempos posteriores a la inoculación de acuerdo con el estudio realizado recientemente por García *et al*, (2011). En este se evaluaron dos clones uno susceptible y el clon MDF 180 considerado resistente ya que individuos establecidos en campo e inoculados en condiciones controladas no mostraron la formación de estructuras estromáticas correspondientes al estado sexual del hongo (Le Guen *et al.* 2008), los dos clones fueron evaludos en diferentes estadios de la enfermedad al ser inoculados con un pool de cepas caracterizados por su alta virulencia, usando la estrategia de librerías sustractivas.

Se observó una expresión similar del TDFHb3 entre el clon S y el clon RP en los diferentes tiempos posinoculación (Gráfica 5-2), a diferencia del clon RT que

prácticamente no mostró aumento en la expresión en ningún tiempo. Se aprecia una disminución de la expresión a las 24 y 48 horas y posteriormente una recuperación de los niveles transcripcionales a las 144 h, la expresión de este factor de transcripción podría asociarse a regulación de activadores de la ruta primaria de degradación de proteínas por ubiquitinación, ya que esta ruta pude verse incrementada por la interacción de activadores con anillos de zinc (Lorick *et al.* 1999). Estos mismos resultados de mayor expresión en el clon S con relación a los clones resistentes a pesar de haber disminuido con relación al tiempo cero, se evidenció en los cDNA-AFLPs. De manera contraria la expresión del TDFHb38 fue mayor a las 24 hpi en el clon RT, el cual presenta homología con dominios NOT2/NOT3/NOT5 este tipo de proteínas están implicadas en la regulación negativa de genes (Albert *et al.* 2000), se ha encontrado que forman complejos con CCR4 el cual está involucrado en la regulación de genes vía deadenilación del RNA mensajero, adicionalmente ensayos de doble hibrido realizados con dos genes homólogos a ubiquitin-ligasa E3 denominados PUB12 y PUB13 mostraron su interacción con proteínas NOT (Lu *et al.* 2011). Algunos estudios han mostrado el incremento de transcriptos de este tipo de proteínas en presencia de acido salicílico, el cual induce genes relacionados a patogenicidad activando la resistencia local y sistémica adquirida en muchas especies vegetales (Ryals *et al.* 1996). Análisis realizados en mutantes deficientes de acido salicílico evidencia la importancia de esta molécula en la modulación del balance redox y protección de las plantas contra el estrés oxidativo (Yang *et al.* 2004).

A



B

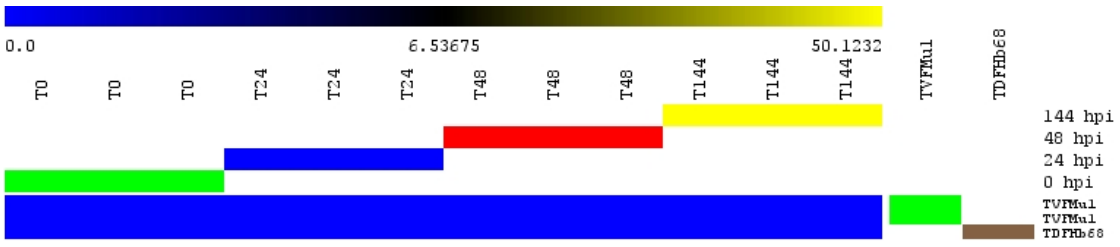


Figura 5-2. Diagramas de calor obtenidos en la evaluación de la significancia de la expresión de los 10 genes analizados por qRT-PCR sobre los clones de caucho en los diferentes tiempos phi. **A.** Genes que presentaron una expresión significativa. **B** Genes que no presentaron una expresión significativa.

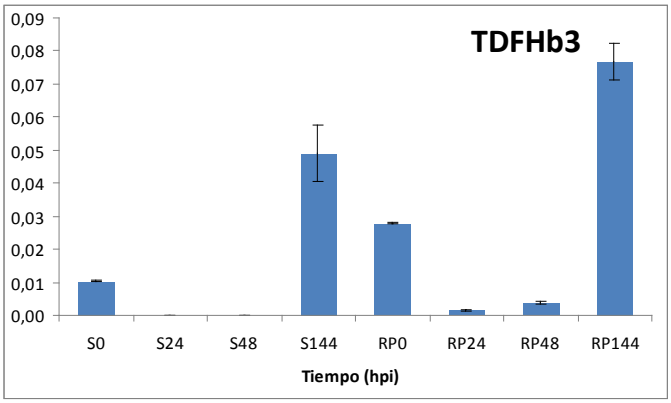
La expresión de los dos TDFs asociados a síntesis de proteínas fue reprimida a las 24 y 48 hpi en el caso del clon S (Gráfica 5-3 A y B), a diferencia del clon RT que mostró un leve aumento del TDFHb16 con similaridad unidad ribosomal 12S a las 24 horas y en el

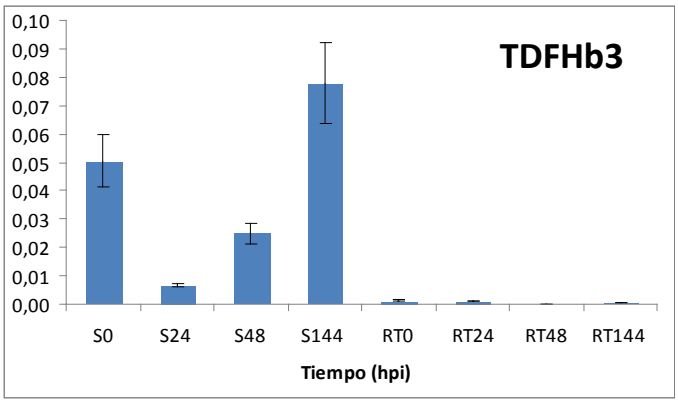
caso del de la unidad Alfa de RNA polimerasa no se observó modificación en su expresión en ninguno de los tiempos evaluados.

La expresión del TDFHb17a con similaridad a la enzima málica dependiente de NADP, es levemente mayor en el clon RT a las 48 h en tanto que en los clones RP y S la expresión es similar observándose disminución a las 24 y 48 hpi. Aunque las funciones de las isoformas de esta enzima no están completamente elucidadas se ha encontrado asociada a respuestas de defensa (Schaaf *et al.* 1995). La expresión de la glicosiltranfererasa correspondiente al TDFHb54a (Gráfica 5-4) muestra un comportamiento similar en los clones S y RP donde hay una disminución de la expresión, en el RT apenas hay un leve aumento a las 24 horas, lo cual podría asociarse a una respuesta temprana de defensa y podría estar involucrada en la HR observada en este clon.

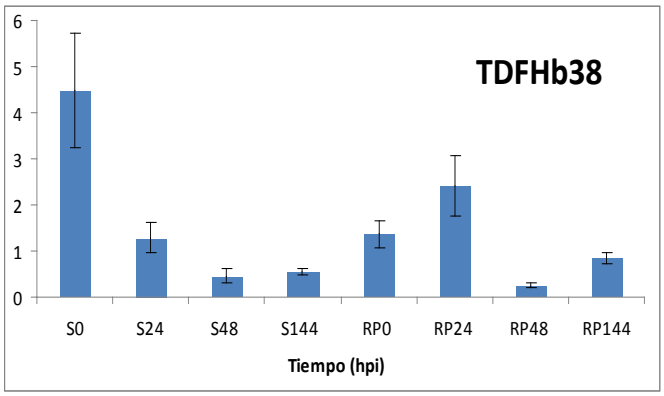
Para el TDFHb45 con similaridad al activador de ubiquitinación E1 se observó una menor expresión en el clon RT en todos los tiempos (Gráfica 5-5 A) en tanto que en el clon S y RP la expresión se disminuyó a las 24 y 48 hpi, posteriormente los niveles transcripcionales se recuperaron a las 144 h. El estudio realizado con las ubiquitin-ligasas PUB12 y PUB13 de *A. thaliana* evidencian el aumento de la susceptibilidad a *P. syringae* pv. tomato DC3000 por degradación del receptor FLS2 vía ubiquitinación, Mutantes pub12 y pub13 mostraron aumento en la resistencia contra *P. syringae* (Lu *et al.* 2011). El aumento de la expresión en el clon S y RP a las 144 h podría estar asociada al aumento de la susceptibilidad al patógeno.

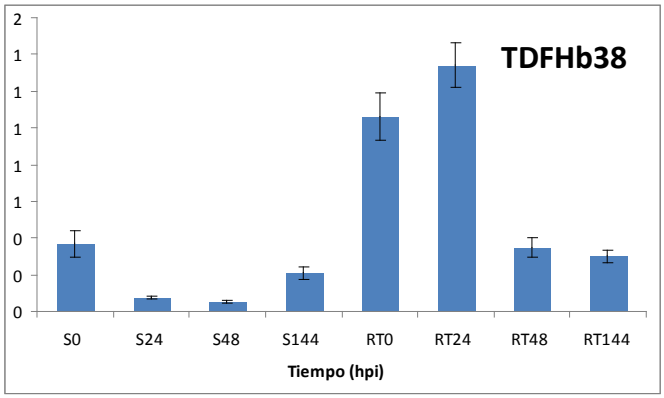
A





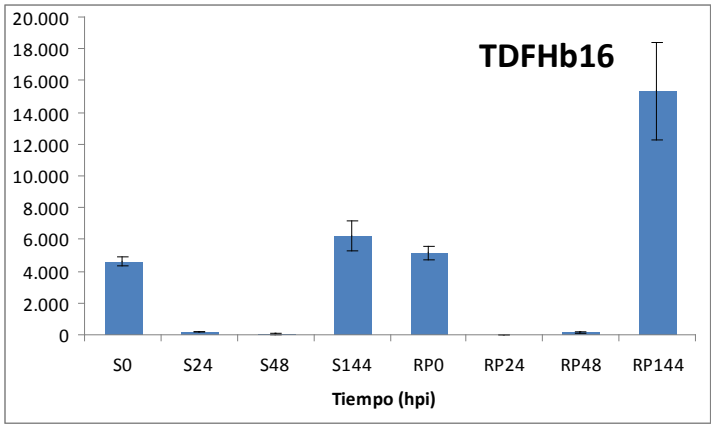
B

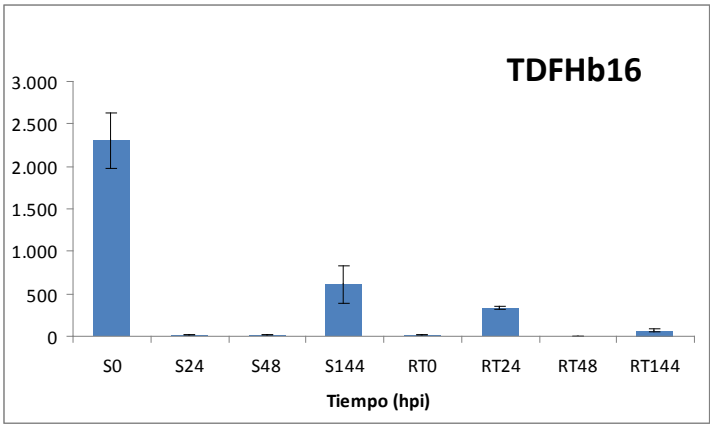




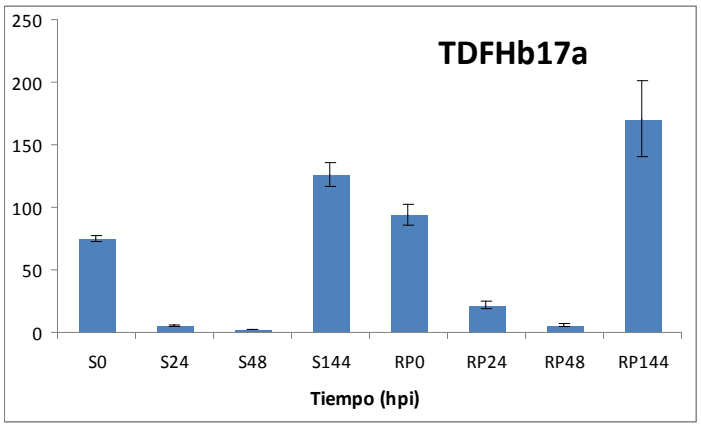
Gráfica 5-2. Expresión con relación a Factor de elongación de los TDFs con similaridad a factores de transcripción **A**. TDFHb3 con similaridad a dominios C3HC4 **. B**. TDFHb38 con similaridad a dominios NOT. En los diferentes tiempos hpi con GCL009. **S**, clon susceptible RRIM 600. **RP**, clon con resistencia parcial FX 3864 y **RT**, clon con resistencia total. FX 2261.

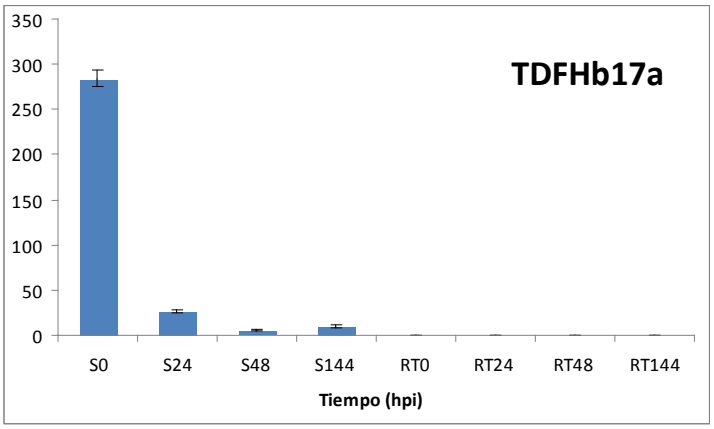
A





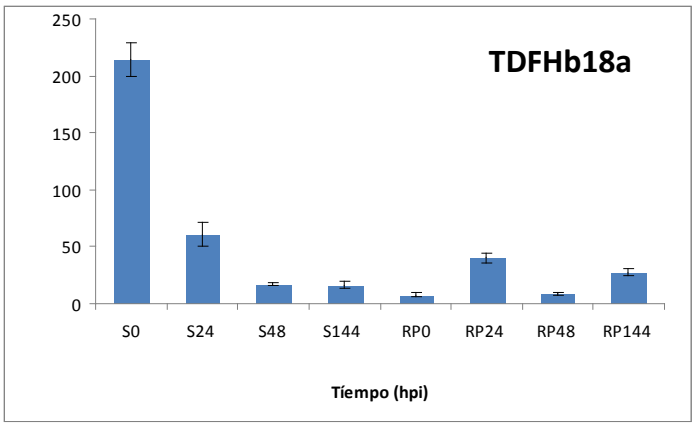
B

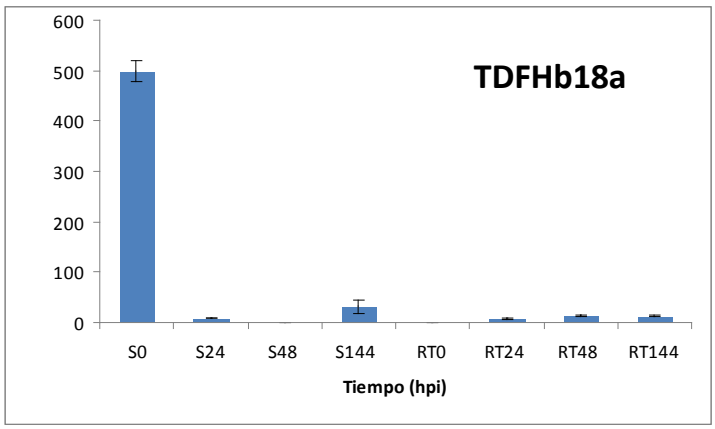




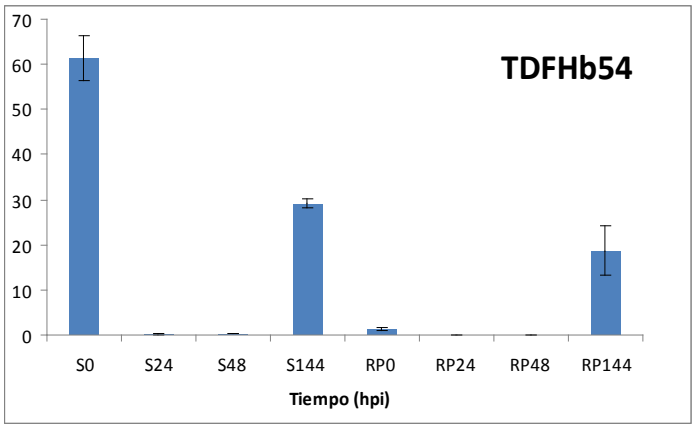
Gráfica 5-3. Expresión con relación a Factor de elongación de TDFDs involucrados en síntesis de proteínas. **A**. TDFHb16 con similaridad a la proteína ribosomal 12S. **B**. TDFHb17a unidad alfa de la RNA polimerasa. En los diferentes tiempos hpi con GCL009. **S**, clon susceptible RRIM 600. **RP**, clon con resistencia parcial FX 3864 y **RT**, clon con resistencia total. FX 2261.

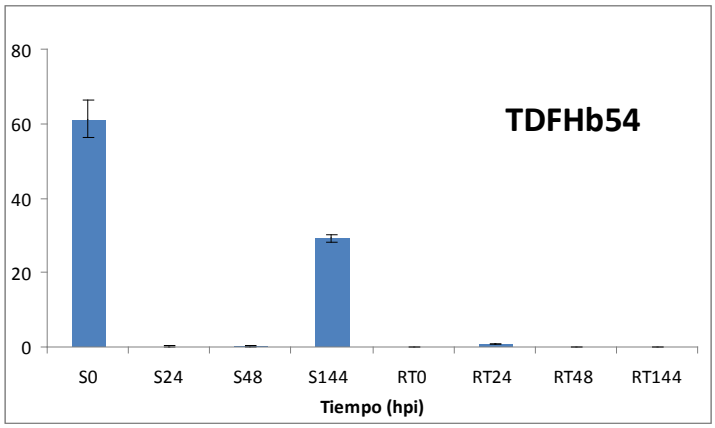
A





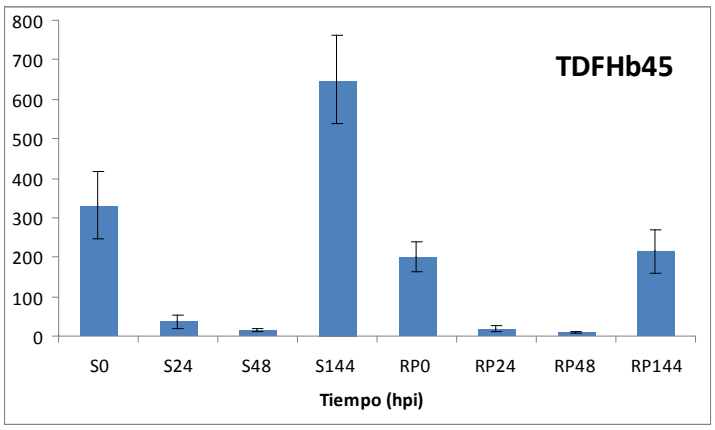
B

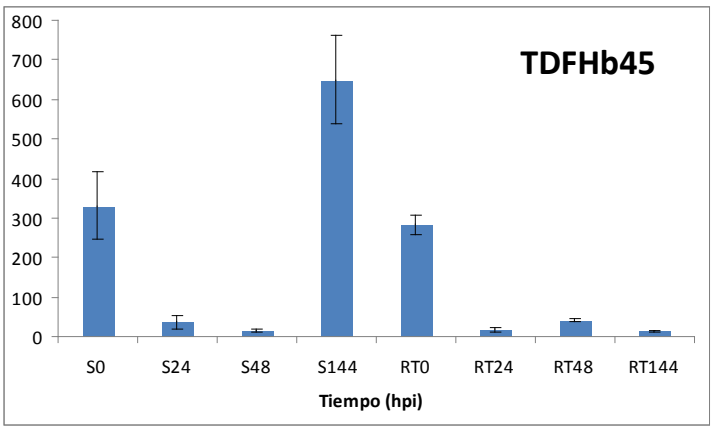




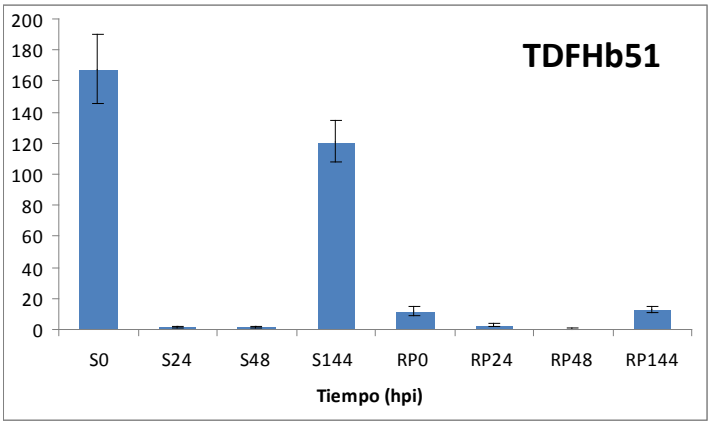
Gráfica 5-4. Expresión con relación a factor de elongación de TDFs con similaridad a genes relacionados con metabolismo. **A**. TDFHb18a con similaridad enzima málica dependiente de NADP. **B**. TDFHb54 con similaridad a una glicosiltransferasa. En los diferentes tiempos hpi con GCL009. **S**, clon susceptible RRIM 600. **RP**, clon con resistencia parcial FX 3864 y **RT**, clon con resistencia total. FX 2261

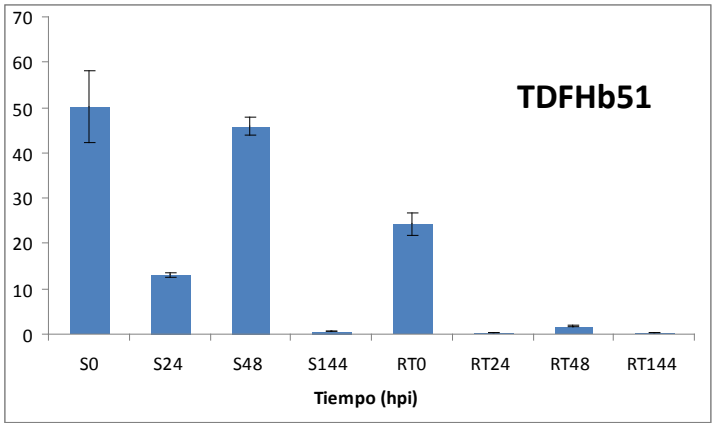
A



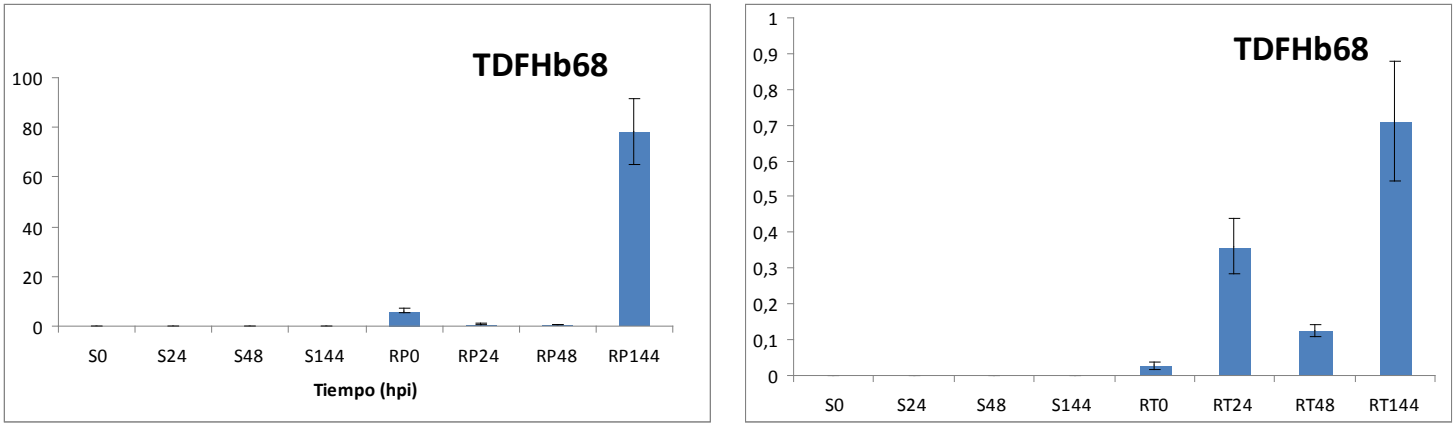


B





Gráfica 5-5. Expresión con relación a Factor de elongación del **A**. TDFHb45 asociado a degradación de proteinas con similaridad a E1 activador de la ruta de ubiquitinación. **B.** TDFHb51 con similaridad a una a una xiloglucan-endotranscglicosilasa . En los diferentes tiempos hpi con GCL009. **S**, clon susceptible RRIM 600. **RP**, clon con resistencia parcial FX 3864 y **RT**, clon con resistencia total. FX 2261



Gráfica 5-6. Expresión con relación a Factor de elongación del TDFHb68 con similaridad a un gen NBS de *Euphorbia eusula*. En los diferentes tiempos hpi con GCL009. **S**, clon susceptible RRIM-600. **RP**, clon con resistencia parcial FX-3864 y **RT**, clon con resistencia total. FX-2261.

La expresión del TDFhb51 correspondiente a una xiloglucano-endotransglicosilasa mostró un comportamiento similar al TDFHb45 (Gráfica 5-5 B) sin embargo, los resultados obtenidos con el clon S variaron en el comportamiento de las replicas probablemente se debe a las diferencias en el desarrollo fisiológico de las plántulas utilizadas a pesar de haber infectado foliolos en el mismo estadio. Evaluaciones realizadas en soja inoculadas con siringolidos, muestran que esta proteína es inducida en la variedad Harosoy resistente a *Pseudomonas syringae*, se encontró que su sobreexpresión está asociada a la generación de HR (Hagihara *et al.* 2004), sin embargo, en el clon RT de este estudio el cual mostró HR no se evidencio una aumento significativo de la expresión de este gen.

En el caso del TDFHb68 (Gráfica 5-6) con similaridad a una proteína de resistencia NBS de *Euphorbia eusula*, solo se observó expresión en los clones RP y RT siendo mayor a las 144 hpi, en el clon RT se observó aumento en la expresión desde las 24 hpi. García *et al*, (2011) encontraron sobreexpresión de EST (*Expressed sequence tag*) con similaridad a genes R en un clon con RP con relación con al S. En este estudio los transcritos tampoco se detectaron en el clon S en ninguno de los cuatro tiempos evaluados.

5.2 Validación del TDFMu1

La evaluación realizada del TDFMu1 con similaridad a ECP-5 de *C. fulvum* sobre DNA de los aislamientos de *M. ulei* RCP009 y GCL009 mediante PCR con primer diseñados a partir de la secuencia previamente obtenida (Anexo E), mostraron la presencia de un amplímero de 125 pb (Figura 5-3). Su clonación, posterior secuenciación y alineamiento con la secuencia TDFMu1 mostró una complementariedad del 100%, confirmando que este transcripto corresponde a *M. ulei* (Figura 5-4). La misma PCR fue realizada sobre plantas sanas en las cuales el amplímero no se observó y plantas inoculadas con síntomas las cuales si lo presentaron. Para confirmar la presencia del patógeno en las plantas inoculadas se realizó la amplificación de la región ITS completa con un tamaño aproximado de 480 pb, fragmento esperado para este patógeno de acuerdo a las secuencias reportadas en el GenBanK (Figura 5-3). El tercer marco abierto de lectura directo del transcripto TDFMu1 generó un péptido de 99 residuos, su alineamiento con la proteína ECP-5 muestra que se conservaron los cinco residuos de cisteína (Figura 5-4 C). La posterior evaluación de TDFMu1 por qRT-PCR en los tres clones de caucho natural a los cuatro tiempos diferentes phi, mostró un aumento de la expresión a las 24 hpi en los clones RP y RT, a las 48 hpi se observó supresión de la expresión en RT en tanto que en RP se vio aumentada, resultados similares se obtuvieron a las 144 hpi. Los niveles de transcriptos se mantuvieron bajos y similares en los cuatro tiempos para el clon S, sugiriendo que esta proteína es excretada por *M. ulei* al apoplasto de *H. brasiliensis* durante su interacción y su aumento de expresión estaría asociada a su patogenicidad (Gráfica 5-7).

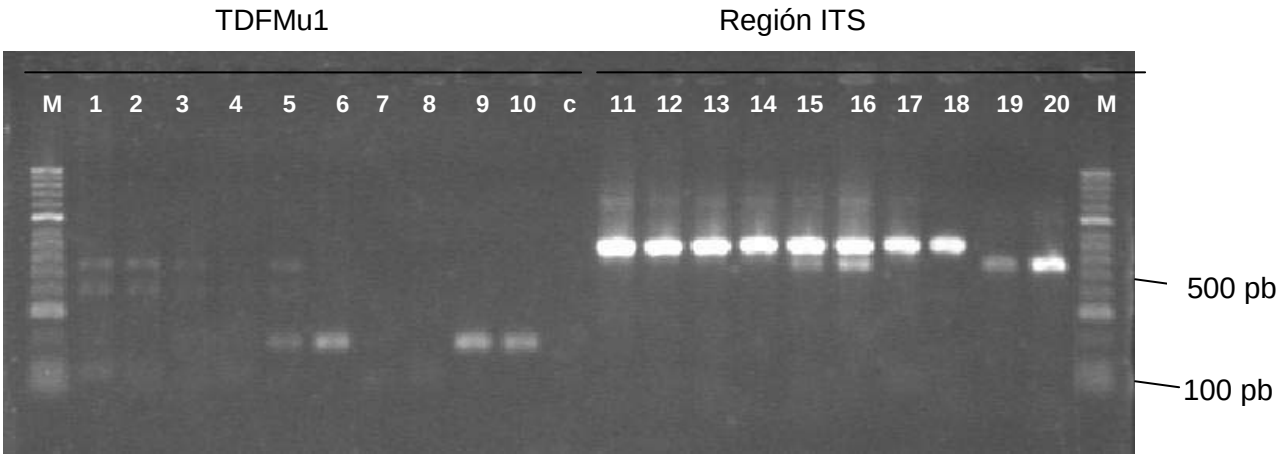
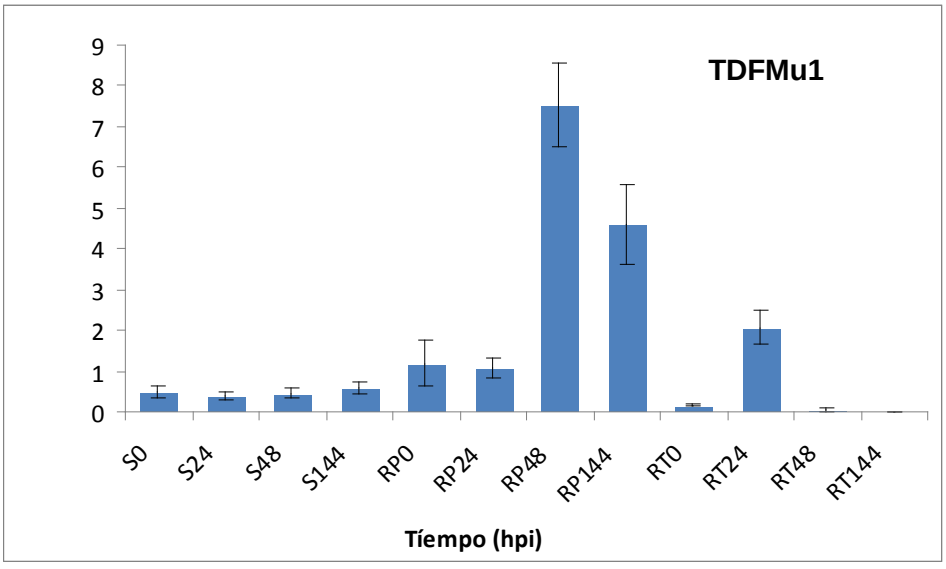


Figura 5-3. Amplificación de TDFMu1 sobre DNA de foliolos de *H. brasiliensis* sin síntomas y con síntomas de SALB. M. Marcador de peso H. ladder VI (BioLine). 1-2) FX3864 sin síntomas. 3) RRIM-600 sin síntomas. 4) FX3864 no infectado. 5) FX3864 con síntomas. 6) RRIM 600 con síntomas. 7) FX2261 no infectado. 9) FX2261 20 días después de ser inoculado. 9) DNA del aislamiento de *M. ulei* RCP009. 10) DNA del aislamiento de *M. ulei* GCL009. C) Control de reactivos. 11-12) FX3864 sin síntomas. 13) RRIM-600 sin síntomas. 14) FX3864 no infectado. 1 5) FX3864 con síntomas. 16) RRIM 600 con síntomas. 7) FX2261 no infectado. 9) FX2261 20 días después de ser inoculado. 9) DNA del aislamiento de *M. ulei* RCP009. 10) DNA del aislamiento de *M. ulei* GCL009. C) Control de reactivos.



Gráfica 5-7. Expresión con relación al factor de elongación del TDFMu1 con similaridad a P-5 de *C. fulvum*. En los diferentes tiempos posinoculación (hpi) con GCL009. **S** clon susceptible RRIM-600. **RP**. Clon con resistencia parcial FX-3864 y **RT**. Clon con resistencia total FX-2261.

A

```
>Contig1Plasm.
GGACAGGAACGTAGGTGGCAGTGCAATTTGCATATGTGCACATGGCCAGATCGAAGATGGCTATTATTACCCGAGTGGA
TATTATCCTGAAGGAGTGGTATCATTGCAATTTCACAAGATCGGGAAGTTCGAATGTGGCTTCAGTGCCTGATGTTCAGA
GCGGTCGGTTGACGGTA
```

B

```
Score =  318 bits (352),  Expect = 6e-92
 Identities = 176/176 (100%), Gaps = 0/176 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    GGACAGGAACGTAGGTGGCAGTGCAATTTGCATATGTGCACATGGCCAGATCGAAGATGG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  143  GGACAGGAACGTAGGTGGCAGTGCAATTTGCATATGTGCACATGGCCAGATCGAAGATGG  202

Query  61   CTATTATTACCCGAGTGGATATTATCCTGAAGGAGTGGTATCATTGCAATTTCACAAGAT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  203  CTATTATTACCCGAGTGGATATTATCCTGAAGGAGTGGTATCATTGCAATTTCACAAGAT  262

Query  121  CGGGAAGTTCGAATGTGGCTTCAGTGCCTGATGTTCAGAGCGGTCGGTTGACGGTA  176
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  263  CGGGAAGTTCGAATGTGGCTTCAGTGCCTGATGTTCAGAGCGGTCGGTTGACGGTA  318
```

C

```
>lcl|52913 unnamed protein product
Length=111

 Score = 68.9 bits (167),  Expect = 2e-17, Method: Compositional matrix adjust.
 Identities = 42/93 (46%), Positives = 54/93 (59%), Gaps = 1/93 (1%)

Query  19   GDNKPGQFNYICEDIPCDEEGVDSWILQACIGIGGTELTAHGGIYDTTGELVGRTAICLC  78
            G+ KP +F Y C D+ CD + V +WI QAC+GIGG  LT++  I D     VG +AIC+C
Sbjct  1    GNPKPSRFEYRCTDV-CDYDRVMAWIFQACVGIGGYRLTSNAHITDILDRNVGGSAICIC  59

Query  79   ARGQTKAHDYNISGDYPPGVAHLTFDVRAPYWC  111
            A GQ +   Y  SG YP GV  L F     + C
Sbjct  60   AHGQIEDGYYYPSGYYPEGVVSLQFHKIGKFEC  92
```

Figura 5-4. Comparación de secuencias entre ECP-5 y TDFMu1 **A**. secuencia obtenida a partir del fragmento amplificado por PCR y clonado desde el genoma del aislamiento GCL009 de *M. ulei*. **B**. Alineamiento generado entre el TDFMu1 obtenido mediante AFLPs a partir de plantas del clon IAN-710 infectadas con el aislamiento GCL009 de *M. ulei* y la secuencia obtenida desde el genoma *M. ulei.* **C**. Alineamiento entre el péptido generado a partir del transcripto TDFMu1 y la proteína ECP-5 de *C fulvum*.

Como se mencionó en el capitulo anterior ECP-5 forma parte de un grupo de cinco proteínas efectoras que *C. fulvum* secreta extracelularmente al apoplasto durante su interacción con *L. esculentum*, estos son reconocidos por los genes *Cf-Ecp* encontrados originalmente en *L. pimpinellifolium* los cuales son homologos a los genes *Cf* (*Cf2* y *Cf5, Cf4* y *Cf9*) (Thomas *et al*. 1998), estos presentan dominios LRR extracelulares que pueden actuar como receptores y reconocen directamente elicitores del patógeno (Joosten & Wit 1999). En este estudio se encontró un transcrito (TDFHb5) con homología al dominio LRR del gen *Cf-5*. García *et al*, (2011) encontraron un EST con similaridad al

gen *Cf-5* de *A. thaliana* el cual presenta similaridad con *Cf-5* de *L. esculentum* y aumento su expresión en el clon MDF-180 con resistencia parcial a *M. ulei*. Lo anterior permite plantear que TDFHb5 o posibles homólogos de este transcrito podrían reconocer específicamente la proteína producto del transcripto TDFMu1 encontrada en *M. ulei* con similaridad a ECP-5 de *C. fulvum* y que es reportada primera vez en este estudio.

5.3 Conclusiones

La detección del TDFMu1 en el genoma de los aislamientos GCL009 y RCP009 de *M. ulei* y la posterior evaluación de su expresión por qRT-PCR durante las primeras horas de la interacción con los tres clones de caucho natural evaluados RRIM600 (S), FX 3864 (RP), FX 2261(RT), permiten proponerlo como el primer efector del hongo, el cual podría ser reconocido específicamente por *H. brasiliensis*.

Los resultados obtenidos mediante qRT-PCR fueron concordantes con los obtenidos cualitativamente mediante cDNA-AFLPs para la mayoría de los TDFs evaluados, observandose una mayor expresión de los genes en los clones con resistencia y un comportamiento de represión de la expresión en el clon susceptible.

El análisis de anova realizado a una sola vía con un valor p de 0.05, permitió establecer diferencias significativas en la expresión de 10 de los 12 genes seleccionados para ser evaluados por qRT-PCR, observándose mayores cambios a las 24 y 48 phi.

El TDFHb68 con similaridad a una proteína de resistencia NBS de *Euphorbia eusula* cuya expresión se vio aumentada en los clones FX-3864 (RP) y FX-2261 (RT), se sugiere como un gen candidato R asociado a la resistencia de *H. brasiliensis* a *M. ulei*.

Los resultados obtenidos permiten sugerir como modelo de estudio la interacción *L. esculentum – C. fulvum*, la cual puede contribuir a entender molecularmente la interacción *H. brasiliensis – M. ulei.*

5.4 Conclusiones generales

La interacción *Hevea spp.– M. ulei* ha sido bien documentada a nivel de campo y en condiciones controladas. Se ha observado el comportamiento de resistencia total en algunos clones de *H. brasiliensis* o sus híbridos con *H. benthamiana* y *H. pauciflora*, también se ha visto resistencia parcial y susceptibilidad de los mismos materiales a otros aislamientos del hongo. A partir de esto se han establecido más de 60 razas diferentes de *M. ulei* teniendo como criterios la capacidad de infectar o no una serie diferencial de clones con una base genética definida. Los resultados obtenidos en este trabajo basados en la intensidad de esporulación observada muestran que los clones RRIM 600 y PB 260 fueron susceptibles a los dos aislamientos evaluados GCL009 y RCP009. El clon FX 3864 fue resistente a un aislamiento y susceptible al otro, lo mismo se observó con el clon IAN 710 y con el clon FX 2261 analizado únicamente con el aislamiento RCP009, se observó una posible respuesta hipersensible.

Al analizar este comportamiento respecto a la expresión diferencial génica obtenida mediante cDNA-AFLPs y validada por qRT-PCR, se encontró de manera general una supresión de la expresión de la mayoría de genes evaluados en los clon susceptible RRIM 600 a las 24 y 48 hpi, evento que podría corresponder a la capacidad el patógeno de evadir y suprimir PTI. En el caso de los clones que presentaron resistencia a uno de los aislamientos y que presentaron a su vez una sobreexpresión de genes con dominios característicos de proteínas R, lo cual es poco usual ya que se consideran con expresión constitutiva , estarían reconociendo de una manera directa o indirecta posibles efectores del patógeno y desencadenando una respuesta ETI. Las posibles diferencias en cuanto a la intensidad de esporulación observada en el caso de los clones IAN 710 y FX 3864 con el aislamiento más agresivo, podría corresponder a una resistencia de tipo cuantitativo la cual estaría presente una vez se ha quebrado la resistencia total.

Sobre los resultados generados a nivel de los aislamientos de *M. ulei* obtenidos y caracterizados en este estudio, se confirmó mediante el análisis de la región completa ITS la inclusión del genero *Microcyclus* dentro de la familia *Mycophaerallae* previamente reportada mediante caracteres morfológicos por Ericsson y Hawksworth (1993), adicionalmente se contribuye con secuencias depositadas en el GenBanK publicadas por primera vez para una especie de este género que posteriormente podrán ser utilizadas

para estudios taxonómicos. De otro lado la identificación de un transcrito con similaridad a un efector de *C. fuvum* da soporte al modelo de interacción gen por gen con *Hevea spp.* Teniendo en cuenta los genes expresados diferencialmente se planteo un posible esquema del modelo de interacción entre *Hevea spp.* y *M. ulei* (Figura 5-5).

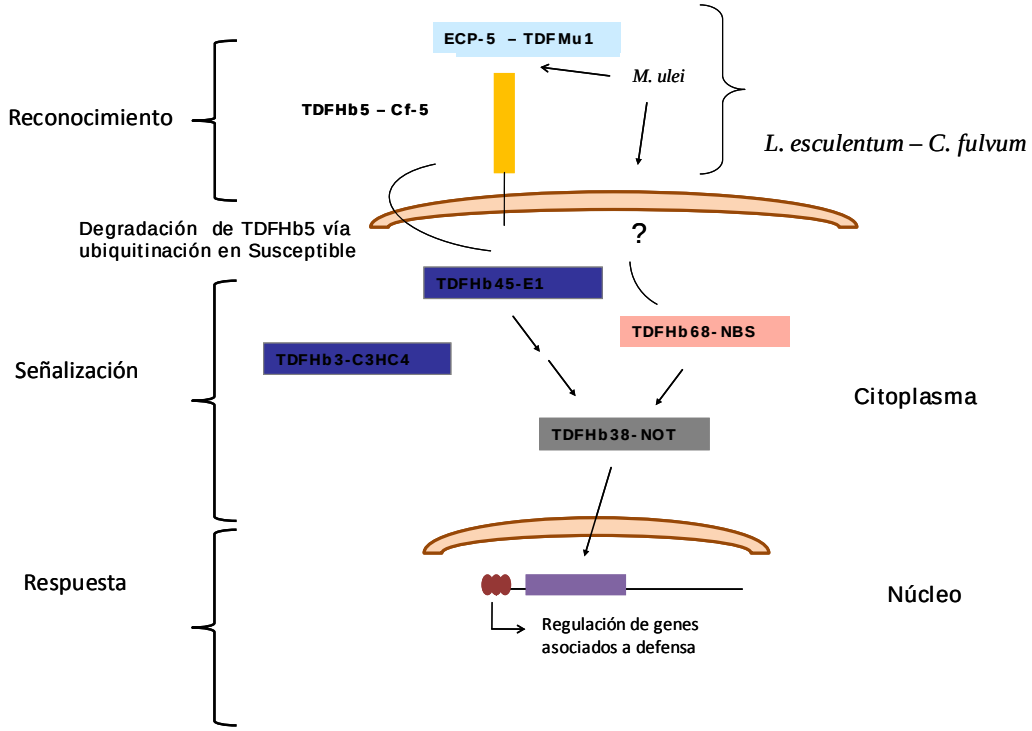


Figura 5-5. Esquema del modelo de la Interacción *Hevea spp.* – *M. ulei* generado a partir de los resultados obtenidos.

6. RECOMENDACIONES

Ampliar la cobertura de los trancriptomas de las interacciones incompatibles y compatibles del patosistema *M. ulei – Hevea sp* a las 24 y 48 horas posinoculación, tiempos en los cuales se encontró mayor variación de la expresión. A través de la aplicación de tecnologías de secuenciación masiva como RNA-seq, que permitirá no solo encontrar un mayor número de genes asociados a defensa, sino también obtener borradores de la secuencia completa de algunos de los genes encontrados, mediante la aplicación de algoritmos para la realización de ensamblaje de novo. Como es el caso del gen con homología a una proteína NBS encontrado en esta investigación, el cual se sobreexpresó en los clones con resistencia al SALB.

Se recomienda la obtención completa de la secuencia del TDFMu1 con el fin de poder clonarlo y expresarlo en in vitro, así como del gen LRR con el fin de evaluar la posible interacción entre estos utilizando ensayos de doble hibrido.

Comparar las secuencias obtenidas en este estudio con las obtenidas por García *et al*, (2011), lo cual permitirá tomar decisiones sobre qué genes se deben seguir estudiando. Por ejemplo para usarlos como marcadores de expresión asociados a resistencia a *M. ulei* en programas de selección y mejoramiento de clones.

ANEXOS

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

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

Preparación para un litro

-Hervir 250 g de papa previamente pelada y picada en 700 ml de agua destilada durante 10 minutos. Cuando la papa esté cocida retirar el agua con ayuda de un colador y dejar enfriar

- Pesar en un baker con 200 ml de agua destilada los siguientes productos, 10 g de sacarosa, 2 g de fosfato de potasio monobásico, mezclar y adicionar la solución a los 700 ml de cocido de papa.

-Adicionar en cabina de flujo laminar 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 500 ppm

- Ajustar el pH a 5.00 y adicionar 20 g de agar-bacteriológico No1, calentar hasta disolverlo completamente, completar a volumen y verterlo en erlenmeyers (25 ml) o tubos de 125 ml (20 ml)

-Esterilizar a 121º C. (1 atm.) por 15 min., dejar enfriar y almacenar a 4 ^{0}C para su posterior uso.

Medio de cultivo para esporulación de *M. ulei*

-Hervir 250 g de papa previamente pelada y picada en 700 ml de agua destilada durante 10 minutos. Cuando la papa esté cocida retirar el agua con ayuda de un colador y dejar enfriar

- Pesar en un baker con 200 ml de agua destilada los siguientes productos, 10 g de sacarosa, 6 g de neopeptona, mezclar y adicionar la solución a los 700 ml de cocido de papa.

-Adicionar en cabina de flujo laminar en condiciones estériles 1 ml de una solución de aminoácidos (triptófano 250 ppm, clorhidrato de lisina 1000 ppm 250 ppm de treonina) y 1 ml de una solución de cloranfenicol 500 ppm.

- Ajustar el pH a 5.00 y adicionar 20 g de agar-bacteriológico No1, calentar hasta disolverlo completamente, completar a volumen y verterlo en erlenmeyers de 250 ml (25 ml).

-Esterilizar a 121º C. (1 atm.) for 15 min, dejar enfriar y almacenar a 4 ^{0}C para su posterior uso.

Anexo B. Aislamientos de *M. ulei* obtenidos a partir de foliolos de *H. brasiliensis* no incluidos en el estudio por su baja esporulación.

Aislamiento	Procedencia	Fecha de colección	Región	Clon desde donde fue aislado
IBUN-Mu68	Mavalle S.A	14-05-2006	Puerto Lopez – Meta	GT1
IBUN-Mu71	Mavalle S.A	14-05-2006	Puerto Lopez – Meta	RRIM 600
IBUN-Mu75	Cauchopar	25-06-2006	Paratebueno - Cundinamarca	Vivero
IBUN-Mu95	Mavalle S. A.	24-09-2007	Puerto Lopez – Meta	Vivero
200	Mavalle S. A.	03-12-2007	Puerto Lopez – Meta	Vivero
201	Mavalle S. A.	20-09-2008	Puerto Lopez – Meta	Vivero
215	Corpoica La libertad	15-05-2008	Puerto Lopez – Meta	GT1
217I	Corpoica La libertad	15-05-2008	Puerto Lopez – Meta	GT1
222	Cauchopar	04-07-2008	Paratebueno - Cundinamarca	PB 260
242	Mavalle	13-08-2008	Puerto Lopez – Meta	PB 260
245	Mavalle	13-08-2008	Puerto Lopez – Meta	GT 1
290	Mavalle	27-10-2008	Puerto Lopez – Meta	RRIM 600
297	Mavalle	27-10-2008	Puerto Lopez – Meta	RRIM 600
GCL109	Corpoica La libertad	2009	Paratebueno - Cundinamarca	GT 1

Anexo C Preparación de adaptadores para la realización de cDNA-AFLPs

Secuencia de adaptadores:

Eco-F: 5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'

Eco-R: 5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3'

Mse-F: 5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'

Mse-R: 5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'

Adaptador *Eco*RI concentración final de 5 uM

25 µl de adaptador F-*Eco*RI (100 µM)

25 µl de adaptador R-*Eco*RI (100 µM)

450 µl de TE

500 µl Vol final

Adaptador *Mse*I concentración final de 50µM

250 µl de adaptador F-*Mse*I (100 µM)

250 µl de adaptador R-*Mse*I (100 µM)

500 µl total

Después de mezclar los adaptadores calendar a 95 ^{o}C por 5 min para denaturar, dejar enfriar lentamente con el fin de renaturar completamente las cadenas.

ANEXO D Secuencia ITS1/RNA5.8S/ITS2 de seis aislamientos de *M. ulei* provenientes de la Altillanura colombiana

>Mu1 (479 pb) ID en el GenBank EF543263

GGATAGAAGAGGAGCGCCGACTCACCCCTCATGTGACCCCACCCGTTGCTTCGGGGGCGACCCCGCCG
GCACGCGTGCCGGCGCCGGGCGCCCCCGGAGGTCTCCTCAACACGGCATCTTCTGCGTCGGAGCGTC
ACAGCAAATGACACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCGAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCCCTCAAGCCCCGGCTTGGTGTTGGGCGTCGC
GGCCCCGCGCGCCTCAAAGTCTCCAGCCAGGCCGTCCGTCTCCTAGCGTCGTGCAGTCACATCATCCG
CTTTGGAGCGCGGGCGGCCGCGGCCGTCAAACCGTCCACTCAGGTGACCTCGATCGGCAGATCAATCC

>Mu67 (481 pb) ID en el GenBank EF543264

GGATAGAGAGGCGCGCCGACTCAACCCTCATGTGAACCCCACCCGTTGCTTCGGGGGCGACCCCGCCG
GCACGCGTGCCGGCGCCGGGCGCCCCCGGAGGTCTCCTCAACACGGCATCTTCTGCGTCGGAGCGTC
ACAGCAAATGACACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGT
ATTCCGAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCCCTCAAGCCCCGGCTTGGTGTTGGGCGTCGC
GGCCCCGCGCGCCTCAAAGTCTCCAGCCAGGCCGTCCGTCTCCTAGCGTCGTGCAGTCACATCATCCG
CTTTGGAGCGCGGGCGGCCGCGGCCGTCAAACCGTCCACTCAGGTGACCTCGATCAGAGGACCCACGT
CC

>Mu71 (488 pb) ID en el GenBank EF543265

TTTTTCGAAAAGAGGAGGCGCCGCCGACCTCAACCCCTCATGTGAACCCCACCCGTTGCTTCGGGGGC
GACCCCGCCGGCACGCGTGCCGGCGCCGGGCGCCCCCGGAGGTCTCCTCAACACGGCATCTTCTGCG
TCGGAGCGTCACAGCAATGACACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG
CCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCCCTCAAGCCCCGGCTTGGTGTTG
GGCGTCGCGGCCCCGCGCGCCTCAAAGTCTCCAGCCAGGCCGTCCGTCTCCTAGCGTCGTGCAGTCAC
ATCATCCGCTTTGGAGCGCGGGCGGCCGCGGCCGTCAAACCGTCCACTCAGGTGACCTCGATCAGAGG
ACCCACCC

>Mu95 (481 pb) ID en el GenBank EF543266

GGAAAGAGAGGCGCGCCGACCTCACCCCTCATGTGAACCCCACCCGTTGCTTCGGGGGCGACCCCGC
CGGCACGCGTGCCGGCGCCGGGCGCCCCCGGAGGTCTCCTCAACACGGCATCTTCTGCGTCGGAGCG
TCACAGCAAATGACACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTG
GTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCCCTCAAGCCCCGGCTTGGTGTTGGGCGTCG
CGGCCCCGCGCGCCTCAAAGTCTCCAGCCAGGCCGTCCGTCTCCTAGCGTCGTGCAGTCACATCATCC
GCTTGGAGCGCGGGCGGCCGCGGCCGTCAAACCGTCCACTCAGGTGACCTCGATCAGTAAATCCCACT
TT

>GCL009 (471 pb)

AGGGCGCCGCCCGACCTCCACCCCTCATGTGAACCCCACCCGTTGCTTCGGGGGCGACCCCGCCGGC
ACGCGTGCCGGCGCCGGGCGCCCCCCGGAGGGTTCCTCAACACGGCATCTTCTGCGTCGGAGCGTCAC
AGCAAATGACACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATT

CCGAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACACCCCTCAAGCCCCGGCTTGGTGTTGGGCGTCGCGGC
CCCGCGCGCCTCAAAGTCTCCAGCCAGGCCGTCCGTCTCCTAGCGTCGTGCAGTCACATCATCCGCTTT
GGAGCGCGGGCGGCCGCGGCCGTCAAACCGTCCACTCAGGTGACCTCGGATCAGGTAGG

>RCP009 (486 pb)

GAGGTCACCTGAGTGGACGGTTTGACGGCCGCGGCCGCCCGCGCTCCAAAGCGGATGATGTGACTGCA
CGACGCTAGGAGACGGACGGCCTGGCTGGAGACTTTGAGGCGCGCGGGGCCGCGACGCCCAACACCA
AGCCGGGGCTTGAGGGGTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTCGGAATACCAAAGGGCGCAATG
TGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTC
ATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGTGTCATTTGCTGTGACGCTCCGACGCAGAA
GATGCCGTGTTGAGGAACCCTCCGGGGGCGCCCGGCGCCGGCACGCGTGCCGGCGGGGTCGCCCCC
GAAGCAACGGGTGGGGTTCACATGAGGGGTTGGAGGTCGGGCGGCGGCCCTCGCTCGGTAATGATCC
CTCCGCAGG.

Anexo E Secuencias consenso obtenidas para cada TDF

>TDFHb2 333

AAGGCAATCCCAAACCCAGCAGGTTTGAGTATCGCTGCACCGATGTCTGCGACTACGACCGAGTTATGG
CTTGGATCTTCCAAGCTTGTGTCGGCATCGGCGGCTACCGTCTTACATCAAATGCTCATATCACCGACAT
TCTGGACAGGAACGTAGGTGGCAGTGCAATTTGCATATGTGCACATGGCCAGATCGAAGATGGCTATTA
TTACCCGAGTGGATATTATCCTGAAGGAGTGGTATCATTGCAATTTCACAAGATCGGGAAGTTCGAATGT
GGCTTCAGTGCCTGATGTTCAGAGCGGTCGGTTGACGGTAGCCGTCAGCTGTCTC

>TDFHb3 301

ACACATCGGGACATGCATCCTCTTCTTCTGTTGCTGAAACAATAGCTTCAATTGATTTTGATATTTCTGGC
TTCTTTGGTGAGACTGGCTTTTAACTTGCTATAGTTTTGCAAGCTGGTTCCTCGAGATCCTCACATGTTGC
TAAAGTTTCAAAACTACCACCCTAATTGTTTCTCTCACAGATTCAGAATCTGA

TGATCGTGGACCTCCCAAAATCACATCATATGGCACAGGTGCATGAGGGGACCGGAAAGTATCAGGTGT
TGAAATATTCCTATTCAAATCAGCTAGGAGACCTGCA

>TDFHb4 177

AAGGAGGTAATTTTTATCCTGTCCTCCTATTAGAGTCCTCCTGCCTCTGCTAGGGTCTGGTCGTATTCTG
CAAGGAACTCTTGTACAGTCTTGTGTCCTTGCTTTATCGTATTGACCTATAGGAGTGCTTAGCTCTTGCGG
TCTAGGTCCTTGTAGCTCTTGTTACCGGGACTCATC

>TDFHb5 163

CGAGATGGGATGGGACCATAAAATGAATTAGCAGAAAGATCAAGGAATGTCAAACCCTTGAAATTCCCCA
AGTAATCCGGCAAACTTCCACTAATTCCATTGTGTGATAGACTCAGAAAATCTAAGTTGTACGTGAGGCAT
CTTGATGAATTGGTACGCAGTC

>TDFHb6 151

TCCTTTGCTCCTGACATTCCGTAAAATCATAATTTTACACGTAGCTCTATCCCTAGAGAGTAAATCGCGAT
CTGACCATCCTCCAACCGCCCACCACTTGACCGATCTTCATGCATTTGAGTTCGCCCCATGATGTTACTC
AGGACTCATC

>TDFHb7 140

GATGGGATATGTATATAAATTAGTTGTGGAAATTGTATGAAATAATGAGTAGTGTTTATGTGTATTTGTGGT
TGTATTTGGACTTTATGAATTAGAGTTTTATTTGGTGTGTTACTCANGACTCATCACATTTCTGAAAT

>Contig 1 (TDFHb 8y9) 342

AATTCAATGATCTAAACTTATGTTTTTCATGCTTCTGCTCCTTCACATTGCAGTCATTACATTCTGGTCTAA
GAAGGTATGGAGTATCAAAGATTGACATACCTGTATCTCACATAAAATTATTACCTTCTGTTGTGCAGGCA
CCAGTTCTTGAACTCAAGTATTTACCTCAGCATTTGAAGTATGTTTACTTGGGAGACAATGAGACACTTCC
AGCTATCATCTCAAGTAATTTGACAAAAATTCAAGAAGAAAGATTGACTAGGGTTCTGAGAATACACGAGG
AAGCAATTGGATGGACAATAGCTGACATCAAAGATATAAGTCTATCCAGTATGCATG

>TDFHb11 133

ACTCTTATACAATGAATGAATGAAATGCACCTAGGAATGCCCTGATTCAATTCTTGGTGGCTTAAATTGAA
TCCTTTAGAAAGTCCATGATCATGCCATATTTACTATTTTATCCATGAATGTATGAGATGTA

>TDFHb12 109

CGAGCTTAGTGTCATGTTAGTTAGTCAAATGTATGAAAAAAGGTAATTTTCTCCAAATACACTGGGTGAAA
TTTTGGCCAACATCACCGAAATGGGGGCTTCTAATCCT

>TDFHb13 439

CCAAgATATTCTTGATTAGCTATTCGTGTGTGGaCTCTAGCAATGATGTGGTATATTTCTAAATAAATGAAA
CcAAcGGAGCACCATTTGACCTCGCcGAAGGAGAGtCGGAACTAagCTCTGGTTTTAACGAAGAGTATGCA
cGCGGCACCTTTGCTTTATTTTTTCTAgCTGAATACGCCAATATCTTAATAgTAAACACAATCTCCGCATCG
TTTCTTAGGaTCTTCCACACgTATCTCCCCATCACTTATAACCATCTCTTTGATAATcAAAGCCTCCTTGCTA
TCAATAGCCTTCTTATGAGTtCGAGCCTCATATCCCCGATTTCGATATGAcCAGCTTTATACACCTGGTGTG
AAAAAACTTTCTACCCCTTACACTAGCCCTacCAATCTGACAaATTTTCTCTGCAATCTCAaTAACAATAaTT
CCCcCT

>TDFHb14 48

AATCATCATTCAAACCACTATTTACATGCAAGAATAAGCTGTTCTTAT

>TDFHb15 30

CGCTCCTTCAGTAGGGACTGAAGGATCAAA

>TDFHb17A 317

CATTTTTTACTATTAGATAGTGTTCATAAATCTCATGATAGGTACCCAAAGATTCATAGTGAACTTCGATGG
GAGCTTCTCTTGAAGTAATAGCGCGTTGATCTAGCTGCCACCGGAGCCACAAAGGACTATCTAAATGGAT
TCTTTTCTGCCGATAAGCGCCAAGTGCATCATAGGAATTAGAAAAAAAGGGTTCTTTCGTATATTTATCGT
TATTACCGTCAATTCTTTTATTTTGATAATTTCTGCGATTACATGGATTATACCTATTTGCACAAATACCTCG
ACAATTCCCGCTTGTTACTCAGGACTCATCA

>TDFHb18A 224

ATCACACTTTCTTGTTCCTTGGTGCTGGGGAAGCTGGAACTGGAATAGCAGAGCTTATAGCTCTCGAGAT
GTCAAAACGGAGCAATGCTCCTGTAAAAGAGACTCGCAAGAAGATCTGGTTGGTGGATTCAAAGGGATT
GATTGTTAGCTCTCGAAAGGATTCACTTCAACACTTCAAGCAGCCCTGGGCTCATGAGCATGAACCTGTT
ACTCAGGACTCATCA

>TDFHb19A 236

TGTACTTGGTCAATTCTGGACTTCTTTGAGCTTCACGGTAATAAAACGTAGGACGCATTGTGTTGATGGAT
TTATCGTCTGAGGGGTTGGAGTCAATTTTGATTGTTCCTTTCACAGACCACTTTGTTCTTACTCACATTTCT
TATTCCTTCATTTCGTTCCCATTATGCGTGTATTGGAACCGATATGATGAACCATGCTTGGGTTTGTTTGT
CCGAACACCCCCAAAAAAGTTT

>TDFHb20A 141

GTTGTGGGGTGTGAGCGGAGGGTAACAACAAAGGGAGAGGGGGGGCGCGCAAAGGAAGGCAAGGGTT
GCAAGGTTCGTGAGGGGATTGGCTTAGGAATGAAAGGGGAAAGGGAAAGATGCCTGGATGAATGTGTTC
GGAAA

>Contig2 (TDFHb16b y 20b) 362

ACCACCAAGTTCGGGATGGATTGGTGTGGTTCCTGTACGCATAGGACACCAGAATATCGAACCATGAAC
GAAGAAAGGCATGAGAGAAAAGCATATTGGCTAGTGATTGTGAGGCCCCAATTCTTGACTGGAGGGGAC
ACCAAAGGCCTCTGCCCTTCCATCCCTTGGATCGATAGAGAGGGAGGGCAGAGCTTTTGGTTTTTTCATG

TTGTCAAAGAGTTGAACAATAAAAATAGATGGCGAGTACCTAATCGAATTGATCGGGTCATGTAGGAACA
AGGTTCAAGTCTACCGGTCTGTTAGGATGCCTCAGCTGCATACATCACTGCACTTCCACTTGACACCTAT
CGTAATGATAAACG

>TDFHb21b 200

TTGACGGTAACCTGCTGCGGGGAATGGTTCCCGGGCCGGGTGCGACCGCCCGTCGCGTCTGAGAGTC
GGAAACACCCCACACGAGAGGCCTAACCCCCGGGAGGGAACTGACGAACGGGAGATCCGCCATTGGG
ACGAAGTCTTAAAAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGGTGGATCACCTCCTTTCTAAGGAGCACT

>TDFHb26b 702

ACACTTGCCAGACTTATCCTGAAGGAAGGGTATCCTTACATTTTTTGGGGATTATCACGTTCGAATGTGG
CTTCAATGACTGATGTTCAAAGCGTCATCTTGAAGGTAAATCGCTGGGTAGAATACGTTACCCTAGAACG
TTGGACTACCGGTCGCATGATGAGAGTCTCTAAAACCGTACGCCGGCGACGCATCCCTCCTGGGGGAG
CTGTGACGGGCAGGAGAGCCGATTGGGACAACGAAGTAAAAAGGGACCCTACTGGAGGGTGCGGCTG
GATCACCTCTCCTCTCTGGGCTCCCTTCAAAGGCCCCGCCTGTGGGGCTGAAGGACTAGAGGGGTTCC
CGGGTGATTTGGGCAACAACGCTAAAAATCACATGAATTGAGGGTCCGCCAATGAAGTGGGGAAGAATG
TGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTGGACGTGGATTCTACGCCTCTTGAGATAGG
TCTTCCCTTGTGGCCTGTTTCCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCTCCATCGAGCGCGATTCTTGTCTTTGGTTGCCATCACGCAATGCTGCCTACTCGTGAAATATTGCC
CGGATCAACTCCGAGGAGGGGGGGGGATGACGTCAGTCTTCATGTCCCCTTACGTCCACGTCTTCACAC
ATGCTACAATG

>TDFHb27 424

CCGCGGCTGTTGAACGGATTGGCCGGTGCTTCTTCTCCACCTACCGTCAATCCTACAGAACCCGGACCT
TCATCGATGGTGAAAGAGGTTTAGAACCCGAACGCCGTCATCTCTCCTGCGAACATATCTGCATCAGGCT
TGCCCCCATTGAGCATTATTCCCCCACTGCTGCATCTCGAAGGATTCTGGCCCCTTATTTCAGGCCCGG
GGAGGCCGGACCCTTCTCAGGCCGGTTACCCGACGTCGGGTTGGAAGCCGTCCCCCCACCAAAAAATT
GATAGGCTCGCGGCTTATCCAGACCGCTAAAGCCTTTTCCATCAAAGAAGTGTATCCGGTGGGTCTTATC
CGTTTAAGACCCAGTTTCCCGGGCTTATCCCAAAGCGCAGGGCAAATCACCCTGTGTTTCTCGCTCGTTC
TCTACTTG

>TDFHb29b 146

TCTTACTCAGGACTCATCGTCATTCACGACTCTTCACGGCGACTCTAGACTCCACGTCATACTCAGGACT
CTTCGTCATTTTCGAGACTCCTCGTATTTGTCGGGACTCACCCGAATCCACATTGCTCATGTCCATCCCA
ATGTCC

>TDFHb30b 182

CCACTCGTTCTGCACTTCCTCTCTATCGATCCGGGGGATGGAAGGCCAGAGGCCTTTGGTGTCCTCTCC
AGACAAGAATTGGGGCCTCACAATCACTAGCCAATATGGTTTTCTCTTATGACTTTCTTCGTTAATGGATA
GATAAACTGGTGGCCTAGGCTAACAGCAACCACACCAATCCA

>HbTDF37 232

TGTTGAGTCTTGGAATCTTTTGGGAAATACTTGCTACTGAAGCTCCTGTTGATTGTGACGTTGGATTGGGT
TCCCATATTCAGGGGTAGTGGCTGCACTTGGTTATCCCTGGATGCGGTGTGCCATTTCACAGGAGATTG
ATGAGGTCACCTTTATGTGGGAGGACATTCATCGTGCCGTCACAAGACATTAGGGACTTTGGTGTTACTC
AGGACTCAACAATAGAGAAGAG

>TDFHb38 207

GCAGCATATAATTGAGCTTCATCCTTTGGCATGCTGTAAAATATATAAAACAATGTTTCCACTGTGAATTTT
GAAAAGTATCCTTGATGTAGAGCAGGAGGTTGTTTAGCATAATAGCACTGAGGCACACTAAACTCTGGAT
CACCCTTAGCTGGCTCATCAGACCATGGAGAGCCAAATGTCTTGTGGAGATTTTCTGTTGAATTG

>TDFHb39 232

TGAGTTCTGCNATGCTACTCTCTTATTCCTCTAGATGCTTACCCGTAAGGGCCTGACTTCGATATAAATAA
ATAAGAAGGGGTTGACTCCGCTCGTGTTGACAAATTGATGACGTCTTCCGACTCGTGTGCAACGATTCTG
TGAGTTGGATTACGTTTCATAACTCCTACAATTTCAGGTATTTAGTGAAGATTTTGACACGTCTAGATTTGC
CCTGTAATTTATTGGATTT

>TDFHb40 196

TCTCTCTCTTGCTCTGTGGCTCAGCGTTTCCTCCGCAAGCAGCCAGCGAAGCCATAATCTAACAAGTCGG
TAATAGAGTGGCCTAATGAAGAGGAGGTCCACCATGAAGACCATCGTCATTGCAATTGTTATTGTGGGAT
CGTATAAAGTGGGTGGAGGGTGAATGAGGACGAATGCACTTGAATCTGTAAGCAGT

>TDFHb41a 143

GTCTTTCTGGGCTGACTATACTTTTTAACAGTATGTCACCACCTTTGAGGAGTACCATGTGCAGAGATATG
AGGGAGCCTCCACCCTCTATGGTCCACACACACTCAGTGCCTACATTCAGGAGTTCAAGAAACTAGCTG
CAG

>TDFHb41 438

GTCGAAGCTGGCTGATAAGCTTTCTGAGCTCATGTGAGAGAATCTTGGCTTGGAGGGGGCTCGGTAATA
TCACCATTTTCTAAAAATGCACGGCCTTTACGAGGGACAACTGTGGCGACAACTGTAGGGGATTCTCGG
CCTTAATGCCGGTCGACCATATGGAGAGCTCCCAACGCGTAGGATGCATAGCTTGATCATTCTATAGAGT
CACCTAAATAGGTTGAGATAATCATGGTGATATACGTTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCAGGATTCC
ACATAACATATGGACCCGGAAGCAGACTTGTAAAGCCTGAGGCGCCTAACGAGTGAGCTAACTCACATT
ATTGCGTCGCGCTCACTGTCCGCTTTACAGTCGGAAAACTGTCGNTCGGCTGAATTAAGGATTCTCCAGA
GTACTAGAGATGCGGTTCGC

>TDFHb42a 96

AGCTGACCACTTGTACAGGCTTATGTGGAGAAATTTCAGAAGGATAAATGAAAAAAGGAACATCCTGTGT
TTTCTATTCATTTATTTTACTGTGTT

>TDFHb42b 233

TGAATTGGTACGCAGTCATGGACAGCCCTTTCCTGTGTTGGGCACCGGTTGATGCACCGTTTTACATATT
GCACCCATTACATTGCTGGCAACTTGAGATTGATGAACTTTGCAAACACACGCTTTTAACTGCAGTCATGA
TATGATCCATGCAACACCACCACCGGGAACCACACCCTCTTCAACTGCCTGGTTCGTTGAATGCAACGCA
TCATCAACGCGGTCTTTCTTCT

>TDFHb43 415

CTTGAAAACAAAGAACTATCAAGCATCAGGCTTGTTTGTGAGGAGCAACCCTGCAAGAAAGGTTTTCCTT
TGTTCTTGCTAAACTCCAAGTAATTCCCAAATTTGTGACATTCCAAAGAAAATTCACTCCAGAAGATTCATT
TATTTCAACAGATGTAATTCTAGGGGGCTGATTTTCCACTCTAAGCCCAAGATATTGCCCTCTCATGATTG
TTGAATCTTTCTCTAGCANTGAATCTATATGTCAGAAAATAATCATCTGGCAATAAAGAATATTCAACNATG
TCAAGAGATGATCGATCGCTCTTTTGGCACTGTGTAAACATGCTTAGAAAGGAGCTTCCTGATTGCATAG
AGTATCACCGTGACACAAAATTTCATACNATTTCTGGTTCTTTGAATTGGTACGCAATCA

>TDFHb44 270

ATATTCATGATAGTCGTCATTTCAAACCATTTACAATGCTTTTCAATCAATAAGTATCCATCAAATATCATTC
AAACAATTTTTCACAGTTTCAAACCATTTACAATTCTTTTCAAGCAATAAGTATCCATTCAAACACATTTCCA
TAATTGAAAACAATAATATACAAATAGTCATAATTTATTTCAATTGAAAAATTCAAAAGAAATAGCTGTTGTG
CACAAACCTTTGATAATTGTCTCCTGGCCTTGACTTAGTGTTTCCTTCCCT

>Contig3 (TDFHb45 y 46) 229

GTGATTTAGTCAGATTTGAGTGGAGACTTCTTTGATAAGTTTGACATTGTAATTGTCAGTTGCTGCACCCG
CATGACCAAGAAATTGATCAATGAGAAGTGTCGCAAGTTATCAAAGCGTGTAGCATTTTATACAGTTGACT
GTAAAGATTATTGTGGTGAGATTTTTGTTGATTTGCACAAGTATATATATACAAAGAAAAAGCTTGATGAAA
ACAATCAACCCACCG

>TDFHb48 112

CTTATACACTTGCACCTTCTGTTTCCTTGTTTGTTTTTCCTGCTCTTATACTCATCTCTAAGACATTACTTTT
ATCCTATTATGACAGGACAGCTGTTCATACTGTTCGGTT

>TDFHb49 182

AAAGAACAGTAATGAAGATTTTCTCTCTCTTTGGAATGCTGAGGAGAGGGCGACGCGAGGGGGGCTAGT
GAAGACAGATTGGAATCAAGCTCCATTCACTGCTTCCTAAAAAAATTTTAATGCTCCGCTTGTGTTTGGTC
GAATGGGGCAGCTTCCTGCGACGCAAATTCTTCACCTTCACC

>TDFHb51 334

TTTCTATAGGAAGCAGTGAATGGAGCTTGACTCCAATCTGTCTTCACTAGACCCCCTCTTGTAGCCCAAT
CATCAGCATTCCAAAGACTAGAGTAAATTTTCATTGCCTGATTCTTTGGAAATGGAACACCCATAGACTCC
AAGTTCTTGAACTCTCTAATTGGGTTGCCATCCACTGAGAATATGATCCTCTGGGGATTCCATAGAATAGA
ATAGGTGTGGAAATCTGCAGTTGGGTCAAACCACAAATAGAATTGCTGCTCTCTGTTGCCTTTGCCTTGG
CTAAACACATTAGTGTGGAGGATGTAAGGGTCGCCACTCAAATTTCCCAGGA

>TDFHb53 214

CACATTTGATTTCAAAACAAGCACCACAACTAAGGCCGTTGTTGAACAGGGCTGTGCTTAGAGCTGCAGT
GCTCACCCCGTAGCCTTGGCTGTACAGGTTTCCGTACCCACAAGCACCACCCATTGTCCCAGAGGCATC
ACTGCCTCCATAGAAAGTAGCATGGGCGCTTTGCCATGATCCACCAGTGTAAACACCAGGAATTGGTAC
GCAGTC

>TDFHb54 226
GTTTTATGCAATCAATACAGAGAAATATACTTATGGCCACAAAATTGACATTCTAACTTCCAATTCCCTTGT
GTGGAGGCTGGATTACCCCAAGGATGTGAACAATTGGACTTGGTTACCTCACCTGAAATGGGGATAAATT
TCTTCAAGGCCCCCACAATGCTTGTTCAATCACTCGAAGAGCTGGTGAAAGAGTATCGGCCCAATTGTCT
AGTTGCGGATACTT

>Contig4 (TDFHb55 y 56) 259

TCACGATGAAATTTCAAAGATTACCCGGGCCTGTCGGCCAAGGCTATAGACTCGTTGAATACATCAGTGT
AGCGCGCGTGCGGCCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGACCAGGTATCGCCTCAAACTTCCTCGGCCTA
AAAGGCCATAGTCCCTCTAAGAAGCTGGCCGCGGAGGGTCACCTCCGCATAGCTAGTTAGCAGGCTGA
GGTCTCGTTCGTTACTCAGGACTCATCGTCACTTCCCCTTAGGACTCATCAA

>TDFHb57 198
ATGATTTGTTGGCTAAGGATATCTTGACCTTGAAAAACCTTCTGATTTCTTACTTTCCAGATTTGCCATAAA
AGAAAAACTAGGTGCTGCAGCAATTCTTTCCCTTGAAAATGAGATAGAATGGTTTCAGATATTTCAATCCA
ACAATCTATCATAGAGTGCCCTAATAACAAAGTAGATTTGATCCTGAAAGGAGAG

>TDFHb59 162

ATTGGACCCATGTAACTGGCTAAGACCTGTGTAATCCTTCTGTCCAAATACGAGATGCAGCTTCAAGTTC
CAGTAAGATACACAGCCATGGGCTTTGTAGTGGGCACGCGGGCCGTGTATCAGCCAACAGCTAGTTTCC
CGATTTCGATTTCAGCTCCAGTT

>TDFHb63 91

TGATCTATGTATACAATGACTTTTGATCCAAGAAGATAGGATCTAAATTTGTCAATCACAAACACTACTGCT
AGGAATTGGTACGCAGTAT

>TDFHb64 173

TGGTCAGGACGAAGTAGAGCTCTTCGGCATATAAAGGGACTAAGGGAAGATGAAGGCAATATTGCTGAA
GATGCTGAAAACCAAGATGAATTTGACGAAGTCTCCATTTGCTATTCTTTTGTTGAGAAATTTTTGTTGATT
CCACAAGCCTTGAAAGTCCCACTTATGTTGAA

>TDFHb65 88

ATCGACAAGACCTCCCTTAGTTACCTCCAAAGTAAGATGGTAGTTGGTCCCATCCACCTTCTGTTTTTCTG
CCTTCAGGACTCATCAA

>TDFHb67 118

ATTCACGTGGGAGTTTTGACTCGACCGACTGTAAACACAATATATAATAAATTGGGGAGCTCAGCTCACC
CTCCACATAATCAAAATGTCATAACTCAAATGGGAGCTCAGCTCCCTC

>TDFHb68 230

GCGACTCGTTCGACGTGGTGGTTATGGCTACGGTGTCTCGAACACCAGACATCGACGAAATTCAGAAAA
CGATTGCTGATGTACTGGGGGTGAAACTGGAAGAAGGATCTCGATATGGCAAAGCATCGCGGCTACATC
AGGTGTTGATGAAGAAGAATAAGATCCTTGTCATCTTGGATGATATTTGGGAAAAATTTTTTTTGAAGACA
GTAGGAATTGGTACGCAGTCA

>TDFHb70 205

ATGATATGACCTGGCTTAGACCTCACGAATTAGTGACACACAAAATTCCCCTAATTCCAGGAACGATCCC
GGTAAAAGCAGAAGCTGAGAAGAATGAATCCTGACACACTGCTCAAAGTTAGGGATGAAGTCAAGAAAC
AGTATGATGCTGGGTTTCTGGAAGTAGTCAAATATCCCCAATGGATAGCTAACGTTGTCCCGGTAA

>TDFHb77 332

ACAAGGTGCCAACATCTTATTGCGTGCTATGAGTGCACCGTTGCGTCAAATCGTTGAGAACGCAGGCAG
TGAGCCGGCTGTAATTCTTGATAAAATTGTCAGCGGTGAAGGTAACTTTGGCTATAACGCTGCAACCAAT
GAGTTTGGCGATATGATCGAAATGGGTATTCTTGACCCAACTAAAGTCACACGTTCTGCACTCCAAAATG
CAGCGTCTATCGCAGGTCTTATGATCACAACAGAAGCGATGGTTGCAGAGCTTCCTAAAGAAGACTCTGC
AGGTGGTGCTGGCATGCCAGATATGGGCGGCATGGGCGGCATGATGTAATAAG

>TDFHb98 195

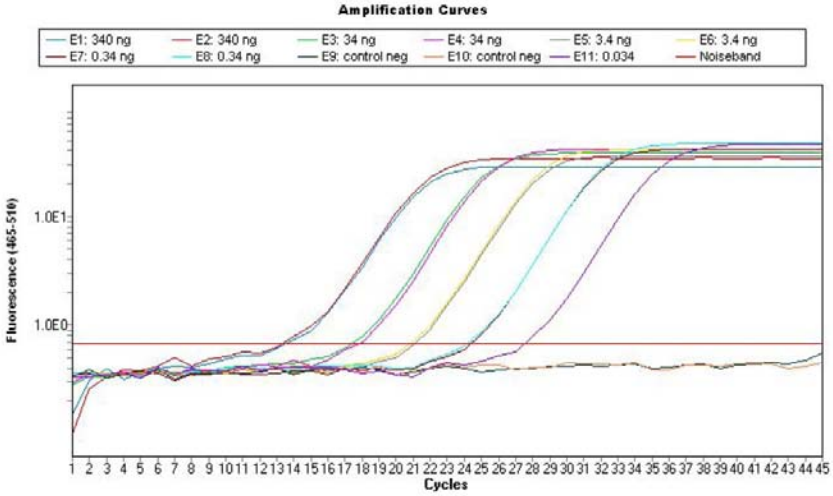
TTGATGAGTCCTGAGTAACACTAGGTAGGGTAAATTTGACTTGTTTGACATACCCACAGTAAGGGATTTAT
CTGAGGAATTGCCTAGTTTGCCACCAGAAAGAGAAGTTGAATTTGCTATTGAGATTATGCTGGGTACAGC
TCCAATTTCAATTGCTTCGTATAGGATGGCACCTGCTGAATTGGTACGCAGTCA

>TDFHb99 (387)

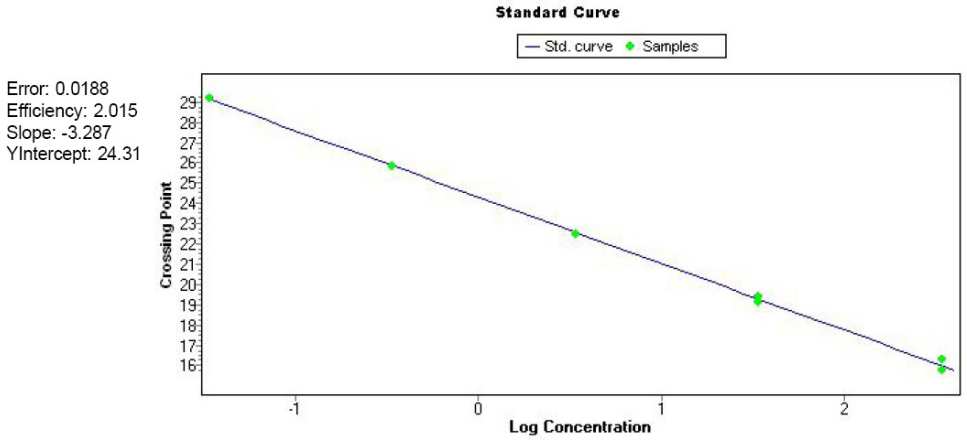
AGACGCAGAAAAAGGTGTTGATGAGTCAGGAGTAAGTGTTAGTATTTCGTTCATTCCATCGCAATGCTCC
CAGGTACAGGTAATCGTTGATGAGTCGACAGTACCTGATCAACCATATCACAACCCGGTGGATGAGTCCT
GAGTAACTGCTTTTGTTTGATCTAGACCCCAAGGTGGTGCAGTCTTCTTTAGCATATTGGAAAGATGGCT
GACGTGAGTGGCGACATGAGGAATAAACTTTATGATATAATTGACAATTCCTAAAAACTATTGCAGCTGTT
TCAATAATTCCTCCGCTATATATAGGCCTAGTTGATATTTTCCTTTTTTGAAGTGCATTCCAAGAAAGTCAA
TATCTTTCTGGGCTAGTGAATTGGTACGCAGTCA

ANEXO F Cálculo de las eficiencias para los primers utilizados

Los resultados de la eficiencia de cada juego de primers calculada mediante el uso de diluciones seriadas de DNA del clon FX 3864, estuvo entre 1.73 y 2.135 (Tabla E-1). La gráfica E-1 muestra los valores de Cp obtenidos para cada dilución de DNA utilizando los primers para la evaluación del TDFHb51. La gráfica E-2 muestra el cálculo de la eficiencia para el mismo TDF mediante la obtención de la pendiente del logaritmo de la concentración versus el Cp, de manera similar se calcularon las eficiencias para todos los juegos de primers.



Grafica E-1.Curvas de amplificación obtenidas para el TDFHb51 utilizando diferentes concentraciones de DNA. Registro tomado del Lighcycler II



Gráfica E-2 Cálculo de la eficiencia de los primers utilizados para la evaluación del TDFHb51. Registro tomado del Light cycler II.

Tabla E-1 Eficiencias obtenidas para cada juego de primers utilizado en la evaluación de los TDFs seleccionados.

Nombre de los genes evaluados	Pendiente	Eficiencia
ActHb (DQ306817)	-3.576	1.904
Act-Arab	-3.036	2.135
Factor de elongación	-3.124	2.089
TDFHb2	-3.293	2.012
TDFHb3	-3.264	2.046
TDFHb5	ND	ND
TDFHb16-20	-3,1710	2,061
TDFHB17A	-3.487	1.93
TDFHb18A	-3.6510	1.87
TDFHb37	ND	ND
TDFHb45	-4,180	1.73
TDFHb51	-3.287	2.015
TDFHb38	-4.000	1.778
TDFHb54	-3.053	2.12
TDFHb68	-3.487	1.936

LISTA DE PUBLICACIONES

- Artículos

García, I., Aristizábal F. & Montoya D. (2006). Revisión sobre el hongo *Microcyclus ulei*, agente causal del Mal suramericano de las hojas del caucho. *Revista colombiana de biotecnología.* 8(2), 50-59.

García, I., Castro O., Aristizábal F. & Tapiero Aníbal 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, I., González S., Montoya D. & Aristizábal F. (2011). Identificación *In silico* de marcadores SSRs para genotipificar jardines clonales colombianos. Agronomía Colombiana. Aceptado para publicación.

- Presentaciones en congreso

García, R, Aristizábal G. F. & Montoya D (2008). Descripción de La región ITS del hongo *Microcyclus ulei* y contribución a su clasificación taxonómica. Tercer Congreso Nacional de Biotecnología. Modalidad Poster.

Alfonso, N., García I. A., Quintero L., Aristizabal F. & Montoya D. (2008) Caracterización molecular de aislamientos de *Microcyclus ulei* causante del mal suramericano de la hoja del caucho, provenientes de la Orinoquía y Amazonía Colombiana, mediante microsatélites. Tercer Congreso Nacional de Biotecnología. Modalidad Poster.

García, I., Restrepo S., Aristizábal F. & Montoya D. (2011). El mal suramericano de las hojas del caucho evidencias de una interacción especifica entre *Hevea sp* y *Microcyclus ulei*. Ascolfi. Presentación Oral.

- Cartilla

Castaño, D., Aristizábal F., García I. Quesada I, Santacruz O. & Rodríguez S. (2008). Consideraciones técnicas sobre el mal suramericano de las hojas del Caucho. 30 pp ISBN, 978-958-719-158-5.

Bibliografía

Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier.

Albert, T. K., Lemaire, M., van Berkum, N. L. & Timmers, T. M. (2000). Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucleic Acids Research,* 28, 809-817.

Alvarenga, A. d. P. & do Carmo, A. F. (2008). Siringueira. *Vicosa, EPAMIG,* 894.

Araujo, A. E., Kalil Filho, A., Nóbrega, M. B., Sousa, N. R. & Santos, J. W. R. (2001). Reaction of ten clones of rubber (*Hevea benthamiana*) to three *Microcyclus ulei* isolates. *Acta Amazónica,* 31, 349-356.

Artus, N. N. & Edwards, G. E. (1985). NAD-malic enzyme from plants. *FEBS Letters,* 182, 225-233.

Avrova, A. O., Venter, E., Birch, P. R. J. & Whisson, S. C. (2003). Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. *Fungal Genetics and Biology,* 40, 4-14.

Backhaus, R. A. (1985). Rubber formation in plants: a minireview. *Isr J Bot,* 34, 293.

Bari, R. & Jones, J. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology,* 69, 473-488.

Baudouin, L., Baril, C., Clement-Demange, A., Leroy, T. & Paulin, D. (1997). Recurrent selection of tropical tree crops. *Euphytica,* 96, 101-114.

Belkhadir, Y., Subramaniam, R. & Dangl, J. L. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology,* 7, 391-399.

Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J. & Staskawicz, B. J. (1994). RPS2 of *Arabidopsis thaliana:* a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science,* 265, 1856-1860.

Bohnert, H. U., Fudal, I., Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J. L. & Lebrun, M. H. (2004). A Putative Polyketide Synthase/Peptide Synthetase from *Magnaporthe grisea* Signals Pathogen Attack to Resistant Rice. *The Plant Cell Online,* 16, 2499-2513.

Boldt, R. & Zrenner, R. (2003). Purine and pyrimidine biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum,* 117, 297-304.

Butler, E. J. & Jones, S. G. (1949). Tomato leaf mould, *Cladosporium fuvum* Cooke. In E. J. Butler & S. G. Jones (Eds) *Plant pathology* (pp. 672-678). London: Macmillan.

Candelo, C. R. & Motta, T. M. (1996). Perspectivas económicas para el cultivo del caucho. Bogotá: Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal - CONIF.

Cannon, P. I., Camaran, C. C. & Romero, A. I. (1995). Studies on biotrophic fungi from Argentina: *Microcyclus porleriae*, whit a key to South American species of *Microcyclus*. *Mycol.Res.,* 99, 353-356.

Castellanos, O. F., Fonseca, S. L. & Barón, M. R. (2010). Agenda Prospectiva de Investigación y Desarrollo Tecnológico para la Cadena Productiva de Caucho Natural y su Industria en Colombia. Available via http://www.agronet.gov.co/.

Confederación Colombiana de Caucho (2011). Censo Nacional Cauchero 2008-2011.

Chee, K. H. (1976). Assessing suceptibility of Hevea clones to *Microcyclus ulei*. *Annals Of Applied Biology,* 84, 135-145.

Chee, K. H. & Holliday, P. (1986). South american leaf blight of rubber. IRRDB. (13), 50 pp. MRRDB Monographs.

Chee, K. H., Kai-Ming, Z. & Darmono, T. W. (1986). Ocurrence of eight races of *Microcyclus ulei* on Hevea Rubber in Bahia, Brazil. *Transactions of the British Micological Society,* 87, 15-21.

Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. & Felix, G. (2006). The Arabidopsis Receptor Kinase FLS2 Binds flg22 and Determines the Specificity of Flagellin Perception. *The Plant Cell Online,* 18, 465-476.

Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B. & Staskawicz, B. J. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell,* 124, 803-814.

Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B. & Saindrenan, P. (2002). Downregulation of a Pathogen-Responsive Tobacco UDP-Glc:Phenylpropanoid Glucosyltransferase Reduces Scopoletin Glucoside Accumulation, Enhances Oxidative Stress, and Weakens Virus Resistance. *The Plant Cell Online,* 14, 1093-1107.

Chrestin, H., Gidrol, X. & Kush, A. (1997). Towards a latex molecular diagnostic of yield potential and the genetic engineering of the rubber tree. *Euphytica,* 96, 77-82.

Clay, N. K., Adio, A. M., Denoux, C., Jander, G. & Ausubel, F. M. (2009). Glucosinolate Metabolites Required for an Arabidopsis Innate Immune Response. *Science,* 323, 95-101.

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

Cornish, K. (2001). Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. *Phytochemistry,* 57, 1123-1134.

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

Dinesh-Kumar, S. P. & Baker, B. J. (2000). Alternatively spliced N resistance gene transcripts: Their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 97, 1908-1913.

Dixon, R. A. & Paiva, N. L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell,* 7, 1085-1097.

Dodds, P. N. & Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet,* 11, 539-548.

Durrant, W. E. & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology,* 42, 185-209.

Eckardt, N. A. (2007). Positive and Negative Feedback Coordinate Regulation of Disease Resistance Gene Expression. *The Plant Cell Online,* 19, 2700-2702.

Edathil, T. T. (1987). South American Leaf blight-a potential threat to the natural rubber industry in Asia and Africa. *Rubb Board bull,* 22, 5-11.

Ellis, J. G., Lawrence, G. J., Luck, J. E. & Dodds, P. N. (1999). Identification of Regions in Alleles of the Flax Rust Resistance Gene L That Determine Differences in Gene-for-Gene Specificity. *The Plant Cell Online,* 11, 495-506.

Eriksson, O. E. & Hawksworth, D. L. (1993). Outline of the ascomycetes. *Systema Ascomycetum,* 12, 51-257.

Feau, N., Hamelin, R. C. & Bernier, L. (2006). Attributes and congruence of three molecular data sets: Inferring phylogenies among Septoria-related species from woody perennial plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 40, 808-829.

Flor, H. H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology,* 9, 275-296.

Fregene, M., Matsumura, H., Akano, A., Dixon, A. & Terauchi, R. (2004). Serial analysis of gene expression (SAGE) of host plant resistance to the cassava mosaic disease (CMD). *Plant Molecular Biology,* 56, 563-571.

Furtado, L. E. Behavior of rubber tree (Hevea spp.) cultivars against south american leaf bligh in vale do Ribeira-sp, Brazil. 1995. Universidade de Sao Paulo. Thesis.
Futerman, A. H. & Hannun, Y. A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep,* 5, 777-782.

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*. *European Journal of Forest Pathology,* 25, 282-292.

Garcia, D., Mattos, C. R. R., Goncalves, P. d. S. & Le Guen, V. (2004). Selection of rubber clones for resistance to south american leaf blight and latex yield in the germoplasm of the Michelin plantation of Bahia (Brazil). *Journal Rubber Research,* 7, 188-198.

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, 323-338.

Garcia, D., Carels, N., Koop, D. M., de Sousa, L. A., Andrade Junior, S. J. d., Pujade-Renaud, V., Reis Mattos, C. R. & de Mattos Cascardo, J. C. (2011). EST profiling of resistant and susceptible Hevea infected by *Microcyclus ulei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology,* 76, 126-136.

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

Gasparotto, L., Figueredo, A., Rezende, J. C. & Ferreira, F. A. (1997). Doencas da Seringueira no Brasil. *Empresa Brasilera de Pesquisa Agropecuarias,* 39-41.

Gasparotto, L. & Junqueira, N. T. V. (1994). Ecophysiological variability of *Microcyclus ulei*, causal agent of rubber tree leaf blight. *Fitopatologia Brasileira,* 18, 22-24.

Gasparotto, L., Lieberei, R. & Trindade, D. (1984). *In vitro* conidia germination of *Microcyclus ulei* and its sensitivity to fungicides. *Fitopatologia Brasileira,* 9, 505-511.

Ghimire, S. R., Baird, S. M., Baker, G. T. & and Ma, P. W. K. (2009). Analysis of Proteins Associated with Chinch Bug (*Blissus leucopterusleucopterus* Say)-Infested Corn (*Zea mays* L.) Seedlings. *The Open Proteomics Journal,* 2, 20-29.

Grishin, N. V. (2001). Treble clef finger a functionally diverse zinc-binding structural motif. *Nucleic Acids Research,* 29, 1703-1714.

Gururani, M. A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C. P., Nookaraju, A., Pandey, S. K. & Park, S. W. (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology,* 78, 51-65.

Hagen, J., Gasparatto, L., Moraes, V. H. F. & Lieberei, R. (2003). Reaction of Cassava Leaves to *Microcyclus ulei*, Causal Agent of South American Leaf Blight of Rubber Tree. *Fitopatologia Brasileira,* 28, 477-480.

Hagihara, T., Hashi, M., Takeuchi, Y. & Yamaoka, N. (2004). Cloning of soybean genes induced during hypersensitive cell death caused by syringolide elicitor. *Planta,* 218, 606-614.

Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. (2002). The Ceramide-centric Universe of Lipid-mediated Cell Regulation: Stress Encounters of the Lipid Kind. *Journal of Biological Chemistry,* 277, 25847-25850.

Hashim, I. & Pereira, J. C. (1989). Lesion Size, latent period and sporulation on leaf discs as indicators of resistance of *Hevea* to *Microcyclus ulei*. *Journal Natural Rubber Research,* 4, 56-65.

Hofius, D., Tsitsigiannis, D. I., Jones, J. D. G. & Mundy, J. (2007). Inducible cell death in plant immunity. *Seminars in Cancer Biology,* 17, 166-187.

International Rubber Statistical Group (2010). Rubber Statistical Bulletin. 64pp. Singapore.

Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P. & Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J,* 19, 4004-4014.

Johal, G. S. & Briggs, S. P. (1992). Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize. *Science,* 258, 985-987.

Jones, D. A. & Jones, J. D. G. (1997). The Role of Leucine-Rich Repeat Proteins in Plant Defences. In J. H. Andrews (Ed) *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology* (pp. 89-167). Academic Press.

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

Joosten, M. H. A. J. & De Wit, P. J. G. M. (1999). The tomato - Cladosporium fulvum interaction: A versatile experimental system to the study plant-pathogen interaction. *Annu.Rev.Phytopathol,* 37, 335-367.

Junqueira, N. T. V., Gasparatto, L., Lieberei, R., Normando, M. C. & Lima, M. I. Especialicao fisiológica de *Microcyclus ulei* em diferentes especies de seringueira: Identificao de grupos de patotipos. Fitopatologia Brasileira 14[2], 147. 1989.

Junqueira, N. T. V., Kalil Filho, A. & Araujo, A. E. Genètica da resistência da seringueira ao *Microcyclus ulei*. Fitopatologia Brasileira 14[2], 149. 1992.

Junqueira, N.T.V. (1985). Variabilidade fisiologica de Microcyclus ulei (P Henn) v. arx Vicosa 135 pp (D S - Universidade Federal de Vicosa).

Junqueira, N. T. V., Zambolim, L., Chaves, G. M. & Gasparatto, L. (1986). Sporulation "in vitro", varibility of conidia and pathogenicity of Microcyclus ulei. *Fitopatologia Brasileira,* 11, 667-682.

Kamoun, S. (2007). Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. *Current Opinion in Plant Biology,* 10, 358-365.

Kanazin, V., FredericK, M. L. & Shoemaker, R. C. (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 93, 11746-11750.

Katiyar-Agarwal, S., Gao, S., Vivian-Smith, A. & Jin, H. (2007). A novel class of bacteria-induced small RNAs in Arabidopsis. *Genes & Development,* 21, 3123-3134.

Kingston, R. E. (2000). Preparation and Analysis of RNA. UNIT 4.3: Phenol/SDS Method for Plant RNA Preparation. In J. Whiley & &. Sons (Eds) *Current Protocols in Molecular Biology* (pp. 4.3.1-4.3.4).

Krattinger, S. G., Lagudah, E. S., Spielmeyer, W., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L. L. & Keller, B. (2009). A Putative ABC Transporter Confers Durable Resistance to Multiple Fungal Pathogens in Wheat. *Science,* 323, 1360-1363.

KRUIJT, M. A. R. C., DE KOCK, M. J. D. & DE WIT, P. J. G. M. (2005). Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Molecular Plant Pathology,* 6, 85-97.

Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T. & Felix, G. (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *The Plant Cell Online,* 16, 3496-3507.

Langford, M. D. (1945). South American Leaf Blight of *Hevea* rubber tree. 882pp. Washington. US Dept. Agric.

Laporte, M. M., Shen, B. & Tarczynski, M. C. (2002). Engineering for drought avoidance: expression of maize NADP–malic enzyme in tobacco results in altered stomatal function. *Journal of Experimental Botany,* 53, 699-705.

Lawrence, G. J., Finnegan, E. J., Ayliffe, M. A. & Ellis, J. G. (1995). The L6 Gene for Flax Rust Resistance Is Related to the *Arabidopsis* Bacterial Resistance Gene RPS2 and the Tobacco Viral Resistance Gene N. *The Plant Cell Online,* 7, 1195-1206.

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, 335-3.

Le Guen, V., Lespinasse, D., Oliver, G., Rodier-Goud, M., Pinard, F. & Seguin, M. (2003). Molecular mapping of genes conferring field resistance to South American Leaf Blight *(Microcyclus ulei)* in rubber tree. *TAG Theoretical and Applied Genetics,* 108, 160-167.

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, 1498-1503.

Lehti-Shiu, M. D., Zou, C., Hanada, K. & Shiu, S. H. (2009). Evolutionary History and Stress Regulation of Plant Receptor-Like Kinase/Pelle Genes. *Plant Physiology,* 150, 12-26.

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

Lespinasse, D., Rodier-Goud, M., Grivet, L., Leconte, A., Legnate, H. & Seguin, M. (2000b). A saturated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea spp*.) based on RFLP, AFLP, microsatellite, and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics,* 100, 127-138.

Lewis, D. H. (1985). Symbiosis and mutualism: crisp concepts and soggy semantics. In D. H. Boucher (Ed) *The biology of mutualism ecology and evolution*.

Liang, H., Yao, N., Song, J. T., Luo, S., Lu, H. & Greenberg, J. T. (2003). Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes & Development,* 17, 2636-2641.

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, 63-68.

Lieberei, R., Schrader, A., Biehl, B. & Chee, K. H. (1983). Effect of cyanide on *Microcyclus ulei* cultures. *Journal of the Rubber Research, Institute of Malaysia,* 31, 227-235.

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, 1125-1142.

Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta cT}$ Method. *Methods,* 25, 402-408.

López, C. E., Zuluaga, A. P., Cooke, R., Delseny, M., Tohme, J. & Verdier, V. (2003). Isolation of Resistance Gene Candidates (RGCs) and characterization of an RGC cluster in cassava. *Molecular Genetics and Genomics,* 269, 658-671.

Lopez, C., Soto, M., Restrepo, S., Piegu, B., Cooke, R., Delseny, M., Tohme, J. & Verdier, V. (2005). Gene expression profile in response to *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis infection in cassava using a cDNA microarray. *Plant Molecular Biology,* 57, 393-410.

Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S. & Weissman, A. M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 96, 11364-11369.

Lu, D., Lin, W., Gao, X., Wu, S., Cheng, C., Avila, J., Heese, A., Devarenne, T. P., He, P. & Shan, L. (2011). Direct Ubiquitination of Pattern Recognition Receptor FLS2 Attenuates Plant Innate Immunity. *Science,* 332, 1439-1442.

Ma, S. & Bohnert, H. (2007). Integration of Arabidopsis thaliana stress-related transcript profiles, promoter structures, and cell-specific expression. *Genome Biology,* 8, R49.

Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R. & Dangl, J. L. (2003). Arabidopsis RIN4 Is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. *Cell,* 112, 379-389.

Mackey, D. & McFall, A. J. (2006). MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecular Microbiology,* 61, 1365-1371

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (2010). Contribución a la certificación por técnicas moleculares del material comercial de *Hevea brasiliensis*. de interés para Colombia, Bogotá.

Marathe, R., Guan, Z., Anandalakshmi, R., Zhao, H. & Dinesh-Kumar, S. (2004). Study of *Arabidopsis thaliana* resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray. *Plant Molecular Biology,* 55, 501-520.

Martinoia, E. & Rentsch, D. (1994). Malate compartmentation: responses to a complex metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol,* 45, 447-467.

Marx, J. (2002). Ubiquitin Lives Up to Its Name. *Science,* 297, 1792-1794.

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

Meyers, B. C., Morgante M. & Michelmore R.W. (2002). TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in Arabidopsis and other plant genomes. *Plant J,* 32, 77-92.

Miller, J. W. (1966). Diferencial clones of *Hevea* for identifying races of *Dothidella ulei*. *Plant Disease Reporter,* 50, 187-190.

Mooibroek, H. & Cornish, K. (2000). Alternative sources of natural rubber. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 53, 355-365.

Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A. R. & Dobbie, Z. (2002). Processing of Gene Expression Data Generated by Quantitative Real-Time RT-PCR. *Biotechniques,* 32, 2-7.

Nakamaru-Ogiso, E., Han, H., Matsuno-Yagi, A., Keinan, E., Sinha, S. C., Yagi, T. & Ohnishi, T. (2010). The ND2 subunit is labeled by a photoaffinity analogue of asimicin, a potent complex I inhibitor. *FEBS Letters,* 584, 883-888.

Noel, L., Moores, T. L., van der Biezen, E. A., Parniske, M., Daniels, M. J., Parker, J. E. & Jones, J. D. G. (1999). Pronounced Intraspecific Haplotype Divergence at the RPP5 Complex Disease Resistance Locus of *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online,* 11, 2099-2112.

Oghenekome, U. (2004). Natural rubber, *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Mull. Arg, germplasm collection in the Amazon Basin, Brazil: A retrospective. *Economic Botany,* 58, 544-555.

Oliver, R. P. & Solomon, P. S. (2010). New developments in pathogenicity and virulence of necrotrophs. *Current Opinion in Plant Biology,* 13, 415-419.

Ong, S. H. (1979). Cytotaxonomic investigation of the genus *Hevea*. PhD, Univ. of California.

Paiva, J. R. d. & Kageyama, P. Y. (1993). New approach for rubber tree breeding for de Amazon region. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira,* 28, 1931-1938.

Parniske, M., Hammond-Kosack, K. E., Golstein, C., Thomas, C. M., Jones, D. A., Harrison, K., Wulff, B. B. H. & Jones, J. D. G. (1997). Novel Disease Resistance Specificities Result from Sequence Exchange between Tandemly Repeated Genes at the *Cf-4/9* Locus of Tomato. *Cell,* 91, 821-832.

Pata, M. O., Wu, B. X., Bielawski, J., Xiong, T. C., Hannun, Y. A. & Ng, C. K. Y. (2008). Molecular cloning and characterization of OsCDase, a ceramidase enzyme from rice. *The Plant Journal,* 55, 1000-1009.

Pérez-Vera, O., Yáñez-Morales, Y., Alvarado-Rosales, D., Cibrián-Tovar, D. & García-Diáz, S. (2005). Hongos asociados a eucalipto, Eucaliptos grandis Hill: Maid. *Agrociencia,* 39, 311-318.

Perfect, S. E. & Green, J. R. (2001). Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology,* 2, 101-108.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research,* 29, e45.

Pinheiro, E. & Libonati, V. F. (1971). O emprego do *Hevea pauciflora* M. A. como fuente genetica de resitencia au mal das folhas. *Polimeros,* 1, 31-39.

Pitzschke, A., Schikora, A. & Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology,* 12, 421-426.

Polhamus, L. G. (1962). Rubber, Botany, production, and utilization.

Pritchard, L. & Birch, P. (2011). A systems biology perspective on plant-microbe interactions: Biochemical and structural targets of pathogen effectors. *Plant Science,* 180, 584-603.

Priyadarshan, P. M. & Goncalves, P. d. S. (2003). *Hevea* gene pool for breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution,* 50, 101-114.

Rairdan, G. J., Collier, S. M., Sacco, M. A., Baldwin, T. T., Boettrich, T. & Moffett, P. (2008). The Coiled-Coil and Nucleotide Binding Domains of the Potato Rx Disease Resistance Protein Function in Pathogen Recognition and Signaling. *The Plant Cell Online,* 20, 739-751.

Ridout, C. J., Skamnioti, P., Porritt, O., Sacristan, S., Jones, J. D. G. & Brown, J. K. M. (2006). Multiple Avirulence Paralogues in Cereal Powdery Mildew Fungi May Contribute to Parasite Fitness and Defeat of Plant Resistance.*The Plant Cell Online,* 18, 2402-2414.

Rinaldi, C., Kohler, A., Frey, P., Duchaussoy, F., Ningre, N., Couloux, A., Wincker, P., Le Thiec, D., Fluch, S., Martin, F. & Duplessis, S. (2007). Transcript Profiling of Poplar Leaves upon Infection with Compatible and Incompatible Strains of the Foliar Rust Melampsora larici-populina. *PLANT PHYSIOLOGY,* 144, 347-366.

Rissler, J. F. & Millar, R. L. (1977). Contribution of a cyanide-insensitive alternate repiratory system to increases in formamide hydro-lyases activity and to growth in *Stemphylium loti in Vitro*. *PLANT PHYSIOLOGY,* 60, 857-861.

Rivano, F. (1997). South american leaf blinght of Hevea I. Variability of *Microcyclus ulei* pathogenecity. *Plantation Recherche Devel,* 4, 104-114.

Ron, M. & Avni, A. (2004). The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance-Like Gene Family in Tomato. *The Plant Cell Online,* 16, 1604-1615.

Rose, L. E., Bittner-Eddy, P. D., Langley, C. H., Holub, E. B., Michelmore, R. W. & Beynon, J. L. (2004). The maintenance of extreme amino acid diversity at the disease resistance gene, RPP13, in Arabidopsis thaliana. *Genetics,* 166, 1517-1527.

Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. & Hunt, M. D. (1996). Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell Online,* 8, 1809-1819.

Santaella, M., Suárez, E., López, C., Gonzalez, C., Mosquera, G., estrepo, S., ohme, J., adillo, A. & erdier, V. (2004). Identification of genes in cassava that are differentially expressed during infection with *Xanthomonas axonopodis* pv. manihotis. *Molecular Plant Pathology,* 5, 549-558.

Sarowar, S., Oh, H. W., Cho, H. S., Baek, K. H., Seong, E. S., Joung, Y. H., Choi, G. J., Lee, S. & Choi, D. (2007). Capsicum annuum CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response. *The Plant Journal,* 51, 792-802.

Schaaf, J., Walter, M. H. & Hess, D. (1995). Primary Metabolism in Plant Defense (Regulation of a Bean Malic Enzyme Gene Promoter in Transgenic Tobacco by Developmental and Environmental Cues). *Plant Physiology,* 108, 949-960.

Schubert, K., Ritschel, A. & Braun, U. (2003). A monograph of *Fusicladium* s. lat. (Hyphomycetes). *Schlenchtendalia,* 9, 1-132.

Seehaus, K. & Tenhaken, R. (1998). Cloning of genes by mRNA differential display induced during the hypersensitive reaction of soybean after inoculation with Pseudomonas syringae pv. glycinea. *Plant Molecular Biology,* 38, 1225-1234.

Shen, K. A., Chin, D. B., Arroyo-Garcia, R., Ochoa, O. E., Lavelle, D. O., Wroblewski, T., Meyers, B. C. & Michelmore, R. W. (2002). Dm3 is one member of a large constitutively expressed family of nucleotide binding site-leucine-rich repeat encoding genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions,* 15, 251-261.

Shen, Q. H., Saijo, Y., Mauch, S., Biskup, C., Bieri, S., Keller, B., Seki, H., Ulker, B., Somssich, I. E. & Schulze-Lefert, P. (2007). Nuclear Activity of MLA Immune Receptors Links Isolate-Specific and Basal Disease-Resistance Responses. *Science,* 315, 1098-1103.

Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H. & Shibuya, N. (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant Journal,* 64, 204-214.

Si, Y., Zhang, C., Meng, S. & Dane, F. (2009). Gene expression changes in response to drought stress in *Citrullus colocynthis*. *Plant Cell Reports,* 28, 997-1009.

Slawiak, M. & Lojkowska, E. (2009). Genes responsible for coronatine synthesis in Pseudomonas syringae; present in the genome of soft rot bacteria. *European Journal of Plant Pathology,* 124, 353-361.

Soriano, J. M., Vilanova, S., Romero, C., Ll+ícer, G. & Badenes, M. L. (2005). Characterization and mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics,* 110, 980-989.

Soumpourou, E., Iakovidis, M., Chartrain, L., Lyall, V. & Thomas, C. (2007). *Solanum pimpinellifolium* Cf-ECP1 and Cf-ECP4 genes for resistance to *Cladosporium fulvum* are located at the Milky Way locus on the short arm of chromosome 1. *TAG Theoretical and Applied Genetics,* 115, 1127-1136.

Staal, J. & Dixelius, C. (2007). Tracing the ancient origins of plant innate immunity. *Trends in Plant Science,* 12, 334-342.

Staal, J., Kaliff, M., Bohman, S. & Dixelius, C. (2006). Transgressive segregation reveals two Arabidopsis TIR-NB-LRR resistance genes effective against Leptosphaeria maculans, causal agent of blackleg disease. *The Plant Journal,* 46, 218-230.

Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. G. & Jones, J. D. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science,* 268, 661-667.

Stergiopoulos, I. & DE WIT, P. J. G. M. (2009). Fungal Effector Proteins. *Annual Review of Phytopathology,* 47, 233-263.

Stergiopoulos, I., van den Burg, H. A., +ûkmen, B., Beenen, H. G., van Liere, S., Kema, G. H. J. & DE WIT, P. J. G. M. (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, 7610-7615.

Stirling, D. (2004). DNA extraction from fungi, Yeast and Bacteria. In J. M. Barlert & D. Stirling (Eds) *PCR protocols Method in Molecular Biology* (pp. 53-54).

Suarez-Rodriguez, M. C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S. H., Jester, P. J., Zhang, S., Bent, A. F. & Krysan, P. J. (2007). MEKK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in Arabidopsis Plants. *Plant Physiology,* 143, 661-669.

Takizawa, M., Goto, A. & Watanabe, Y. (2005). The tobacco ubiquitin-activating enzymes NtE1A and NtE1B are induced by tobacco mosaic virus, wounding and stress hormones. *Molecules and Cells,* 19, 228-231.

Takken, F. L. W. & Tameling, W. I. L. (2009). To Nibble at Plant Resistance Proteins. *Science,* 324, 744-746.

Tameling, W. I. L., Vossen, J. H., Albrecht Mario, Lengauer Thomas, Berden Jan A, Cornelissen Ben J.C. & Takken, F. L. W. (2006). Mutations in the NB-ARC Domain of I-2 That Impair ATP Hydrolysis Cause Autoactivation. *Plant Physiol,* 140, 1233-1245.

Thomas, C. M. (1998). Genetic and molecular analysis of tomato *Cf* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.Series B: Biological Sciences,* 353, 1413-1424.

Thomma, B. P. H. J., Nunberger, T. & Joosten, M. H. A. J. (2011). Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The Plant Cell Online,* 23, 4-15.

Tiffin, P. & Moeller, D. A. (2006). Molecular evolution of plant immune system genes. *Trends in Genetics,* 22, 662-670.

Townley, H. E., McDonald, K., Jenkins, G. I., Knight, M. R. & Leaver, C. J. (2005). Ceramides induce programmed cell death in Arabidopsis cells in a calcium-dependent manner. *Biological Chemistry,* 386, 161-166.

Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J. & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nature Biotechnology,* 28, 511-515.

Tucker, M., Valencia-Sanchez, M. A., Staples, R. R., Chen, J., Denis, C. L. & Parker, R. The Transcription Factor Associated Ccr4 and Caf1 Proteins Are Components of the Major Cytoplasmic mRNA Deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. Cell 104[3], 377-386. 2001.

Udvardi, M. K., Czechowski, T. & Scheible, W. R. (2008). Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The Plant Cell Online,* 20, 1736-1737.

van Beilen, J. B. & Poirier, Y. (2007). Establishment of new crops for the production of natural rubber. *Trends in Biotechnology,* 25, 522-529.

van der Hoorn, R. A. L. & Kamoun, S. (2008). From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell Online,* 20, 2009-2017.

van Esse, H. P., Thomma, B. P. H. J., 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, 599-608.

van Loon, L. C., Rep, M. & and Pieterse C.M.J. (2006). Significance of inducible defense related proteins in infected plants. *Annu.Rev.Phytopathol,* 44, 135-162.

Vance, V. & Vaucheret, H. (2001). RNA silencing in plants-defense and counterdefense. *Science,* 292, 2277-2280.

VanGuilder, H. D., Vrana, K. E. & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques,* 44, 619-626.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. v. d., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research,* 23, 4407-4414.

Wall, P. K., Leebens-Mack, J., Chanderbali, A., Barakat, A., Wolcott, E., Liang, H., Landherr, L., Tomsho, L., Hu, Y., Carlson, J., Ma, H., Schuster, S., Soltis, D., Soltis, P., Altman, N. & dePamphilis, C. (2009). Comparison of next generation sequencing technologies for transcriptome characterization. *BMC Genomics,* 10, 347.

Wan, J., Dunning, M. & Bent, A. (2002). Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Functional & Integrative Genomics,* 2, 259-273.

Wang, G. L., Ruan, D. L., Song, W. Y., Sideris, S., Chen, L., Pi, L. Y., Zhang, S., Zhang, Z., Fauquet, C., Gaut, B. S., Whalen, M. C. & Ronald, P. C. (1998). Xa21D Encodes a Receptor-like Molecule with a Leucine-Rich Repeat Domain That Determines Race-Specific Recognition and Is Subject to Adaptive Evolution. *The Plant Cell Online,* 10, 765-780.

Wang, W., Wen, Y., Berkey, R. & Xiao, S. (2009). Specific Targeting of the Arabidopsis Resistance Protein RPW8.2 to the Interfacial Membrane Encasing the Fungal Haustorium Renders Broad-Spectrum Resistance to Powdery Mildew. *The Plant Cell Online,* 21, 2898-2913.

Wevelsiep, L., Kogel, K. H. & Knogge, W. (1991). Purification and characterization of peptides from Rhynchosporium secalis inducing necrosis in barley. *Physiological and Molecular Plant Pathology,* 39, 471-482.

Wheeler, M. C. G., Tronconi, M. A., Drincovich, M. F., Andreo, C. S., Flügge, U. I. & Maurino, V. G. (2005). A Comprehensive Analysis of the NADP-Malic Enzyme Gene Family of *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY,* 139, 39-51.

White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols a guide to methods and applications* Academic Press.

Wit, P. J. G. M., Joosten, M. H. A. J., Thomma, B. H. P. J. & Stergiopoulos, I. (2009). Gene for Gene Models and Beyond: the *Cladosporium fulvum* -Tomato Pathosystem Plant Relationships In H. B. Deising (Ed) (pp. 135-156). Springer Berlin Heidelberg.

Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J. & Zhou, J. M. (2008). Pseudomonas syringae Effector AvrPto Blocks Innate Immunity by Targeting Receptor Kinases. *Current Biology,* 18, 74-80.

Yang, Y., Qi, M. & Mei, C. (2004). Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *The Plant Journal,* 40, 909-919.

Zeng, L. R., Vega-Sanchez, M. E., Zhu, T. & Wang, G. L. (2006). Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Res.,* 16, 413-426.

Zhang, H., Wang, Y., Zhang, C., Wang, X., Li, H. & Xu, W. (2011). Isolation, characterization and expression analysis of resistance gene candidates in pear (Pyrus spp.). *Scientia Horticulturae,* 127, 282-289.

Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology,* 20, 10-16.

Zipfel, C. & Felix, G. (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Current Opinion in Plant Biology,* 8, 353-360.