

# Expresión diferencial durante la interacción *Solanum tuberosum* - *Phytophthora infestans*

## Differential expression during *Solanum tuberosum* - *Phytophthora infestans* interaction

Zulma Isabel Monsalve-Fonnegra\*, María Isabel Monsalve-Restrepo\*\*, Aura Inés Urrea-Trujillo\*\*\*, José Luis Zapata\*\*\*\*

### Resumen

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es el cuarto cultivo más importante a nivel mundial y es el producto agrícola con mayor demanda de fungicidas, insecticidas y fertilizantes químicos. Las pérdidas mundiales ocasionadas por *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en este cultivo, ascienden a 6,7 billones de dólares al año y su control químico genera un aumento en los costos, perjudica la salud humana y el ambiente. Todo esto justifica la búsqueda constante de mecanismos alternativos para el control de la enfermedad, entre ellos la obtención de variedades resistentes mediante *cisgenesis* usando genotipos silvestres. Como un aporte en este sentido, y dada la falta de conocimiento de lo que controla y constituye la diferencia entre una respuesta compatible e incompatible, en el presente estudio se compararon los perfiles de expresión génica obtenidos mediante Despliegue Diferencial de variedades resistentes y susceptibles durante su interacción con *P. infestans*. Los resultados evidenciaron diferencias en la expresión génica, tanto a distintos tiempos post-inoculación como en el tipo de cambio de expresión, incluyendo la presencia y ausencia de bandas diferenciales y el aumento o disminución en su intensidad. Al analizar las secuencias de fragmentos diferencialmente expresados, se encontró que algunos fragmentos sobre-expresados en las variedades susceptibles, tenían homología con secuencias que codifican para una serina-acetiltransferasa y para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa. Por su parte, fragmentos sobre-expresados en la variedad resistente, tenían homología con una secuencia codificante para un dominio transmembranal.

**Palabras claves:** pastusa suprema, diacol-capiro, parda pastusa, despliegue diferencial

### Abstract

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the fourth most important crop worldwide; also, is the agriculture product with most fungicides, insecticides and chemical fertilizers requirement. Worldwide losses caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in this crop, amount to 6,7 billion dollars per year and its chemical control increase production costs, harming human health and environment. For these reasons, is necessary constant research for alternative mechanisms to control disease, including development of resistant varieties using *cis-genesis* from wild genotypes. As a contribution in this way, and the lack of knowledge of what controls and is the difference between compatible and incompatible interaction, in this study we compared gene expression profiles obtained by Differential Display from resistant and susceptible varieties, during their interaction with *P. infestans*. The results showed differences in gene expression between resistant and susceptible varieties, at different times post-inoculation as well as exchange expression rate, including the presence and absence of differential bands and increase or decrease in their intensity. After analyzing the sequences of differential expressed fragments, we

\* Ph.D. en Biotecnología. Docente Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia Calle 67 N° 53-108, oficina 7-104. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia. zmonsalm@matematicas.udea.edu.co ; zmonsalve@gmail.com

\*\* cM.Sc. en Biotecnología. Estudiante Corporación Académica Ambiental Universidad de Antioquia.

\*\*\* Ph.D. Docente Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia. aurea@matematicas.udea.edu.co

\*\*\*\* Ph.D. Investigador Corpoica-La Selva.

**Nota:** Por su contribución los autores \* y \*\* se consideran como primer autor.

found that some overexpressed fragments from susceptible varieties had homology with an encoded sequence for a serine-acetyltransferase and for a RNA Polymerase  $\beta$  subunit. On the other hand, overexpressed fragments from resistant variety, had homology with an encoded sequence for a transmembrane domain.

**Key words:** pastusa suprema, diacol-capiro, parda pastusa, differential display

**Recibido:** febrero 1 de 2012

**Aprobado:** junio 20 de 2012

## Introducción

Constantemente, las plantas son afectadas por virus, bacterias, oomicetos, hongos, nematodos e insectos (Jacobs *et al.*, 2010); esto ha obligado a los agricultores a realizar labores de prevención, manejo y control acordes con su disponibilidad de recursos técnicos y financieros. El manejo indiscriminado de los productos químicos para el control de los patógenos, que en la mayoría de los casos no tiene en cuenta su ciclo de vida o las condiciones meteorológicas durante el cultivo, ocasiona efectos perjudiciales en la salud, no sólo de los productores sino también de los consumidores, esto sin dejar de lado el daño generado en la biodiversidad y el medio ambiente (Giraldo *et al.*, 2010). Además, la aparición de agentes etiológicos resistentes a los productos químicos o que exhiben una mayor agresividad, incrementan sustancialmente los costos de producción, los impactos ambientales y en la salud (Leonards-Schippers *et al.*, 1994). Por estas razones, se han invertido muchos esfuerzos para comprender los mecanismos de resistencia innata de las plantas contra patógenos, con el fin de establecer estrategias genéticas que confieran resistencia en plantas susceptibles ante los agentes infecciosos (Cornelissen y Melchers 1993; Martínez y Osorio 2007; McDowell y Woffenden 2003; Ros *et al.*, 2005; Stuijver y Custers 2001). Para lograr esto, es muy importante conocer detalladamente cómo se da la interacción planta-patógeno y los mecanismos de respuesta que establece el hospedero para defenderse y limitar la infección (Martini *et al.*, 1993).

El tizón tardío de la papa (*Solanum tuberosum* L.), causado por *Phytophthora infestans*, es la enfermedad más devastadora reportada en plantas, ha sido responsable de hambrunas y grandes pérdidas económicas (Abad *et al.*, 1995). En la actualidad, se estima que las pérdidas mundiales ocasionadas por la enfermedad ascienden a 6,7 billones de dólares (Haas *et al.*, 2009). Sus síntomas incluyen la destrucción o quemazón del follaje y la pudrición seca de los tubérculos (Díaz *et al.*, 2003). Adicionalmente, si los campos no están protegidos y las condiciones ambientales son óptimas, los cul-

tivos pueden ser destruidos en su totalidad en tan sólo 10 o 15 días (Fry 2008; Jaramillo 2003; Torres 2002).

El cultivo de la papa ocupa el cuarto lugar en importancia a nivel mundial después del arroz, el trigo y el maíz, debido a que es una de las principales fuentes de alimento, especialmente en países en desarrollo, dado que satisface requerimientos energéticos y nutricionales (FAO 2010; Donaire y Garcia 2006); de otro lado, es una importante fuente de empleo e ingresos económicos (Cevipapa 2010). En Colombia, es uno de los productos agrícolas con mayor demanda de fungicidas, insecticidas y fertilizantes químicos (Agrocadenas 2006).

Según la Federación Colombiana de Productores de Papa (FEDEPAPA), en Colombia existen más de 30 variedades pero sólo 10 de ellas tienen importancia comercial. La variedad denominada *Parda Pastusa* es la de mayor consumo, le sigue en importancia la *Diacol Capiro* (conocida como R12 negra) utilizada principalmente a nivel industrial. Otras variedades son la *ICA-Puracé*, la *Tuquerreña* o *Sabanera* y la *Criolla* (*Solanum phureja*). Desafortunadamente, la mayoría de estas variedades son altamente susceptibles a *P. infestans* (Maldonado *et al.*, 2010) lo que conlleva a aplicaciones frecuentes de fungicidas, representando más del 6% de los costos totales de producción (Villareal *et al.*, 2007).

En el genoma de *Solanum sp.* se encuentran codificados varios genes que confieren resistencia a diversos patógenos; inclusive, existen especies silvestres que tienen resistencia innata a *P. infestans* (Müller y Black 1952; Collard *et al.*, 2005; Colon *et al.*, 1995a; Colon *et al.*, 1995; Mosquera *et al.*, 2008; Landeo *et al.*, 2000; James y Fry 1983; Malcolmson y Black 1966; Schick *et al.*, 1958; Turkensteen 1993; Wastie 1991). En papa se han descrito los tipos de resistencia genética a *P. infestans* "vertical" y "horizontal". La primera de ellas es mediada por genes R y corresponde a una respuesta de hipersensibilidad (Li *et al.*, 2009; Bormann *et al.*, 2004; Mosquera *et al.*, 2008; Wastie 1991). La resistencia horizontal, es controlada por loci de rasgos cuantitativos (QTL) (Agrios 2005; Collard *et al.*, 2005)

que atenúan o detienen el progreso de la enfermedad (Mosquera *et al.*, 2008). Las investigaciones referentes al conocimiento del patosistema *Solanum sp.* - *P. infestans* y su consiguiente respuesta de incompatibilidad o compatibilidad, también han esclarecido que además de los genes R y los QTL, en el control de la resistencia participan variedad de genes funcionales en la respuesta de defensa (Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Trognitz *et al.*, 2002), los cuales codifican componentes clave en la síntesis de metabolitos primarios y secundarios (Joos and Hahlbrock 1992).

En las investigaciones encaminadas a la búsqueda de variedades resistentes, se han reportado algunas muy prometedoras, particularmente de *S. phureja* (Estrada 2000; Guzmán *et al.*, 1960) y variedades como la Algodona, la Jabonilla y la Flora de la especie *S. andigena* (Estrada 2000). Además, gracias al cruce entre las variedades Branca Cascuda de *S. tuberosum* y Pana Blanca de la subespecie *andigena*, se desarrolló el híbrido o cultivar comercial Diacol Monserrate, el cual presenta buenos rendimientos, aun siendo afectada por la enfermedad (Estrada 2000). Otras variedades con algún grado de resistencia, son la ICA Morita, ICA Única, ICA Zipa y el Clon 88357 (Rodríguez 2000). Sin embargo, en la mayoría de los casos la importancia comercial, las características organolépticas y la resistencia no están correlacionadas. El Grupo de Investigación de la Papa de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, desarrolló la variedad denominada Pastusa Suprema. Esta variedad es ampliamente cultivada en el departamento de Nariño y en las zonas altas de los departamentos de Cundinamarca y Boyacá (Grupo de Investigación de la Papa, 2010), es útil para fines industriales ya que tiene buena calidad culinaria y presenta alta resistencia al tizón tardío, por lo cual requiere menor cantidad de fungicidas (Jimenez *et al.*, 2009).

Aunque se ha avanzado en el conocimiento de genes de resistencia y en su clonación en variedades susceptibles, no se ha logrado establecer una resistencia duradera al ataque de *P. infestans*. Además, la comprensión a nivel molecular de cómo actúan y se interrelacionan los diferentes genes para responder al ataque de los patógenos aún no es clara. Todavía no se conoce con exactitud que controla y constituye la diferencia entre una respuesta susceptible o resistente al ataque de *P. infestans*. No obstante, sí se sabe que el reconocimiento de la infección por *P. infestans* ocurre durante o después de la invasión de las primeras células de la planta y que la respuesta compatible o incompatible, se da poco después de este reconocimiento (Freytag *et al.*, 1994). Además, es claro que una vez se da el reconocimiento del patógeno, se desencadenan una serie de

señales transduccionales que resultan en una reprogramación del metabolismo celular; particularmente, se dan grandes cambios en la transcripción de genes y la incompatibilidad entre hospedero y patógeno deriva en la regulación y expresión de genes en la planta, relacionados con la defensa y la muerte celular localizada (Ros *et al.*, 2008; Beligni, *et al.*, 1999; Lawton y Lamb 1987; McDowell y Woffenden 2003; Nürnberger y Lipka 2005). La activación de los genes relacionados con la defensa es afectado por el genotipo de la cepa de *P. infestans* que infecte la planta, el cultivar de papa y la proximidad del sitio de inoculación (Wang *et al.*, 2008). Por este motivo, estudios de expresión génica durante la interacción planta- patógeno, sumados al uso de nuevas metodologías para identificar genes que confieran resistencia a *P. infestans* en genotipos mejorados, silvestres, cultivares y materiales nativos (Jacobs *et al.*, 2010; Ballesteros *et al.*, 2010), ayudarán a comprender los eventos moleculares que determinan una respuesta de resistencia a la infección. Este conocimiento más detallado, sería de gran utilidad para poder avanzar en el mejoramiento genético de la papa y algún día conseguir cultivos con resistencia duradera a la enfermedad.

Entre las principales tecnologías para estudiar la expresión génica se encuentran el Despliegue Diferencial, Análisis en Serie de la Expresión Génica (SAGE) y los Microarreglos de DNA. Mediante los Microarreglos de DNA pueden analizarse varias muestras rápidamente (Kim 2003), pero se requiere cierto conocimiento de las secuencias a analizar (Ibrahim *et al.*, 2005), además son específicos de especie (Liang *et al.*, 2006), requieren de una capacidad instalada altamente costosa y gran habilidad en su aplicación e interpretación (Stein y Liang 2002). Con los SAGE, es posible investigar genes cuya secuencia aún no se conoce (Ibrahim *et al.*, 2005; Liang 2002; Stein y Liang 2002); sin embargo, al ser una técnica basada en la secuenciación, también requieren de una infraestructura apropiada (Stein y Liang 2002; Patino *et al.*, 2002), además pueden presentarse artefactos o pérdida de transcritos específicos (Ibrahim *et al.* 2005). A diferencia de las técnicas anteriores, el Despliegue Diferencial (DD-PCR) no requiere del conocimiento previo de las secuencias, se basa en técnicas de biología molecular sencillas, económicas y de frecuente uso (RT-PCR y PAGE; Velculescu *et al.*, 1995), los resultados son reproducibles (Bauer *et al.*, 1994) y es aplicable a un gran número de sistemas biológicos; en la actualidad, ha sido empleada en el estudio de interacciones planta- patógeno (Bailey *et al.*, 2001; Jagoueix-Eveillard *et al.*, 2001).

Mediante el análisis de los perfiles de expresión generados a partir de interacciones planta-patógeno, bajo

diferentes condiciones, es posible identificar genes que se expresan en las interacciones compatibles y no lo hacen en las incompatibles o establecer si la regulación de estos genes varía en ambas situaciones (Pinzón *et al.*, 2009). De este modo podría identificarse genes involucrados en la resistencia, pero también genes involucrados en la susceptibilidad, los cuales son mucho menos conocidos (Henriquez y Fouad Daayf 2010) y que igualmente podrían modificarse con el fin de obtener resistencias (Vogel *et al.*, 2006). Todo lo anterior valida la necesidad de continuar realizando investigaciones en torno a la respuesta de defensa en diferentes patosistemas, en aras de establecer estrategias de control de las enfermedades que afectan las plantas. Por tal razón, el objetivo del presente estudio fue comparar los perfiles de expresión génica de las variedades Pastusa Suprema, Diacol Capiro y Parda Pastusa durante su interacción con *P. infestans*, utilizando el método del Despliegue Diferencial.

## **Materiales y métodos**

### **Material vegetal**

Se utilizaron plantas de papa de las variedades Pastusa Suprema (resistente al tizón tardío), Diacol Capiro y Parda Pastusa (susceptibles al tizón tardío). Todas fueron multiplicadas *in vitro*, trasplantadas a macetas con tierra abonada y climatizadas para su cultivo en los invernaderos del Centro de Investigaciones Corpoica - La Selva (Rionegro, Antioquia). Por un periodo de cuatro semanas fueron mantenidas en condiciones promedio de 18 °C y 90% de humedad relativa, sin aplicación de fungicidas y verificando periódicamente la ausencia de síntomas visibles de enfermedades.

### **Aislamiento del Oomiceto e inoculaciones**

Como fuente de *P. infestans* se utilizó un aislamiento obtenido en el Centro de Investigaciones Corpoica - La Selva, a partir de un cultivo de papa infectado (variedad Diacol-Capiro cultivada en la Unión, Antioquia). El aislamiento fue caracterizado para establecer su virulencia usando clones diferenciales de papa portando individualmente genes de resistencia de R<sub>1</sub> a R<sub>11</sub> y un clon sin genes mayores (r). El factor de virulencia fue determinado como número de diferenciales sintomáticos después de ser inoculados con el aislamiento. La caracterización se realizó por duplicado, en dos pruebas independientes con una semana de diferencia entre ellas. El aislamiento caracterizado fue mantenido en trifolios de Diacol Capiro para posteriores ensayos.

Previo a la inoculación, se seleccionaron trifolios de Diacol Capiro conteniendo abundantes esporangios y esporangióforos de *P. infestans*, se lavaron con agua destilada y se filtro a través de microporo de 0.45 µm. Finalmente, se preparó la solución de inoculación ajustando a una concentración aproximada de 3 x10<sup>3</sup> esporangios/ml usando agua destilada estéril, la concentración fue estimada mediante microscopía.

Se llevaron a cabo infecciones de trifolios del tercio superior de las variedades Pastusa Suprema, Diacol-Capiro y Parda Pastusa con *P. infestans* bajo condiciones controladas. Para ello, en cada hoja del trifolio se dispusieron dos puntos de infección, cada uno con 30 µl de la solución de inoculación. Finalmente, se incubó en cámara húmeda disponiendo las hojas con el lado abaxial hacia arriba, con fotoperiodo de 12 horas luz, a 18 °C y 90% de humedad relativa en promedio. Los controles negativos fueron tratados de igual forma, reemplazando el inóculo por 30 µl agua destilada estéril.

De esta forma se trataron dos trifolios de cada variedad, cada uno con seis puntos de inoculación, para un total de 12 inoculaciones por variedad.

Cada 24 horas post-inoculación, se realizó inspección visual, tanto macroscópica como microscópicamente, en búsqueda de lesiones de la enfermedad, esporangios y esporangióforos.

Finalmente, se inocularon rodajas de papa (Tuquerreña) de 7 cm de diámetro con 30 µl de solución de inoculación, disponiendo como soporte un segmento de papel filtro estéril para facilitar la separación del micelio. La incubación se llevó a cabo por cinco días en las mismas condiciones ambientales descritas anteriormente (Correa y Monsalve, 2005).

### **Aislamiento del RNA y síntesis del DNA copia**

Empleando cuchillas estériles, se tomaron muestras de tejido vegetal de aproximadamente 0,25 cm<sup>2</sup> alrededor del sitio de inoculación a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas post-inoculación (hpi); en el caso de los controles se tomaron muestras de las mismas características a las 0 y 96 horas post-corte (hpc). Adicionalmente, se colectaron esporangióforos y esporangios a partir del papel filtro dispuesto sobre las rodajas de papa, mediante lavados con agua destilada (Correa y Monsalve, 2005).

Se extrajo el RNA total, tanto del material vegetal como de los esporangióforos y esporangios, mediante TRIzol® (Invitrogen Corporation, CA) siguiendo las especificaciones del fabricante. La concentración del RNA extraído y su pureza fueron estimadas mediante



espectrofotometría utilizando el NanoDrop® ND-2000 y electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en condiciones desnaturalizantes, teñido con bromuro de etidio (10mg/ml) y visualizado bajo luz UV. Posteriormente, el RNA se trató con DNaseI® (Fermentas, USA) y se purificó nuevamente con TRIzol®.

Para la síntesis del DNA complementario (cDNA), se utilizó el kit RETROscript® (Ambion, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Como control se amplificó una región transcrita del gen que codifica para la nitrato reductasa con un tamaño esperado de 230 pb. La mezcla de reacción se preparó como se describe a continuación: 2 µl del cDNA, 2,5 µl de DMSO, 0,2 µl de Taq Pol (5 U/µl; Fermentas, USA), 2 µl de dNTPs (2mM; Fermentas, USA), 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM; Fermentas, USA), 5 µl Buffer Taq con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10X; Fermentas, USA), 1 µl de iniciador en sentido (10 µM; 5' TGAATGTGTGCAAGCCTCACAAG 3'), 1 µl de iniciador en antisentido (10 µM; 5' ATGTCCATGGACTA-TGATCCAAG 3'), finalmente, se ajustó a un volumen total de 50 µl. La reacción se llevó a cabo con el siguiente perfil térmico: una pre-desnaturalización a 94 °C durante 7 minutos; seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos y 74 °C por 30 segundos, y una extensión final a 74 °C durante 5 minutos. Para visualizar el resultado de la amplificación, el producto de PCR fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV.

### Despliegue diferencial (DD-PCR)

El cDNA fue usado como templado para el despliegue diferencial (DD-PCR). La mezcla de reacción fue la siguiente: 1µl de cDNA, 2,5 µL de DMSO, 1,0 µl de Taq Pol (5 U/µl; Fermentas, USA), 1,25 µl de dNTPs (2mM; Fermentas, USA), 6 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM; Fermentas, USA), 5 µl Buffer Taq con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10X; Fermentas, USA), 1 µl del coctel de iniciadores en sentido (6,25 pM/ µl), 1 µl del coctel de iniciadores en antisentido (10 µM) y finalmente, se ajustó a un volumen total de 50 µl. Los cocteles de iniciadores constaron de 9 oligos en sentido (P) y 9 Oligo(dT) en antisentido (T), sintetizados por MWG-Biotech AG (Alemania), cuyas secuencias son:

**P1:** 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA-3'; **P2:** 5'-ATTAACCCTCACTAAATCG GTCATAG-3'; **P3:** 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG-3'; **P4:** 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG-3'; **P5:** 5'-ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG-3'; **P6:** 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG-3'; **P7:** 5'-ATTAACCCTCACTAA ATGCTGTATG-3'; **P8:** 5'-ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG-3'; **P9:** 5'-ATTAACCCTC ACTAAATGTGGCAGG-3';

**T1:** 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAA-3'; **T2:** 5'-CATTATGCTGAGTGATATC TTTTTT TTAC-3'; **T3:** 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAG-3'; **T4:** 5'-CA TTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCA-3'; **T5:** 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTT TTTTTTCC-3'; **T6:** 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCG-3'; **T7:** 5'-CATT ATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTGA-3'; **T8:** 5'- CATTATGCTGAGTGATATCTT TTTTTTGC-3'; **T9:** 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTGG-3'.

El perfil térmico usado fue: un primer ciclo a 94 °C por 5 minutos, 40 °C por 5 minutos y 74 °C por 5 minutos; seguido de dos ciclos a 94 °C por 2 minutos, 40 °C por 5 minutos y 74 °C por 5 minutos; 37 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto y 74 °C por 2 minutos y una extensión final a 74 °C durante 7 minutos.

Los fragmentos amplificados por DD-PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturalizantes, utilizando una relación acrilamida/bis-acrilamida 38:2 y urea 7M. Previo a la electroforesis, 10 µl de cada muestra se mezclaron con 5 µl de buffer carga (urea 8 M, EDTA 20 mM, TrisHCl 5 mM pH 7,5, xilencianol 0,5% y azul de bromofenol 0,5%), se incubaron a 94 °C durante 5 minutos y posteriormente en hielo por 1 minuto. La electroforesis se realizó en un Sequen-Gen® GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell a 1.600 V por 2 horas, usando buffer TBE 1X.

La visualización de las bandas se realizó mediante tinción con plata. Inicialmente, se incubó el gel en etanol al 10% durante 8 minutos con agitación eventual, luego se sumergió en ácido nítrico 1% por 8 minutos y se lavó con agua desionizada; posteriormente se sumergió en la solución de tinción (2,5 g de nitrato de plata, 3,75 ml de formaldehído al 37% en 2l de agua desionizada) durante 20 minutos. Después se sumergió en solución reveladora (60 g de carbonato de sodio, 3 ml de formaldehído al 37%, 400 µl de tiosulfato de sodio y 2l de agua desionizada) pre-enfriada a 10 °C con agitación constante hasta visualizar las bandas. Finalmente, se incubó en ácido acético al 10% por 3 minutos y un lavado final con agua desionizada. Se secó el gel a temperatura ambiente y la imagen se digitalizó con un scanner PowerLook 2100XL®.

El establecimiento de patrones y selección de bandas diferencialmente expresadas, se llevó a cabo por comparación visual de las imágenes digitalizadas directamente y mediante el Software Doc-ItLS Image Analysis®. Se contrastaron las condiciones infectadas (susceptibles y resistentes) y no infectadas, a las dife-

rentes horas de muestreo. Adicionalmente, se comparó con el patrón de bandedo del patógeno.

### **Elusión de bandas a partir del gel de poliacrilamida y clonación**

Los fragmentos seleccionados por su expresión diferencial fueron separados físicamente del gel y depositados en sendos tubos, se adicionó 20 µl de buffer TE y se incubó a 100°C por 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 8000 rpm por 2 minutos y se recuperó el sobrenadante. La integridad de los eluidos se verificó mediante re-amplificación por PCR, utilizando 1µl como templado y las condiciones descritas anteriormente. Los productos de la re-amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV. La integridad de los extremos fue re-establecida como se describe: 3µl de cDNA, 0,2 µl de Taq Pol (5 U/µl; Fermentas, USA), 1 µl de dATP (2mM; Fermentas, USA), 0,6 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM; Fermentas, USA), 1 µl Buffer Taq con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10X; Fermentas, USA), en un volumen total de 10 µl e incubación a 70 °C durante 30 minutos.

Para la clonación se utilizó el kit QIAGEN PCR Cloning, siguiendo las instrucciones del fabricante, con condiciones de ligación de 4 °C por 12 horas. 10 µl del producto de ligación se incubaron con 100 µl de células *E. coli* cepa DH5αF' calcio competentes en hielo por 20 minutos. Se procedió con el choque térmico a 42°C por 2 minutos y 10 minutos en hielo; luego se adicionó 1 ml de medio LB líquido y se incubó a 37 °C por 2 horas con agitación constante. Finalmente, se seleccionó mediante incubación en medio LB sólido adicionado de X-Gal, IPTG, ampicilina y kanamicina a 37 °C por 12 horas.

### **Secuenciación y análisis de secuencias**

Los plásmidos recombinantes fueron recuperados mediante el sistema de lisis alcalina (Sambrook *et al.*, 1989), verificados por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV. La secuenciación se realizó en MacroGen USA Corp., mediante el sistema de "single extension".

Las secuencias se editaron utilizando el software VectorNTI® y se analizaron empleando el software Blast-2GO® (<http://www.blast2go.com>), el cual permite encontrar secuencias homologas en la base de datos pública del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) mediante algoritmos blast y asignar las anotaciones génicas a dichas secuencias homologas empleando diferentes algoritmos y bases de datos,

como Gen Ontology (GO), Enzyme code, InterProScan y KEGG. Para realizar el blast, se utilizaron los parámetros de configuración del software: umbral de e-value 1 e-3 y una recuperación de 20 hits por secuencia.

## **Resultados y discusión**

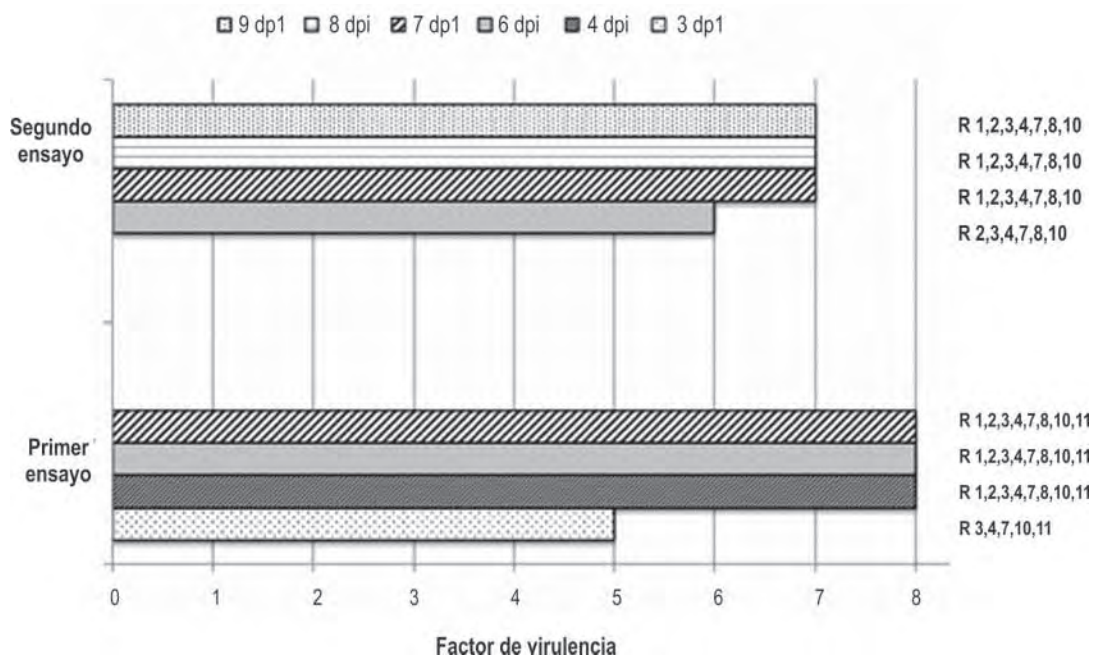
### **Caracterización del Oomiceto y establecimiento de la infección**

El aislado de *P. infestans* empleado fue colectado a partir de un cultivo de Diacol Capiro infectado. Después de ser purificado y caracterizado el patotipo fue catalogado como CORPOICA - "La Unión-2". En el primer ensayo de caracterización la virulencia se evidenció por la reacción de compatibilidad con los diferenciales R 1,2,3,4,7,8,10 y 11. Los resultados fueron reproducidos en el segundo ensayo, excepto por la incompatibilidad con el diferencial R11 (figura 1).

*P. infestans* continuamente gana o pierde su virulencia con respecto a los genes R durante la reproducción asexual (posiblemente debido a mutaciones, entrecruzamientos mitóticos y/o influencia de elementos extracromosomales). Esta podría ser una de las causas por las cuales, a partir de algunos aislamientos de zoosporas se obtienen progenies que difieren en virulencia con respecto a sus parentales (Samen *et al.*, 2003). Sin embargo, se debe recordar que en Colombia no ha sido reportada la reproducción sexual del oomiceto, aun así se presenta un grado de variación importante, no sólo cuando el patógeno es mantenido en rodajas de papa (Correa y Monsalve, 2005) sino también cuando es incubado en medios de cultivo o almacenado en nitrógeno líquido. Es por ello que este aspecto debe ser considerado con mayor detalle en el diseño de estrategias de control basadas en el uso de los genes R.

A pesar de la variación, la infección de los trifolios fue exitosa en todos los puntos de inoculación. Una vez identificadas las lesiones, éstas fueron examinadas en más detalle a fin de confirmar la esporulación del oomiceto en las hojas (figura 2D).

A las 24 hpi no se observaron síntomas en ninguna de las variedades evaluadas (figura 2A). Sin embargo, a las 48 hpi fueron evidentes los primeros síntomas en algunos trifolios de las variedades Diacol Capiro y Parda Pastusa, estas lesiones se restringieron al lugar de inoculación, a pesar de ello, no se observó esporulación. Al cabo de 72 hpi se observaron lesiones esporulantes en todos los trifolios de las mismas variedades. En este momento también fueron evidentes los primeros síntomas en algunos sitios de inoculación de la variedad



**Figura 1.** Caracterización del aislamiento de *P. infestans*. El factor de virulencia hace referencia al número de diferenciales sintomáticas. Contiguo a las barras se especifican las diferenciales afectadas. dpi: días posteriores a la infección.

Pastusa Suprema pero sin esporulación (figura 2B). Después de 96 hpi, en Diacol Capiro y Parda Pastusa las lesiones esporulantes se expandieron abarcando casi toda la hoja; mientras que en Pastusa Suprema sólo en los pocos trifolios que exhibían los síntomas se hicieron evidentes algunas lesiones esporulantes (figura 2C). Finalmente, pasadas 120 hpi todos los sitios de inoculación de las tres variedades presentaron lesiones esporulantes, siendo más severas y expandidas en las variedades Diacol Capiro y Parda Pastusa.

Estos resultados muestran, de acuerdo a reportes previos, que la variedad Pastusa Suprema no es inmune a *P. infestans*, pero sí presenta un retraso en la aparición de los síntomas y la formación de las estructuras reproductoras del oomiceto con respecto a otras variedades, comportamiento que se ajusta a la definición de tolerancia (Elliott, 1996) y razón por la cual este genotipo ha sido catalogado como resistente a la enfermedad.

Esta tolerancia fue demostrada por Betancourth *et al.* (2008) al evaluar la respuesta de nueve genotipos de papa frente a la infección con *P. infestans*. Estos investigadores encontraron que Pastusa Suprema, además de no ser afectada sensiblemente en su índice de área foliar, mantiene su rendimiento y el número de tubérculos por planta superiores a los obtenidos en las demás variedades. No obstante, se ha observado que

la resistencia se ha venido perdiendo, probablemente por la ganancia de nuevos genes de virulencia.

### Perfiles de expresión

El cDNA obtenido fue de buena calidad y cantidad, óptimo para la generación de perfiles de expresión. Se evaluaron diferentes combinaciones de oligos (dato no mostrado); sin embargo, el mayor número de bandas diferenciales fue obtenido cuando se empleó un coctel de iniciadores que incluyó todos los oligos en sentido (P) y todos los Oligo-dT en antisentido (T), obteniendo alrededor de 30 bandas de interés. Estas bandas revelaron diferencias en la expresión génica a distintos tiempos post-inoculación, incluyendo la presencia y ausencia de bandas y el aumento o disminución de su intensidad; adicionalmente, fueron reproducidas en las dos repeticiones llevadas a cabo, por lo cual fueron catalogadas como posibles determinantes en la interacción *P. infestans* - *S. tuberosum*.

A través del tiempo se pudieron observar cambios en el nivel de expresión. Por ejemplo, en el segmento a de la figura 3, se resalta la disminución de la intensidad de una de las bandas de expresión basal, a las 24 hpi la señal es muy intensa y se va reduciendo en forma paulatina hasta las 96 hpi; la posibilidad que este efecto en la expresión sea debida al corte de los trifolios (u otra razón externa distinta a la infección) queda fuera



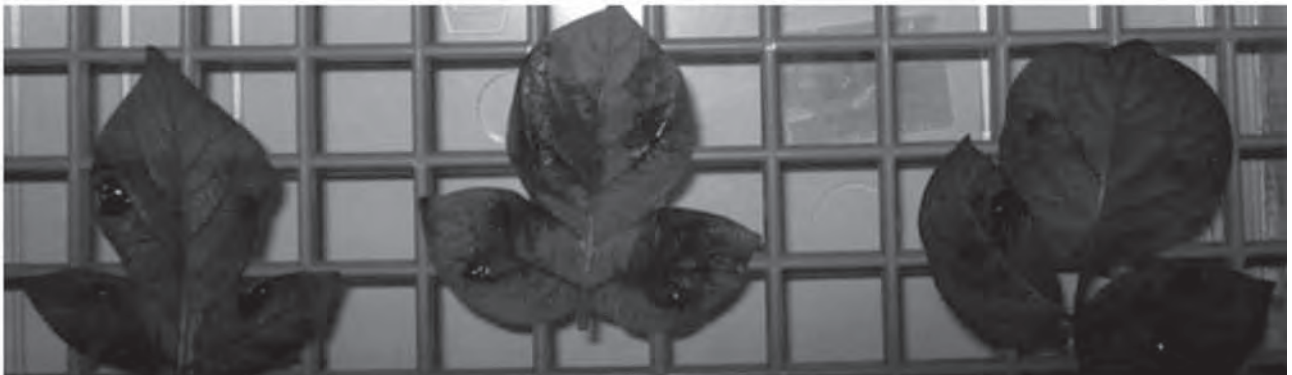
A



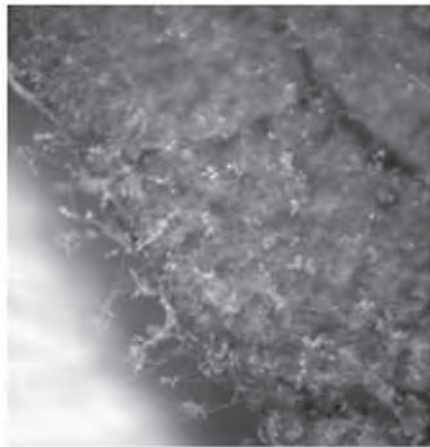
B



C



D



**Figura 2.** Infección de trifolios con *P. infestans*. De izquierda a derecha, trifolios de Diacol Capiro, Parda Pastusa y Pastusa Suprema.

**A:** 24 hpi.

**B:** 48 hpi.

**C:** 96 hpi.

**D:** Acercamiento estereoscópico en los puntos de infección en Diacol Capiro a 96 hpi.



al observar que el patrón se conserva entre los perfiles a las 96 horas con y sin infección.

También se observó la aparición de bandas como respuesta a la infección. En los segmentos *b* y *b'* de la figura 3, se observa una banda diferencial presente únicamente en las variedades Parda Pastusa y Diacol capiro y ausente en Pastusa Suprema. Esta banda es perceptible a las 96 hpi y nunca se detectó en la condición sin infectar; esto hace suponer que la expresión de este gen en particular, pueda de alguna forma favorecer la susceptibilidad de la planta ante el ataque de *P. infestans*.

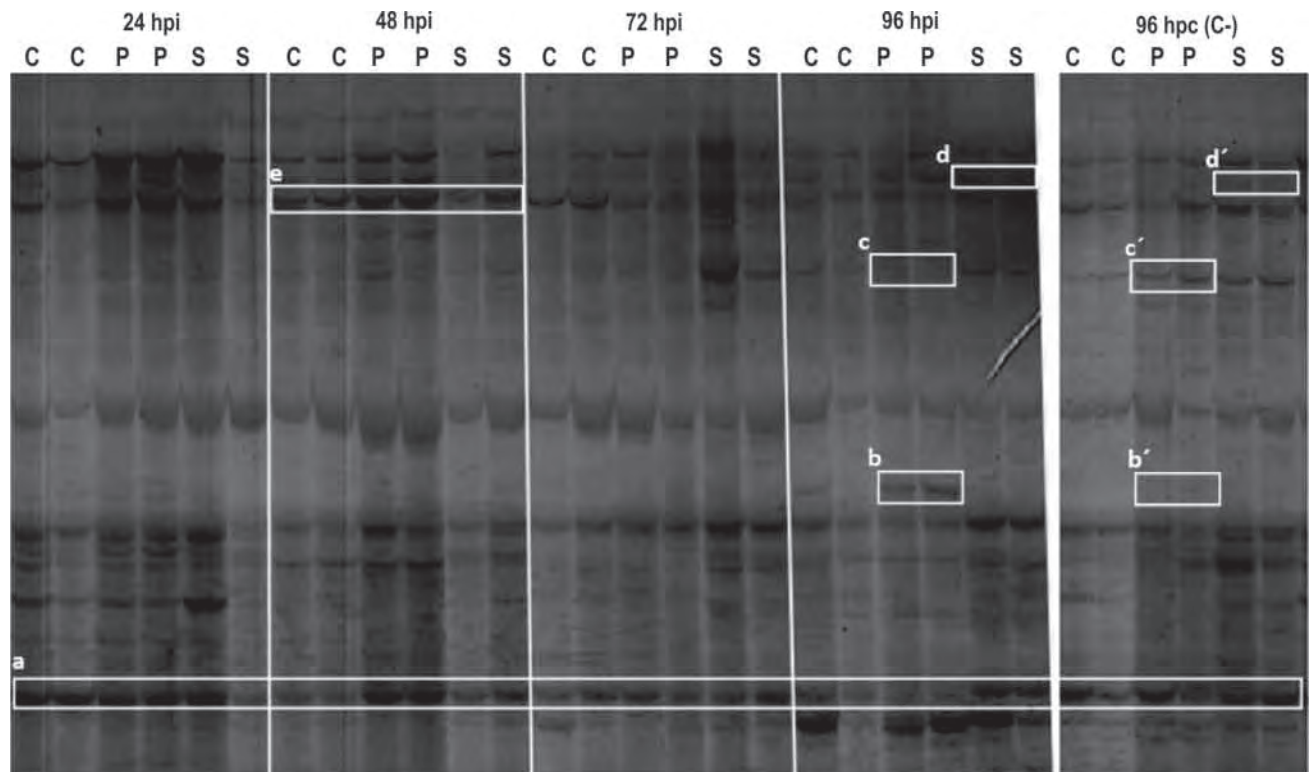
De otro lado, en los segmentos *c* y *c'* se observa lo contrario. La banda se encuentra presente en todas las variedades a las 96 hpc, 24, 48, 72 y 96 hpi, pero sólo en la variedad Parda Pastusa a las 96 hpi deja de ser detectada. Como en el caso anterior, se podría especular que corresponde a un posible gen que favorezca la susceptibilidad, pero con un efecto de silenciamiento génico, mas no de activación.

Los cambios en la expresión génica también se aprecian en la variedad Pastusa Suprema. En los segmentos *d* y *d'* se señala una banda que está presente en todos los tiempos pos-infección pero es particularmente

fuerte en la variedad Pastusa Suprema a las 96 hpi. Esta misma banda es casi imperceptible en la condición sin infectar. Lo anterior hace pensar que la sobre-expresión de este gen pueda estar involucrada en algún mecanismo de defensa.

A las 48 hpi, en el fragmento *e* se resalta una banda de elevada expresión en las variedades reportadas como susceptibles, mientras que en la variedad Pastusa Suprema su expresión es relativamente más baja; siendo mucho más intensa en Parda Pastusa que en Diacol Capiro y en esta última es más intensa que en Pastusa Suprema. Es posible que en el caso de la variedad Pastusa Suprema este comportamiento esté relacionado con el retraso de la aparición de síntomas.

Para las tres variedades, las mayores diferencias se observaron a las 72 y 96 horas post-inoculación. Esto demuestra una vez más, que el reconocimiento y la defensa de *S. tuberosum* ante *P. infestans* implica una regulación y expresión génica, compleja y dinámica, que incluye tanto la supresión como la sobre-expresión de genes. Estos resultados son similares a los obtenidos por Restrepo et al. (2005) cuando evaluaron los perfiles de expresión génica durante interacciones compatibles e incompatibles entre *S. tuberosum* y *P. infestans* empleando microarreglos. Estos investigadores también encontraron que a medida



**Figura 3.** Expresión diferencial en las variedades Diacol Capiro (C), Parda Pastusa (P) y Pastusa Suprema (S) ante la infección con *P. infestans*. hpi: horas posteriores a la infección. C-: control negativo.

que aumenta el tiempo post-inoculación se incrementa el número de genes expresados diferencialmente y que además, los genes expresados diferencialmente durante las primeras horas de la infección (6 y 12 hpi) correspondieron a genes que fueron inducidos, mientras que durante las 48 y 72 hpi fue mayor la cantidad de genes reprimidos que inducidos.

Por su parte, Abu-Nada *et al.* (2007), al evaluar la dinámica temporal de metabolitos relacionados con la patogénesis, encontraron que estos fueron detectados a niveles altos a las 24 y 48 horas post-inoculación, mientras que la abundancia de estos metabolitos decreció 96 horas post-inoculación, indicando el colapso de las respuestas de defensa primaria y secundaria. Aunque esta es una dinámica del metabolismo, y no directamente de la expresión diferencial de genes particulares, se podría pensar en la expresión diferencial de genes clave reguladores de las rutas metabólicas; sin embargo, no se debe dejar de lado que la temporalidad de acumulación de los metabolitos no es coincidente con la de los RNAm.

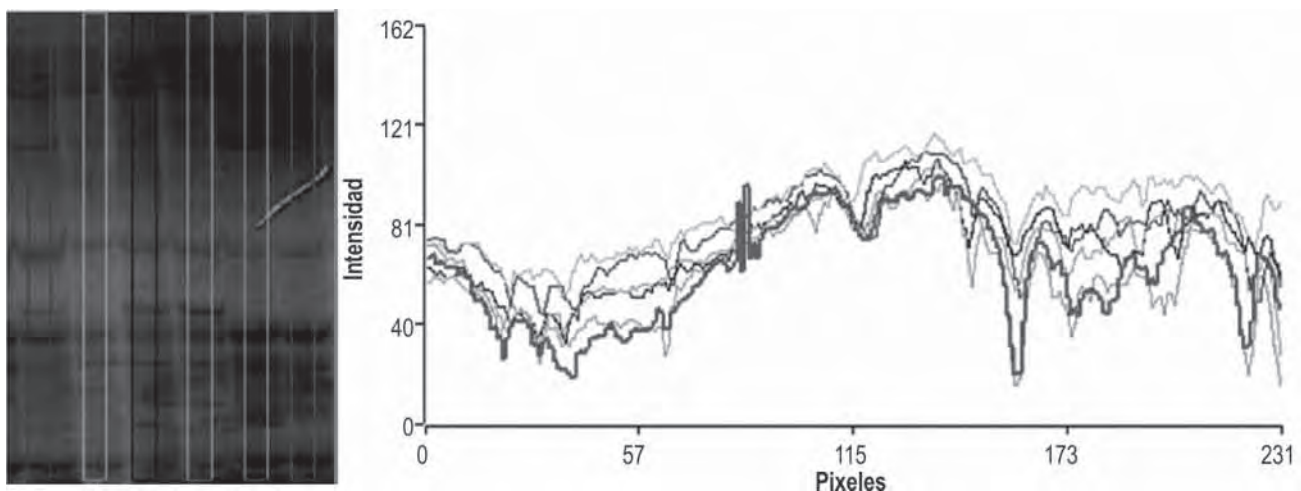
La diferencia entre los perfiles de expresión fue corroborada mediante el análisis de las imágenes digitalizadas usando el software Doc-ItLS Image Analysis® (figura 4). Adicionalmente, este análisis permitió demostrar la reproducibilidad de los ensayos, ya que las muestras individuales de cada variedad tuvieron un comportamiento similar y difirieron entre cada una de las variedades.

En todas las evaluaciones realizadas, se pudo constatar que la variedad Pastusa Suprema presenta un nivel de

expresión comparativamente más alto que las demás; en tanto que el menor nivel se presenta en la variedad Diacol Capiro. Esta expresión en Pastusa Suprema resulta interesante ya que la variedad corresponde a un híbrido, relativamente nuevo, que posee una gran complejidad genética dado que tiene por parentales tres especies diferentes; el parental materno fue un híbrido inter-específico resultante de *Solanum stoloniferum* 230490 (variedad silvestre) × *Solanum phureja* var. Yema de huevo, y el parental paterno fue *Solanum tuberosum* sp. *andigena* var. Parda pastusa (López y Chaparro 2007). Adicionalmente, es de esperar que esta variedad posea importante información en referencia a la respuesta de resistencia ante la infección con *P. infestans*, dado que en los genomas de ambas especies del parental materno se han identificado genes R y QTLs, de gran relevancia para la resistencia a *P. infestans* (Lindqvist-kreuze *et al.*, 2010). Los resultados presentados demuestran que en la variedad Pastusa Suprema existen genes que se sobre-expresan y se silencian durante la infección con *P. infestans*. Como resultado de estas variaciones génicas, la planta lograría su característica de tolerar el patógeno; y por ende, el estudio detallado de esta variedad, podría brindar nueva información de gran utilidad en la comprensión molecular del mecanismo de defensa de la planta.

#### **Secuenciación y análisis de los fragmentos diferencialmente expresados**

De las bandas identificadas como diferencialmente expresadas, 20 fueron clonadas y secuenciadas. Una vez editadas las secuencias, solo se obtuvieron 10 con-



**Figura 4.** Análisis de la expresión diferencial mediante Doc-ItLS Image Analysis. Se compara la expresión a las 96 hpi, cada color corresponde a un evento de infección independiente. Rojo y amarillo: Diacol Capiro. Azul oscuro: Parda Pastusa. Verde y morado: Pastusa Suprema.

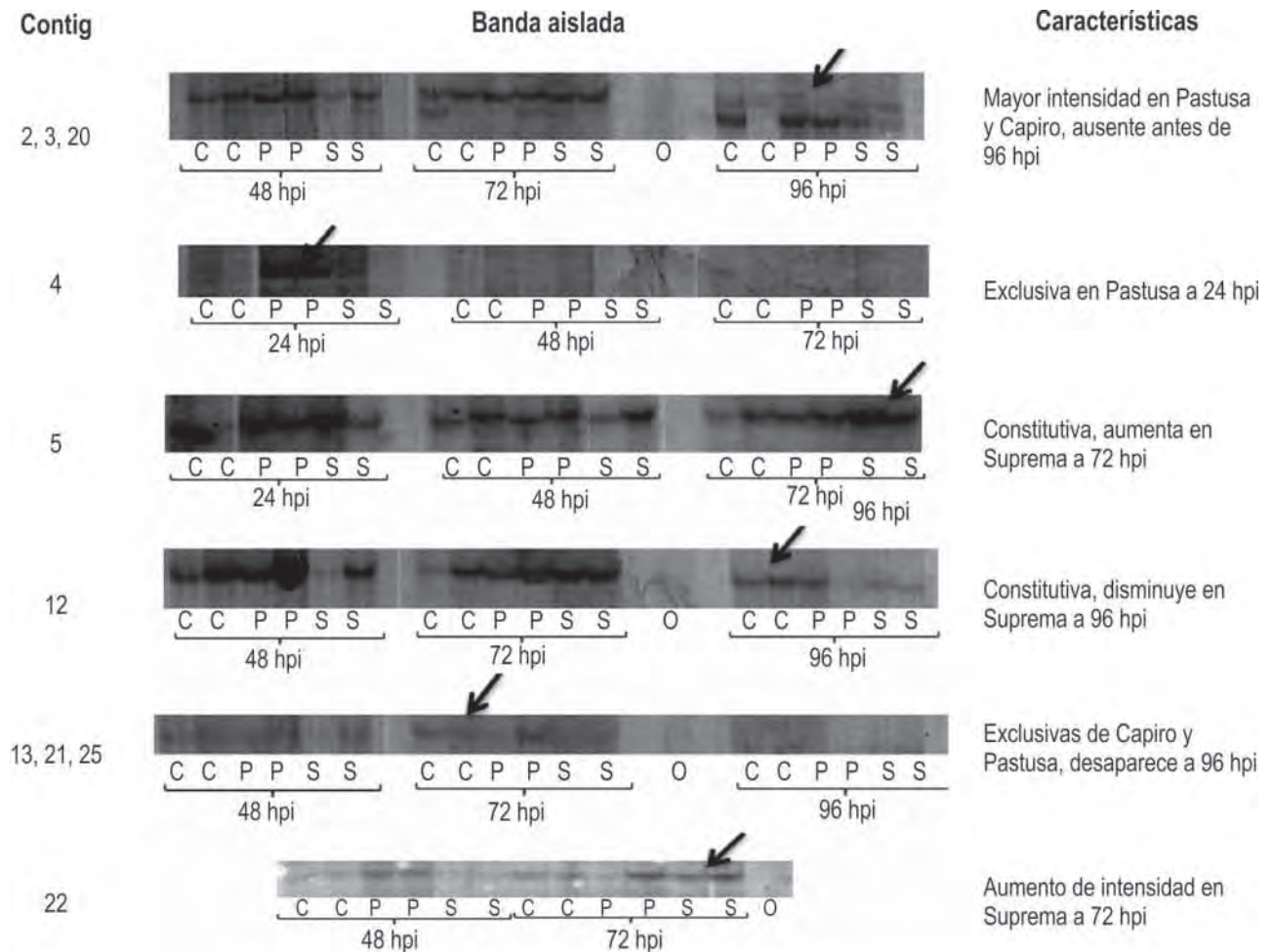
tig, los cuales fueron analizados a través del software Blast2go. Para hacer la búsqueda de las secuencias homologas, se realizaron comparaciones contra la base de datos no redundante del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), empleando los algoritmos blastn y blastx. En la figura 5 se muestran los contig que fueron analizados, así como la descripción de la banda a partir de la cual se realizó la clonación y secuenciación.

Al realizar el blastx, fue posible hacer las anotaciones génicas de 8 contig. Las secuencias 12 y 13 no pudieron ser anotadas. Para las secuencias 2, 3, 4 y 20 se encontraron homologías con la información contenida en la base de datos del NCBI y pudo realizarse la respectiva anotación de estas secuencias, identificando su función molecular, su función en los procesos biológicos y su localización subcelular (ontología génica -GO-); inclusive, la secuencia 4 pudo ser relacionada

con el código enzimático y determinarse su participación en rutas metabólicas según la base de datos KEGG. Por su parte, para las secuencias 5, 21, 22 y 25 no pudo encontrarse su ontología génica pero tuvieron homología con la información contenida en la base de datos InterProScan y fueron relacionadas con características identificables de familias, dominios o sitios funcionales de proteínas conocidas (tabla 1).

Se encontró gran variación en las especies a las que pertenecen las secuencias con las que se presentaron los aciertos de los contig, al hacer el blastx; sin embargo, las de mayor relevancia para llevar a cabo las anotaciones genicas, fueron *Curvibacter putative* y *Solanum panduriforme* (tabla 1).

Los contig 2, 3 y 20 tuvieron homología con una secuencia que codifica para una serina acetiltransferasa (SAT). SAT es una enzima involucrada en el metabolismo del azufre (López-Martín et al., 2008; Kopriva et al.,



**Figura 5.** Diacol Capiro (C), Parda Pastusa (P), Pasta Suprema (S) y Oomiceto (O). hpi: horas posteriores a la infección. La flecha señala el segmento recuperado.

2009), que se encuentra presente en plantas, hongos y microorganismos capaces de asimilar el azufre inorgánico presente en la naturaleza, e incorporarlo a sus compuestos orgánicos (Kopriva *et al.*, 2009; Haas *et al.*, 2008). En plantas, esta enzima ha sido encontrada en el citosol, mitocondria y plástidos (Harms *et al.*, 2000; Haas *et al.*, 2008; López-Martín *et al.*, 2008). El producto final de la asimilación del azufre es la cisteína y a partir de este aminoácido se sintetizan, directa o indirectamente, otras bio-moléculas que tienen azufre en su estructura como glutatión, metionina y fitoalexinas (Harms *et al.*, 2000; Riemenschneider *et al.*, 2005). La cisteína y la metionina son aminoácidos fundamentales para la estructura y función de las proteínas, coenzimas y grupos prostéticos; además, los compuestos sulfurados están involucrados en las respuestas a estrés biótico y abiótico, por ejemplo el glutatión, que hace parte de la detoxificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Davidian y Kopriva, 2010). Wirtz y Hell (2006) evaluaron la expresión de una SAT

bacteriana en plantas transgénicas de papa y encontraron que la sobreexpresión de la enzima indujo el incremento de los niveles de cisteína y glutatión en dichas plantas.

La secuencia del contig 4 tuvo homología con una secuencia que codifica para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa. La transcripción de los genes que se encuentran en el genoma de los plástidos es realizado por múltiples subunidades de RNA polimerasas dependientes de DNA, cuyas propiedades y funciones no se conocen bien (Troxler *et al.*, 1994). En el genoma de los cloroplastos de las plantas, existen diferentes genes (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* y *rpoC2*) que codifican para proteínas homologas a las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  y  $\beta''$  de las RNA polimerasa de las bacterias (Dubey *et al.*, 2009). En los tilacoides de la membrana de los cloroplastos, se encuentra el sistema transportador de electrones fotosintético y allí es donde se producen la mayor cantidad de ROS (Kariola *et al.*, 2005); por lo tanto,

**Tabla 1.** Resultado del blastx: secuencias homólogas con meor e-value y porcentaje de similitud. <sup>a</sup> Tamaño del contig (pb). <sup>b</sup> Descripción de la secuencia homóloga. <sup>c</sup> Porcentaje de similitud. <sup>d</sup> Descripción del GO. F: función molecular. P: función en procesos biológicos. C: localización celular. <sup>e</sup> Código enzimático. <sup>f</sup> InterProScan.

Contig	Tamaño <sup>a</sup>	Descripción <sup>b</sup>	e-Value	Sim. %	Anotaciones génicas		
					GO <sup>d</sup>	E.C. <sup>c</sup>	InterProf <sup>f</sup>
2	331	Serina acetil transferasa	1,1 e-18	62,0	F: actividad transferasa, acetiltransferasa, serina O-acetil transferasa	-	-
3	331	Serina acetil transferasa	2,5 e-18	62,9	F: actividad transferasa, acetiltransferasa, serina O-acetil transferasa	-	-
4	263	Subunidad $\beta$ de la RNA polimerasa	2,9 e-44	97,3	F: actividad RNA polimerasa dependiente de DNA, unión a DNA, unión a ribonucleósido. P: transcripción dependiente de DNA, metabolismo de purinas/pirimidina. C: cloroplasto, nucléolo.	2.7.7.6	-
5	139	-	-	-	-	-	SIGNALP, TMHMM
12	132	-	-	-	-	-	-
13	169	-	-	-	-	-	-
20	331	Serina acetil transferasa	2,1 e-17	60,6	F: actividad transferasa, acetiltransferasa, serina O-acetil transferasa	-	-
21	110	-	-	-	-	-	SEG
22	125	-	-	-	-	-	SIGNALP
25	154	-	-	-	-	-	SEG, TMHMM



el cloroplasto tiene un papel muy importante durante la resistencia a enfermedades y la respuesta de hipersensibilidad celular que se desencadena cuando se presenta una interacción planta-patógeno incompatible (Kariola *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2009). Dubey *et al.* (2009) al evaluar el genoma del cloroplasto de dos variedades de plantas, con diferente respuesta ante la acción de un patógeno, encontraron que la única diferencia eran cuatro sustituciones nucleótídicas (SNP) en el gen *rpoC1*, que codifica para la subunidad  $\beta'$  de la RNA; los investigadores concluyeron que es posible que esta diferencia sea la responsable de la respuesta susceptible o resistente ante el fitopatógeno.

En cuanto a los resultados del InterProScan, se encontró que algunas secuencias, después de ser traducidas, tendrían homología con regiones de baja complejidad (SEG), dominios transmembranales (TMHMM) o péptidos señal (SIGNALP). Este dominio transmembranal conlleva un gran interés dado que durante la inmunidad innata de las plantas existen proteínas encargadas de reconocer los patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) y desencadenar así la respectiva respuesta de defensa; en algunos casos, estos receptores de PMAPs están formados por dominios transmembranales, como es el caso de los receptores semejantes a *Toll*, *FLS2*, *RLP* y *CEBiP* (Castro-Mercado y García-Pineda, 2009; Ojito-Ramos y Portal, 2010).

## Conclusión

Evaluando los perfiles de expresión generados a partir de interacciones planta-patógeno, bajo diferentes condiciones, es posible identificar genes que se expresan en las interacciones compatibles y no lo hacen en las incompatibles, o viceversa. Así, esta herramienta permite clarificar que genes están involucrados en la resistencia; pero además, pueden conocerse genes involucrados en la susceptibilidad, los cuales son mucho menos conocidos y que igualmente podrían ser usados en la búsqueda de estrategias de resistencia. Los estudios de expresión génica durante la interacción planta-patógeno que se realizaron, demuestran que las diferencias en la expresión durante las interacciones compatibles e incompatibles incluyen una variedad de respuestas como la sobre-expresión, el silenciamiento y los cambios en el nivel de expresión. Puede suponerse que estas variaciones son responsables de la resistencia a la enfermedad, pero del mismo modo también podrían serlo de la susceptibilidad, por lo cual es necesario continuar con estudios más detallados. El análisis las secuencias reveló que los fragmentos sobre-expresados en las variedades susceptibles, tienen homología con una serina-acetiltransferasa y la

subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa, mientras que los fragmentos sobre-expresados en la variedad resistente, tienen homología con un dominio transmembranal, sugiriendo que estas secuencias corresponden a genes involucrados en la respuesta de *S. tuberosum* ante el ataque de *P. infestans*.

## Agradecimientos

Agradecemos al soporte financiero del proyecto "Generación de marcas de secuencias expresadas (ESTS) a través de la técnica de despliegue diferencial en las interacciones papa - *P. infestans* y banano - *M. Fijjensis*", financiado por el CODI, Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Antioquia; Cesar Julián López, Albeiro Macias y Javier Correa por su apoyo en la presente investigación. A CORPOICA por su contribución en las infecciones.

## Referencias bibliográficas

- Abad, G., Abad, J., Ochoa, C. 1995. Historical and scientific evidence that supports the modern theory of the Peruvian Andes as the centre of origin of *Phytophthora infestans*. En: LJ Dowley, E Bannan, LR Cooke, T Keane, and E O´Sullivan (eds.). *Phytophthora infestans* 150. Ireland: Boole Press Ltd. pp. 239-245.
- Abu-Nada, Y., Kushalappa, A.C., Marshall, W.D., Al-Mughrabi, K., Murphy, A. 2007. Temporal dynamics of pathogenesis-related metabolites and their plausible pathways of induction in potato leaves following inoculation with *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology* 118: 375-391.
- Agrios, G. 2005. *Plant pathology*. 5th ed. Nueva York: Editorial Elsevier Academic Press. pp. 922.
- Agrocadenas. 2006. La cadena de la papa en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica (1991-2005) [sitio web]. Bogotá DC (Colombia): Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Documento de trabajo N° 100; Enero de 2006 [fecha de acceso: Febrero de 2010]. Disponible en: <http://www.agrocadenas.gov.co>.
- Bailey, A. M., Muñoz-Sánchez, C. I., Martínez-Hernández, P., Manríquez-Escamilla, M. 2001. Detection of Additional Gene Products Induced by the Interaction between *Phytophthora capsici* and its host *Capsicum annum* and the identification of an Elicitin-Encoding Gene. *Revista Mexicana de Fitopatología* 19: 22- 31.
- Ballesteros, D.C., Gómez, G., Delgado, M.C., Álvarez, M.F., Juyó, D., Cuéllar, D., y Mosquera, T. 2010. Posible presencia de un gen R1 en germoplasma de *Solanum tuberosum* Grupo Phureja. *Agronomía Colombiana* 28:137-146.
- Bauer, D., Warthoe, P., Rohde, M., Strauss, M. 1994. Detection and differential display of expressed genes by DDRT-PCR. *PCR methods and applications* 4: S97-108.
- Beligni, M.V., Laxalt, A.M., Lamattina, L. 1999. Temporal and spatial patterns of GAPDHc mRNA accumulation during an incompatible potato- *Phytophthora infestans* interaction. Comparison

- with a compatible interaction. *Physiologia Plantarum* 105: 280-287.
- Betancourth, C., Portilla, E., Salas, H. 2008. Evaluación de la reacción de nueve genotipos de papa (*Solanum tuberosum* subsp. andigena) al ataque de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. *Agronomía Colombiana* 26: 411-416.
- Bormann, C., Rickert, A.M., Castillo, R.A., Paal, J., Lübeck, J., Strahwald, J., Buhr, K., Gebhardt, C. 2004. Tagging quantitative trait loci for maturity-corrected late blight resistance in tetraploid potato with PCR-based candidate gene markers. *Molecular plant-microbe interactions* 17: 1126-1138.
- Cevipapa. 2010. [sitio web]. Colombia. [Fecha de acceso: Febrero 6 de 2010]. Disponible en: <http://www.cevipapa.org.co/>
- Castro-Mercado, E. y García-Pineda, E. La inmunidad innata en las : una batalla molecular entre receptores y estimuladores. *Revista Biológicas* 11: 43- 47.
- Collard, B., Jahufer, M., Brouwer, J., Pang, E. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Colon, L.T., Jansen, R.C., Budding, D.J. 1995a. Partial resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in hybrid progenies of four South American *Solanum* species crossed with diploid *S. tuberosum*. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 691-698.
- Colon, L.T., Turkensteen, L.J., Prummel, W., Budding, D.J., Hoogendoorn, J. 1995. Durable resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in old potato cultivars. *European Journal of Plant Pathology* 101: 387-397.
- Cornelissen, B.J.C., Melchers, L.S. 1993. Strategies for Control of Fungal Diseases with Transgenic Plants. *Plant physiology* 101: 709-712.
- Correa, J., Monsalve, Z. 2005. Patrón de expresión genética durante la interacción de *Solanum tuberosum* var. Parda pastusa y var. Tuquerreña con *Phytophthora infestans*. Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias Exactas, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Davidian, J.C., Kopriva, S. 2010. Regulation of Sulfate Uptake and Assimilation — the Same or Not the Same? *Molecular Plant* 3 (2): 314-325.
- Donaire, E. R., García, W. 2006. Alternativa agroecológica para el control del tizón tardío, *Phytophthora infestans*, de la papa en Colomi - Bolivia. *Acta Nova* 3: 564-577.
- Díaz, M., Fajardo, D.A., Moreno, J.D., García, C., Nuñez, V.M. 2003. Identificación de Genes R1 y R2 que confieren resistencia a *Phytophthora infestans* en genotipos colombianos de papa. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5: 40-50.
- Dubey, M.K., Shasany, A.K., Dhawan, O.P., Shukla, A.K., Khanuja, S.P.S. 2009. Genetic Variation revealed in the chloroplast-encoded RNA polymerase  $\beta'$  Subunit of downy mildew – resistant genotype of opium poppy. *Journal of Heredity* 100 (1): 76-85.
- Elliott, F. 1996. *Mejoramiento de plantas citogenéticas*. México: Continental.
- Estrada, N. 2000. Mejoramiento genético de la papa para resistencia al tizón. *Papas Colombianas 2000 con el mejor entorno ambiental* 3: 38-39.
- FAO. 2010. Crops statistics database. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>
- Freytag, S., Arabatzis, N., Hahlbrock, K., Schmelzer, E. 1994. Reversible cytoplasmic rearrangements precede wall apposition, hypersensitive cell death and defense-related gene activation in potato/*Phytophthora infestans* interactions. *Planta* 194: 123-135.
- Fry, W. 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* 9: 385-402.
- Giraldo, D., Juárez, H., Pérez, W., Trebejo, I., Yzarra, W., Forbes, G. 2010. Severity of the potato late blight (*Phytophthora infestans*) in agricultural areas of Peru associated with climate change. *Revista Peruana Geo-Atmosférica* 67: 56-67.
- Grupo de Investigación de la Papa, Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia. Catálogo de variedades colombianas. [sitio web]. [fecha de acceso: Febrero de 2010]. Disponible en: <http://papaunc.com/catalogoExtendido.shtml?x=44>
- Guzmán, J., Thurston, H.D., Heidrick, L.E. 1960. Resultados sobre la naturaleza de la resistencia parcial de tres clones de papa a *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary. *Agricultura Tropical* 16: 89-99.
- Haas, F.H., Heeg, C., Queiroz, R., Bauer, A., Wirtz, M., Hell, R. 2008. Mitochondrial serine acetyltransferase functions as a pacemaker of cysteine synthesis in plant cells. *Plant physiology* 148 (2): 1055-1067.
- Haas, B., Kamoun, S., Zody, M.C., Jiang, R.H., Handsaker, R.E., Cano, L.M., Grabherr, M. et al., 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 461: 393-398.
- Harms, K., Ballmoos, P.V., Brunold, C., Höfgen, R., Hesse, H. 2000. Expression of a bacterial serine acetyltransferase in transgenic potato plants leads to increased levels of cysteine and glutathione. *The Plant Journal* 22 (4): 335-343.
- Henriquez, M.A., Daayf, F. 2010. Identification and cloning of differentially expressed genes involved in the interaction between potato and *Phytophthora infestans* using a subtractive hybridization and cDNA-AFLP combinational approach. *Journal of integrative plant biology* 52: 453-467.
- Ibrahim, A., Hedley, P.E., Cardle, L., Kruger, W., Marshall, D.F., Muehlbauer, G.J., Waugh, R. 2005. A comparative analysis of transcript abundance using SAGE and Affymetrix arrays. *Functional & integrative genomics* 5: 163-174.
- Jacobs, M., Vosman, B., Vleeshouwers, V., Visser, R.G.F., Henken, B., Van den Berg, R. 2010. A novel approach to locate *Phytophthora infestans* resistance genes on the potato genetic map. *Theoretical and applied genetics*. 120: 785-796.
- Jagoueix-Eveillard, S., Tarendeau, F., Guolter, K., Danet, J.L., Bové, J.M., Garnier, M. 2001. *Catharanthus roseus* genes regulated differentially by mollicute infections. *Molecular plant-microbe interactions* 14: 225-233.

- James, R., Fry, W. 1983. Potential for *Phytophthora infestans* populations to adapt to potato cultivars with rate-reducing resistance. *Phytopathology* 73: 984-988.
- Jaramillo, S. 2003. Monografía sobre *Phytophthora infestans* (Mont) De Bary. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Jimenez, J., Chaparro-Giraldo, A., Blanco, J. 2009. Evaluación de diferentes combinaciones fitohormonales en la regeneración de *Solanum tuberosum* (Solanaceae) Var. Pastusa Suprema a partir de explantes internodales. *Revista Colombiana de Biotecnología* 11: 67-74.
- Joos, J.H., Hahlbrock, K. 1992. Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.). *European Journal of Biochemistry* 204:621-629.
- Kim, H.L. 2003. Comparison of oligonucleotide-microarray and serial analysis of gene expression (SAGE) in transcript profiling analysis of megakaryocytes derived from CD34+ cells. *Experimental & molecular medicine* 35: 460-466.
- Kariola, T., Brader, G., Li, J., Tapio-Palva, E. 2005. Chlorophyllase 1, a Damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. *The Plant Cell* 17 (1): 282-294.
- Kopriva, S., Mugford, S.G., Matthewman, C., Koprivova, A. 2009. Plant sulfate assimilation genes: redundancy versus specialization. *Plant Cell Reports* 28 (12): 1769-1780.
- Landeo, J.A., Gastelo, M., Beltran, G., Diaz, L. 2000. Quantifying genetic variance for horizontal resistance to late blight in potato breeding population B3C1. CIP Program report 1999-2000, International Potato Centre, Peru. pp 63-68.
- Lawton, M.A., Lamb, C.J. 1987. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Molecular and Cellular Biology* 7: 335-341.
- Leonards-Schippers, C., Gieffers, W., Schäfer-Pregl, R., Ritter, E., Knapp, S.J., Salamini, F., Gebhardt, C., 1994. Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics* 137: 67-77.
- Li, Y., Tian, Z., Liu, J., Xie, C. 2009. Comparative cDNA-AFLP analysis reveals that dl-amino-butyric acid induces resistance through early activation of the host-defense genes in potato. *Physiologia Plantarum* 136: 19-29.
- Liang, P., Meade, J.D., Pardee, A.B. 2006. Differential display methods and protocols. En *Methods in molecular biology*. 2nd ed. Towota: NJ Humana Press.
- Liang, P. 2002. SAGE Genie: a suite with panoramic view of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 11547-11548.
- Lindqvist-kreuzer, H., Carbajulca, D., Gonzalez-escobedo, G. 2010. Comparison of transcript profiles in late blight-challenged *Solanum cajamarquense* and B3C1 potato clones. *Molecular Plant Pathology* 11: 513-530.
- López, A., Chaparro, A. 2007. Propuesta de un sistema de transformación de plantas de papa (*Solanum tuberosum* sp. andigena var. Pastusa suprema) mediado por *Agrobacterium tumefaciens*. *Agronomía Colombiana* 25: 16-25.
- López-Martín, M. C., Romero, L. C., Gotor, C. 2008. Cytosolic cysteine in redox signaling. *Plant Physiology* 3 (10): 880-881.
- Malcolmson, J.F., Black, W. 1966. New R genes in *Solanum demissum* lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica* 15: 199-203.
- Maldonado, L.Y., Delgado, M. C., García, C. Estudio de la estructura genética de las poblaciones de *Phytophthora infestans* en las regiones productoras de papa en Colombia [sitio web]. [fecha de acceso: Febrero de 2010]. Disponible en: <http://www.rede-papa.org/infestans3.pdf>.
- Martínez, E.P., Osorio, J.A. 2007. Estudios preliminares para la producción de un biosurfactante bacteriano activo contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 8: 5-16.
- Martini, N., Egen, M., Rüntz, I., Strittmatter, G. 1993. Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *Molecular & general genetics* 236: 179-186.
- McDowell, J.M., Woffenden, B.J. 2003. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends in Biotechnology* 21: 178-183.
- Mosquera, T., Fernández, C., Martínez, L., Acuña, A., Cuéllar, D. 2008. Genética de la resistencia de la papa (*Solanum tuberosum*) a patógenos. Estado de arte. *Agronomía Colombiana* 26: 7-15.
- Müller, K.O., Black, B. 1952. Potato breeding for resistance to late blight and virus disease during the last hundred years. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung* 31: 225-236.
- Nürnberg, T., Lipka, V. 2005. Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* 6: 335-345.
- Ojito-Ramos, K. y Portal, O. 2010. Introducción al sistema inmune de las plantas. *Biotecnología Vegetal* 10 (1): 3-19.
- Patino, W.D., Mian, O., Hwang, P.M. 2002. Serial Analysis of Gene Expression: Technical Considerations and Applications to Cardiovascular Biology. *Circulation Research* 9: 565-569.
- Pinzón, A., Barreto, E., Bernal, A., Achenie, L., González-Barrios, A.F., Isea, R., Restrepo, S. 2009. Computational models in plant-pathogen interactions: the case of *Phytophthora infestans*. *Theoretical biology & medical modelling* 6: 24
- Restrepo, S., Myers, K.L., Pozo, O., Martin, G.B., Hart, A.L., Buell, C.R., Fry, W.E., Smart, C.D. 2005. Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Molecular plant-microbe interactions* 18: 913-922.
- Riemenschneider, A., Riedel, K., Hoefgen, R., Papenbrock, J., Hesse, H. 2005. Impact of reduced O-Acetylserine ( thiol ) lyase isoform contents on potato plant metabolism. *Plant Physiology* 137 (3): 892-900.
- Rodríguez, E. 2000. Efecto de la combinación de un fungicida protectante y la resistencia poligénica a *Phytophthora infestans* en el manejo de la gota en papa. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

- Ros, B., Mohler, V., Wenzel, G., Thümmler, F. 2008. *Phytophthora infestans*-triggered response of growth- and defense-related genes in potato cultivars with different levels of resistance under the influence of nitrogen availability. *Physiologia Plantarum* 133: 386-396.
- Ros, B., Thümmler, F., Wenzel, G. 2005. Comparative analysis of *Phytophthora infestans* induced gene expression in potato cultivars with different levels of resistance. *Plant biology* 7: 686-693.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. 2th Edition, United States, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 6.46-6.48.
- Samen, F., Abu-El, M., Secor, G.A., Gudmestad, N.C. 2003. Variability in Virulence Among Asexual Progenies of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 93: 293-304.
- Schick, R.E., Schick, E., Haussdorfer, M. 1958. Ein Beitrag zur physiologischen spezialisierung von *Phytophthora infestans*. *Phytopathologische Zeitschrift* 31: 225-236.
- Stein, J., Liang, P. 2002. Differential display technology: a general guide. *Cellular and Molecular Life sciences* 59: 1235- 1240.
- Stuiver, M.H., Custers, J.H. 2001. Engineering disease resistance in plants. *Nature* 411: 865-868.
- Torres, H. 2002. Manual de las enfermedades más importantes de la papa en el Perú [sitio web]. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú [fecha de acceso: Febrero 2010]. Disponible en: <http://www.cipotato.org/csd/materials/htorres/HTorresTT.pdf>
- Trognitz, F., Manosalva, P., Gysin, R., Niño-Liu, D., Simon, R., Herrera, M.R., Trognitz, B., Ghislain, M., Nelson, R. 2002. Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* x dihaploid *S. tuberosum* hybrids. *Molecular plant-microbe interactions* (6): 587-597.
- Troxler, R.F., Zhang, F., Hu, J., Bogorad, L. 1994. Evidence that sigma factors are components of chloroplast RNA polymerase. *Plant Physiology* 104 (2): 753-759.
- Turkensteen, L.J. 1993. Durable resistance of potatoes against *Phytophthora infestans*. En T Jacobs and JE Parlevliet (eds.). *Durability of Disease Resistance*. Dordrecht: The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 115-124.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, KW. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487.
- Villareal, H.J., Porras, P.D., Santa, A., Lagoeyte, J., Muñoz, D. 2007. Costos de producción de papa en las principales zonas productoras de Colombia. Federación Colombiana de Productores de Papa. Bogotá.
- Vogel, J.O., Raab, T.K., Schiff, C., Somerville, S.C. 2006. PMR6, a Pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis*. *Plant cell* 14: 2095-2106.
- Wang, X., El Hadrami, A., Adam, L.R., Daayf, F. 2008. Differential activation and suppression of potato defence responses by *Phytophthora infestans* isolates representing US-1 and US-8 genotypes. *Plant Pathology* 57: 1026-1037.
- Wastie, R.L. 1991. Breeding for resistance. En: DS Ingram and PH Williams (eds.). *Phytophthora infestans, the cause of late blight of potato*. *Advances in Plant Pathology*. London: Academic Press. pp.193-224.
- Wirtz, M., Hell, R. 2006. Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *Journal of Plant Physiology* 163 (3): 273-286.