

UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DEL TABACO

La expresión del gen *nmimsp* contribuye a la resistencia poligénica de *Nicotiana megalosiphon* Van Heurck & Muell Arg frente a *Oomycetes* fitopatógenos.

Tesis presentada al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas.

Autor: Lic. Yussuan Khalet Silva Larrañaga

Tutores: Dr. C. Orlando Borrás Hidalgo

Dr. C. Luis A. Barranco Olivera

Santa Clara

2015

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento es un sentimiento que aflora en los seres humanos cuando se estima algún favor o beneficio recibido por parte de alguien y son muchas las personas que de una forma u otra tuvieron que ver con el término, de este feliz viaje. Quiero agradecer al Instituto de Investigaciones del Tabaco y en particular a su directora Anayansi Cuellar, su amistad y su apoyo encarnan lo mejor de este lugar, donde me encontré con personas maravillosas. A la UCLV y a su Facultad de Ciencias Agropecuarias, mi eterna gratitud, pues me acogieron como a un igual, en especial al Dr. Ubaldo Alvarez y su grupo, ya que, sus ayudas siempre fueron definitivas. A la Facultad de Biología y en particular a la Dr. Rossana García por su ayuda desinteresada cuando volví a empezar. Gracias Orlando, me enorgullezco de tenerte como, amigo-hermano-tutor, gracias por el conocimiento enriquecedor de vida y de ciencia que me has dado, gracias a Roxana y los nenes, gracias por guiar mis pasos y enseñarme a correr, seguiré entrenando fuerte. Te agradezco mucho Debby hoy estas lejos pero no te olvido, eres una causa justa, rigurosa y bella y Fito lo sabe. Al Dr Lidcay por su sabiduría, sus consejos y su amistad. Al Dr Orelvis y su esposa gracias por el reencuentro, ustedes hacen un equipo amoroso e inteligente. No puedo olvidar en ningún momento de mi vida a todos los que me acompañaron y reconfortaron, mi Lex aunque estemos distantes, Rossi y contigo Yunior que grandes son, Lisy, Yami, Luis Enrique, Bea y por los que ya no están, que piquete mas estelar, ustedes son

AGRADECIMIENTOS

los míos, no importa donde estén, Las chicas de Agrícola (Ailing, Lisette, Yeramís, Lexy) ustedes siempre tan prácticas y de buen humor, Norma, Yarelis, Ivis siempre en deuda con ustedes con algún que otro documento. El lab en tabaco, que inolvidable desde el 2005, Humberto, ojala tuviésemos ese entusiasmo que no se te acaba, el criterio certero, la autocrítica y la sensibilidad, eres el más joven sin duda. Gracias Verónica creo que hemos aprendido mutuamente de la ciencia y de la familia. Guao, Anabel siempre preocupada por todos, tu amistad es invaluable, Joana te deseo la felicidad que mereces, María del Carmen Castro, unidos siempre bajo cualquier circunstancia, Made que gran mujer eres y lo sabes, Yudelkis me encanta tu alegría no la pierdas, Isbel siempre atenta aunque tuvieses un día malo, Tere eres buena samaritana, que todas tus empresas se cumplan, Jaiza, Rita, Nilda, Mati, gracias por compartir conmigo. En especial a Crespo, tú empezaste lo que somos hoy día y cada vez seremos mejores, Osmani, el negro pega con todo, gracias mi hermano. El lobo, la Teacher, Mildrey, Diana, Noel, Yatelier, Carmita. Mención especial a mis amigos de viaje, María Esther, Isabelita, Amaury. Nela gracias por tu comprensión y buena vibra con los dineros. Sé que me faltan gente pero están ahí conmigo. Mi deuda eterna a Rody, Yasniel y Carlitos mis hermanos de sangre y de vida, a mis tías abuelas, a mi tía Vilma, a Carlos, a los amigos que perdí por el camino, ojalá los reencuentre, a la vida, que ha sido generosa conmigo, a mi barrio y a todos los que he olvidado citar sin querer.

DEDICATORIA

A los pilares de mi vida, mi esposa, mi madre y mi abuela, a todos mis seres queridos..." Pedes in terra ad sidera visus..."

Conoces lo que tu vocación pesa en ti. Y si la traicionas, es a ti a quien desfiguras, pero sabes que tu verdad se hará lentamente, porque es nacimiento de árbol y no hallazgo de una fórmula....Antoine de Saint- Exupery (1900-1944).

SÍNTESIS

Un nuevo ADN complementario (ADNc), nombrado *nmimsp* (Tag_49066), de *Nicotiana megalosiphon* que se expresa activamente y en los inicios de la interacción con *Phytophthora nicotianae* fue descubierto utilizando el análisis de la expresión génica (*SuperSAGE*) acoplada digitalmente con la secuenciación de alto perfil (*NGS*). La expresión de *nmimsp* (Tag_49066) en *N. megalosiphon* presentó un comportamiento estable en el tiempo, primero en las hojas y posteriormente en tallos y raíces. Se obtuvo la secuencia de ADN completa del gen *nmimsp* (324 pb), el cual codificó para una proteína de 107 aminoácidos nombrada NmIMSP. Esta proteína de acuerdo con sus características bioquímicas estimadas se vinculó con inhibidores de proteasas del tipo serino pertenecientes al Clan IG, Familia I13. Además, filogenéticamente presentó homologías proteicas con TIMP B y TIMP A, inhibidores de proteasas del tipo serino informados en *Nicotiana tabacum*. La pérdida de función del gen *nmimsp* en *N. megalosiphon* demostró que se compromete la resistencia poligénica de esta especie frente a *Phytophthora nicotianae*. Por el contrario, la expresión temporal o ganancia funcional de *nmimsp* en plantas de *Nicotiana benthamiana* confiere una alta protección en esta especie frente a *Phytophthora nicotianae* y *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. El gen *nmimsp* podría utilizarse como marcador de la resistencia poligénica frente a Oomycetes y así seleccionar cultivares aptos con esta característica en el mejoramiento genético. Además,

SÍNTESIS

como compuesto activo para la elaboración de un bioproducto con actividad anti-Oomycetes y en cultivos que permitan la transgénesis y sean importantes económicamente.

Abreviaturas utilizadas en el documento

Abreviatura	Significado en Español	del Inglés
ADN	Ácido desoxirribonucleico	
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal	
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	
<i>SuperSAGE</i>	Análisis serial de la expresión génica	Serial Analysis Gene Expression
NGS	Secuenciación de alto rendimiento	Next Generation sequence
TRV	Virus del cascabeleo del tabaco	Tobacco Rattle Virus
Tag	Unidad de transcripción referido a un gen	Gen transcripts
UniTags	ADNc de un gen específico	DNAc specific short sequence
BLAST	Herramienta básica para la búsqueda y alineamiento local de secuencias	Basic Local Alignment Search Tool
BLAST2GO	BLAST, y permite la anotación funcional de genes a partir de la secuenciación	BLAST-Gene Ontology (GO)
PVX	Virus del X de la Papa	Potato X Virus
Avr	Gen de avirulencia del fitopatógeno	Avirulence gene
R	Gen R de resistencia de la planta	Resistance gene
PR	Proteínas relacionadas con la patogénesis	
SA	Ácido salicílico, hormona vegetal	Salicylic Acid
JA	Ácido jasmónico, hormona vegetal	Jasmonate
ET	Etileno, hormona vegetal	
HR	Reacción de hipersensibilidad	
H	Horas	
D	días	
RACE	Amplificación rápida de los extremos del ADNc	Rapid Amplification cDNA End
Min	Minuto	
ML	Máxima verosimilitud	Maximum likelihood
VIGS	Silenciamiento génico mediado por virus	Virus Induced Gene Silencing
NJ	Vecinos cercanos	Neighbour joining
Nt	Nucleótido	
Ø	Diámetro	
Pb	Pares de bases	
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	Polimerase chain reaction
Rpm	Revoluciones por minuto	

ABREVIATURAS

MEGA 5	Análisis genético de evolución molecular	Molecular Evolution Gene Analysis
FC	Factor de cambio, referido al cambio de expresión de un gen o transcripto	Folding Change
G	gramos	
Nm	nanometros	
Mm	milímetros	
UNIPROTKB	Base de datos universal de Proteínas	Universal Protein Data Base
MEROPS	Base de datos de proteasas y de sus inhibidores	
TMV	Virus del mosaico del tabaco	
IPR000864	Proteína de <i>S. tuberosum</i> relacionada con NmIMSP	
Da	Dalton	
SignalP	Programa informático que predice la presencia de un péptido señal	
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos	Pathogen Associated molecular Pattern
PTI	Inmunidad activada por PAMPs	PAMPs Triggered Immunity
ETI	Inmunidad activada por efectores	Effector triggered Immunity
ETS	Susceptibilidad mediada por efectores	Effector Triggered Susceptibility
MPM	Marcador de peso molecular	
S	segundos	

ÍNDICE	Página
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	9
1.1. Características generales del género <i>Nicotiana</i>	9
1.2. Origen, sistemática e importancia económica de <i>Nicotiana tabacum</i> L	9
1.3. Características generales de <i>Nicotiana megalosiphon</i> Van Heurck et Müller.	10
1.4. Principales agentes causales de enfermedades en el cultivo del tabaco en Cuba.....	11
1.5. La enfermedad <i>pata prieta</i> en el cultivo del tabaco y su importancia.	12
1.5.1. Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora nicotianae</i> y los síntomas de la <i>pata prieta</i> de <i>N. tabacum</i> L.....	13
1.5.2. Ciclo de la enfermedad, infección y epidemiología.	14
1.6. <i>Peronospora hyoscyami</i> f. sp. <i>tabacina</i> , agente causal del <i>moho azul del tabaco</i> . Características generales.....	17
1.7. Aspectos generales sobre el manejo integrado de enfermedades para el control de la <i>pata prieta</i> y el <i>moho azul del tabaco</i>	18
1.8. Interacción planta – patógeno.	19

1.8.1. Sistema de inmunidad innata en plantas.....	19
1.8.2. Resistencia parcial o poligénica.....	22
1.8.3. Resistencia vertical o monogénica.	23
1.8.4. Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).	24
1.8.5. Los Inhibidores de proteasas en plantas.	25
1.8.6. Los inhibidores de proteasas y su importancia en la protección de plantas.	26
1.8.7. Herramientas moleculares de la genómica funcional y su aplicación en la interacción planta-patógeno.....	28
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.	34
2.1. Construcción de bibliotecas de ADN complementario a partir de la interacción entre <i>Nicotiana megalosiphon</i> y <i>Phytophthora nicotianae</i>	34
2.2. Identificación de los genes que se activan durante la interacción de <i>N. megalosiphon</i> con <i>P. nicotianae</i> y que están relacionados con los inhibidores de proteasas en plantas.....	36
2.3. Análisis de la expresión de los genes activados durante la interacción en el tiempo y en los órganos de <i>N. megalosiphon</i>	37
2.4. Caracterización molecular (filogenia y bioquímica) de la proteína NmIMSP mediante programas bioinformáticos.....	39
2.5. Pérdida en la función del gen <i>nmimsp</i> . Silenciamiento génico mediado por el virus TRV en <i>Nicotiana megalosiphon</i>	39

2.5.1. Agroinfiltración de las plantas de <i>N. megalosiphon</i> con los vectores binarios TRV.	41
2.5.2. Evaluación de la prueba de resistencia a <i>P. nicotianae</i> en las plantas de <i>N. megalosiphon</i> silenciadas en el gen <i>nmimsp</i>	42
2.6. Ganancia temporal de la función del gen <i>nmimsp</i> mediada por el virus PVX en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	43
2.6.1. Expresión del gen <i>nmimsp</i> en <i>Nicotiana benthamiana</i> mediante el virus PVX.	44
2.6.2. Evaluación de la prueba de resistencia frente a <i>P. nicotianae</i> en plantas de <i>N. benthamiana</i> expresando el gen <i>nmimsp</i>	45
2.6.3. Evaluación de la prueba de resistencia frente a <i>Peronospora hyoscyami</i> f. sp. <i>tabacina</i> en plantas de <i>N. benthamiana</i> expresando el gen <i>nmimsp</i>	46
2.7. Inmuno-detección por electrotransferencia (<i>Western Blot</i>) de la proteína NmIMSP en extractos vegetales de <i>Nicotiana benthamiana</i> que expresan el gen <i>nmimsp</i>	47
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
3.1. Construcción de bibliotecas de ADN complementario a partir de la interacción entre <i>Nicotiana megalosiphon</i> y <i>Phytophthora nicotianae</i>	49

3.2. Identificación de los genes que se activan durante la interacción de <i>N. megalosiphon</i> con <i>P. nicotianae</i> y que están relacionados con los inhibidores de proteasas en plantas.....	51
3.3. Análisis de la expresión de los genes activados durante la interacción en el tiempo y en los órganos de <i>N. megalosiphon</i>	55
3.4. Caracterización molecular (filogenia y bioquímica) de la proteína NmIMSP mediante programas bioinformáticos.....	60
3.5. Pérdida en la función del gen <i>nmimsp</i> . Silenciamiento génico mediado por el virus TRV en <i>Nicotiana megalosiphon</i>	71
3.6. Ganancia temporal de la función del gen <i>nmimsp</i> mediada por el virus PVX en plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i>	76
3.6.1. Expresión del gen <i>nmimsp</i> en <i>Nicotiana benthamiana</i> mediante el virus PVX.....	76
3.6.2. Evaluación de la prueba de resistencia frente a <i>P. nicotianae</i> en plantas de <i>N. benthamiana</i> expresando el gen <i>nmimsp</i>	78
3.6.3. Evaluación de la prueba de resistencia a frente a <i>Peronospora hyoscyami</i> f. sp. <i>tabacina</i> en plantas de <i>N. benthamiana</i> expresando el gen <i>nmimsp</i>	83
3.7. Inmuno-detección por electrotransferencia (<i>Western Blot</i>) de la proteína NmIMSP en extractos vegetales de <i>Nicotiana benthamiana</i> que expresan el gen <i>nmimsp</i>	88
CONCLUSIONES	94

ÍNDICE

RECOMENDACIONES	96
-----------------------	----

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
------------------------	--

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los mayores productores de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en el mundo son China, Brasil, India, EEUU y Malawi. La media de producción en estos países supera las 50 millones de toneladas métricas anuales (FAO, 2013). Cuba produjo un total de 700000 toneladas en el año 2013. La cifra es inferior a la obtenida por los principales países productores de la solanácea sin embargo, es un cultivo de gran importancia económica en el país por constituir uno de sus principales rubros exportables, (Espino, 1998). La calidad y el rendimiento del tabaco negro en Cuba son afectados por la incidencia de enfermedades de naturaleza biótica en su fase agrícola. Entre las más importantes se encuentra la *pata prieta* provocada por el Oomycete, *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (Espino., 1988). Los países afectados por este fitopatógeno adoptan una serie de medidas fitosanitarias que incluyen la obtención de cultivares resistentes, su mejoramiento genético y el uso de fungicidas sistémicos (Espino, 2006). La utilización de fungicidas sistémicos es impracticable por los productores debido a los altos precios de costo en el mercado mundial (Espino, 2006). Por otra parte, el fenómeno de la resistencia a fungicidas en estas poblaciones patogénicas se ha comprobado, por lo que constituye otra limitante (Lyr, 1995). La incidencia de la *pata prieta* puede alcanzar una afectación superior al 30% del área total plantada (Espino, 2010). Las afectaciones pueden ser epidémicas sin un uso adecuado de la distribución de cultivares en las diferentes regiones del país. Es conocido que en la región occidental se ubican las principales vegas de tabaco para la confección de los

Habanos, por tanto la afectación de la *pata prieta* presenta un mayor impacto (Espino y col., 2012). Sin embargo, las regiones centrales y orientales también han experimentado un incremento en la incidencia de esta enfermedad, debido al aumento de las temperaturas y la humedad relativa en las últimas campañas (Espino y col., 2012). Aunque los cultivares comerciales de *Tabaco Negro* y *Burley* que se encuentran en explotación refieren un nivel de resistencia notable o moderado, la enfermedad prevalece con una mayor incidencia cada año (Espino, 2010). Lo anterior está determinado por el establecimiento de condiciones climáticas prolongadas, con días nublados, elevada humedad, temperaturas superiores a los 20 C° y periodos de sequías después de intensas precipitaciones (Espino 2014, comunicación personal; Lucas, 1975). Otra enfermedad importante del cultivo del tabaco en Cuba es el *moho azul*; esta es provocada por *Peronospora hyoscyasmi* f. sp. *tabacina*, un biótrofo obligado de *N. tabacum* (García y col., 1999). Sin embargo, en las últimas campañas, su incidencia ha ocupado un segundo lugar, después de la *pata prieta*, ya que el desarrollo del patógeno se ha visto afectado por las condiciones climáticas actuales (Espino 2014, comunicación personal). Por tales motivos los programas de mejoramiento genético para la obtención de cultivares resistentes constituyen una de las principales medidas en el control de los *Oomycetes* (Espino, 1996). Los cultivares comerciales de tabaco negro en Cuba presentan una resistencia a enfermedades procedente de la especie *Nicotiana debneyii* (Espino, 1996). La presencia de estos genes de resistencia en estos cultivares tienen más de 30 años de explotación en plantación. Como consecuencia, los *Oomycetes* fitopatógenos del tabaco se encuentran más adaptados a estos cultivares mediante sus mecanismos microevolutivos de patogenicidad y virulencia (Espino, 1996). Lo

anterior, conduce a la búsqueda de nuevos genes que diversifiquen genéticamente los futuros cultivares dentro del germoplasma de las especies de *Nicotiana*, tomando como base, la utilización de nuevos parentales resistentes a *Oomycetes* (García y Castro, 2007). Numerosas investigaciones han demostrado que la especie *Nicotiana megalosiphon* constituye un reservorio de genes de resistencia frente a diferentes fitopatógenos del tabaco (Rodríguez, 2013). Esta especie no posee valor comercial, sin embargo, es prácticamente inmune a las enfermedades provocadas por *Oomycetes* tales como *Phytophthora nicotianae* y *Peronospora hyoscyami* f sp *tabacina* (Borras-Hidalgo y col, 2006). El análisis en la expresión génica de *N. megalosiphon* durante la interacción con *P. hyoscyami* f sp *tabacina* demostró la inducción del factor de transcripción EIL2 y la glutatión sintetasa (Borras-Hidalgo y col., 2006). Además, en este hospedante se aisló la defensina NmDE02, la cual presenta actividad biológica contra diferentes fitopatógenos, entre los que se incluye *P. nicotianae* (Portieles y col., 2010). Por otra parte, la glutatión transferasa actúa como regulador negativo en *N. megalosiphon* frente a *P. nicotianae* (Hernández y col., 2009). Mientras, que otros genes son activados durante esta interacción (Chacón y col., 2009), como los que codifican para la proteína activada por mitógenos (MAPK), las proteínas relacionadas con la muerte celular (*RING finger protein*) y el estrés oxidativo. Las interacciones compatibles e incompatibles entre la planta y el patógeno están determinadas por la acción del sistema de inmunidad innata que es capaz de desarrollar el hospedante (planta) (Borras y col, 2010). La inmunidad innata en plantas, aunque es un concepto relativamente nuevo en la fitopatología (Jones y Dangl, 2006). El número de genes involucrados en este proceso determina el tipo de resistencia en la planta que han sido definidas como horizontal o poligénica o

en otro caso vertical o monogénica (Agrios., 2005). La resistencia poligénica depende del aporte de cientos de genes que constituyen la primera línea de defensa de la planta, es una respuesta duradera en el tiempo y estable (Kou y Wang 2010; Agrios 2005). En cambio, la resistencia vertical o monogénica depende exclusivamente del reconocimiento específico de un gen de avirulencia (avr) en el patógeno, por su gen de resistencia en el hospedante (R) (Hoorn y Kamoun, 2009). La presencia del par proteico R-avr genera una respuesta hipersensible o HR en la planta, vigorosa e inmediata (Agrios, 2005). El resultado final implica el aislamiento y la destrucción progresiva del patógeno. Esta respuesta es más robusta que la anterior, pero al depender de uno o muy pocos genes R, tendrá poca estabilidad en el tiempo, ya que un cambio genético en el gen avr del patógeno implicaría que el gen R de la planta no podría reconocerlo y que por tanto, ocurra el desarrollo de la enfermedad (Agrios, 2005). Los genes de ambos tipos de resistencia son investigados durante la interacción con el patógeno mediante diferentes técnicas de la Genómica Funcional. Estas permiten el análisis en la expresión de un gran número de genes como es el caso del *SuperSAGE* (del inglés, *Serial Analysis Gene Expression*), (Matsumura y col, 2010). También, posibilitan la secuenciación a gran escala de los genes que se inducen en determinada condición (*NGS, Next Generation Sequences*) o permiten analizar su importancia en la resistencia a un patógeno mediante el silenciamiento del gen o su expresión utilizando vectores virales de plantas (Chakravarthy y col., 2010).

En la interacción planta - patógeno los genes de la resistencia poligénica son activados en los primeros estadios de la respuesta de defensa de la planta (Shulze y Panstruga, 2011). Estos codifican para diferentes tipos de proteínas

entre las que se incluyen glucanasas, xilanasas, galacturonasas, proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), proteasas e inhibidores de proteasas (Sels y col., 2008). Los inhibidores de proteasas presentan dos funciones fundamentales; regulan las proteasas endógenas del hospedante e inhiben las proteasas del patógeno (van der Hoorn, 2008). Estas proteínas descritas en plantas se encuentran en órganos de reserva, semillas, flores, entre otros (Habib y Fazili, 2007). Los inhibidores de proteasas se activan durante el daño tisular provocado por el patógeno. Por ejemplo, la infección del Virus del Mosaico del Tabaco activa dos inhibidores de proteasas nombrados TIMPA y TIMPB en plantas de *Nicotiana tabacum* (Heizt y col., 1993). También, la presencia de un inhibidor de proteasa del tipo serino, PLPK, se ha relacionado con la infección de *Phytophthora infestans*, agente causal del tizón tardío de la papa (Feldman y col., 2014). Además, en plantas de tomate resistentes a este fitopatógeno se ha detectado la actividad de inhibidores de tripsina y quimotripsina (Kim y col., 2009). Estas proteínas son capaces de inhibir las proteasas digestivas de insectos pertenecientes a los Órdenes *Lepidoptera*, *Diptera* y *Coleoptera* (Habib y Fazili., 2007). Mediante la aplicación de técnicas biotecnológicas se han creado plantas transgénicas que expresan inhibidores de proteasas del tipo serina y cisteína y que han logrado el control de nemátodos, insectos, hongos y bacterias fitopatógenas (Paiva y col., 2013). Numerosos inhibidores de proteasas se han aislado y caracterizado bioquímicamente en la familia Solanáceas y específicamente en las siguientes especies del género *Nicotiana* sp tales como: *Nicotiana benthamiana* Domin, *Nicotiana tabacum* L, *Nicotiana alata* Link & Otto, *Nicotiana glutinosa* L, *Nicotiana langsdorffii* Weinm, *Nicotiana attenuata* Torrey ex S. Watson, *Nicotiana cavicola* N. T.Burb, *Nicotiana hesperis* N.T.Burb, *Nicotiana*

simulans N. T. Burb y *Nicotiana glauca* Graham. En la especie *Nicotiana megalosiphon* Van Huerck & Mull. Arg se ha identificado un inhibidor de proteasas del tipo serino relacionado con los descritos en el Género *Capsicum* (<http://plantpis.ba.itb.cnr.it/>, 2013).

Tomando en consideración que *Nicotiana megalosiphon* es una especie prácticamente inmune frente a las enfermedades provocadas por *Oomycetes* y en particular por *P. nicotianae* (*pata prieta*), y dada la importancia de los inhibidores de proteasas en plantas en el aporte a la resistencia horizontal o poligénica, se propone la siguiente hipótesis:

“La resistencia poligénica de *Nicotiana megalosiphon* frente a *Phytophthora nicotianae*, pudiera estar relacionada con la expresión de genes que codifican para inhibidores de proteasas en plantas”.

Para comprobar esta hipótesis se define el siguiente objetivo general y los siguientes objetivos específicos:

Objetivo General:

Definir cuáles genes de *Nicotiana megalosiphon* intervienen en la resistencia poligénica frente a *P. nicotianae* y suponen una protección de amplio espectro frente a *Oomycetes* fitopatógenos.

Objetivos específicos:

1. Obtener bibliotecas de ADN complementario (ADNc) a partir de la interacción de *Nicotiana megalosiphon* y *Phytophthora nicotianae* mediante SuperSAGE.

2. Identificar las secuencias de ADNc (genes) que se activan durante la interacción entre *Nicotiana megalosiphon* y *Phytophthora nicotianae* y que están relacionadas con genes que codifican para inhibidores de proteasas en plantas.
3. Evaluar el comportamiento (cinético) de la expresión en el tiempo y en los órganos de *N. megalosiphon* de los genes identificados y relacionados con inhibidores de proteasas en plantas.
4. Caracterizar molecularmente, (filogenia y bioquímica) los genes que fueron identificados en *Nicotiana megalosiphon* y que están relacionados con los inhibidores de proteasas de plantas mediante programas bioinformáticos.
5. Evaluar la pérdida o ganancia de función de los genes relacionados con los inhibidores de proteasas de plantas en *N. megalosiphon* y *N. benthamiana* respectivamente, frente a *Oomycetes* que afectan el cultivo del tabaco.

La novedad científica de este trabajo radica en que:

1. Es la primera vez que se vincula la resistencia poligénica a *Oomycetes* con un gen de *Nicotiana megalosiphon* que se activa durante la interacción con *P. nicotianae* y está relacionado con inhibidores de proteasas en plantas.
2. Se caracteriza un gen de *Nicotiana megalosiphon* que durante su expresión temporal en *Nicotiana benthamiana*, especie susceptible a enfermedades provocadas por *Oomycetes*, confiere niveles altos de resistencia frente *Phytophthora nicotianae* y *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*.

Aportes prácticos esperados:

1. El gen caracterizado de *Nicotiana megalosiphon* es un indicador de la resistencia poligénica frente a *Oomycetes* fitopatógenos que afectan el cultivo del tabaco; por lo cual podría ser utilizado como un marcador molecular de este tipo de resistencia en líneas de mejoramiento genético o cultivares resistentes a enfermedades como la *pata prieta* y el *moho azul del tabaco*.
2. La efectividad del gen controlando la infección de *Oomycetes* durante su expresión temporal en *N. benthamiana* sugiere la posibilidad de utilizarlo en la transformación de especies o cultivares susceptibles, por ejemplo a *pata prieta*, con importancia económica en la agricultura, como el tomate, el pimiento y la papa, cultivos que además pertenecen a la familia de las Solanáceas.
3. La expresión del gen puede ser utilizada para la obtención de una proteína con actividad biológica contra *Oomycetes*, por lo cual sería posible la elaboración de un producto biológico a partir de la misma.

Aporte social:

1. El presente trabajo aporta conocimientos novedosos sobre un gen de *N. megalosiphon* relacionado con inhibidores de proteasas que influye positivamente en la resistencia poligénica frente a *P. nicotianae*. El control de *Oomycetes* fitopatógenos en el cultivo del tabaco es una prioridad fitosanitaria por la importancia que tiene el cultivo en la economía del país.

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Características generales del género *Nicotiana*.

El género *Nicotiana* comprende más de 60 especies originarias de las Américas, Australia e islas asociadas, *Nicotiana africana* Merxmüller et Buttler es la única especie que se conoce como nativa del continente africano (Shew y Lucas, 1991).

El número básico de cromosomas en *Nicotiana* es $x=12$, y el número más frecuente es $2n=2x=24$ (33 especies), (Olmstead y Bohs, 2007). El género *Nicotiana* se divide en tres sub-géneros: *Rustica*, *Tabacum* y *Petunioides* basado en la morfología, posibilidades de cruce, número cromosómico y comportamiento de híbridos interespecíficos (Olmstead y Bohs, 2007). Dentro de este género, la especie *Nicotiana tabacum* ($2n=48$) es la de mayor importancia y la más conocida.

1.2. Origen, sistemática e importancia económica de *Nicotiana tabacum* L

Se plantea que el origen de *Nicotiana tabacum* se encuentra entre los híbridos de las especies *Nicotiana sylvestris*, *N. tomentosiformis* y *N. otophora* (Kishore, 2014). El área original de distribución natural fue el noroeste de Argentina y su vecindad boliviana (Torrecilla y col., 1980). En general de acuerdo a los estudios sistemáticos la especie se clasifica como *Nicotiana tabacum* Linn; Familia *Solanaceae*; Orden *Solanales*; Clase *Magnoliopsida*; División *Magnoliophyta* (Kishore, 2014).

Importancia económica.

En el año 2009, la superficie mundial dedicada al cultivo del tabaco fue de 3876245 hectáreas, con una producción de tabaco crudo de 7,19 millones de toneladas y los mayores productores fueron China, Brasil y la India con el 44%, el 12% y el 9%, respectivamente, de la producción mundial (FAO, 2013). En Cuba, las plantaciones de tabaco se han extendido paulatinamente a todas las provincias, aunque es en el occidente y el centro del país donde existen las mayores extensiones (García y col., 2002). La producción de tabaco llegó a las 700000 toneladas en el año 2013 y se prevé un incremento en el próximo quinquenio con la incorporación de otras zonas en la región oriental del país (FAO, 2013). La exportación de puros Habanos constituye una de las principales vías de ingreso de divisas y los principales consumidores del producto se encuentran en el mercado europeo.

1.3. Características generales de *Nicotiana megalosiphon* Van Heurck et Müller.

Nicotiana megalosiphon es una planta herbácea de crecimiento anual, de origen australiano. Mide aproximadamente 90 cm, muy pubescente, con abundante pelos glandulares; crece en forma de roseta y presenta hojas delgadas, usualmente pecioladas, y punteadas. La inflorescencia es panicular con algunas ramas, el cáliz mide de 10-20 cm de largo. Las flores son blancas, alargadas y con forma de trompeta, presentan alrededor de 5 pétalos (Anon, 1990). Tiene propiedades tóxicas. Los cruces entre *N. tabacum* y *N. megalosiphon* resultan parcialmente estériles (Goodspeed, 1954).

Nicotiana megalosiphon se comporta prácticamente inmune a los Oomycetes *Phytophthora nicotianae* y *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* y su resistencia se manifiesta desde los primeros estadios de desarrollo de la especie (Rodríguez, 2013). Otras investigaciones demuestran el control de las enfermedades del *tizón tardío* de la papa y la *pata prieta* en tabaco, mediante la utilización de proteínas, llamadas *defensinas*, aisladas de *N. megalosiphon* (Portieles y col., 2010). Además, numerosos genes involucrados en la resistencia poligénica se han caracterizado durante la interacciones de esta especie con *Phytophthora nicotianae* (Chacón y col., 2009) y *P. hyoscyami* f.sp. *tabacina* (Borras y col., 2006).

1.4. Principales agentes causales de enfermedades en el cultivo del tabaco en Cuba.

Las principales fitopatógenos que afectan el cultivo del tabaco en Cuba son *Phytophthora nicotianae* que provoca la *pata prieta*, *Peronospora hyoscyami* f sp. *tabacina*, agente causal del moho azul. Las afectaciones del *Heliothis virescens* Fabricio, el cogollero del tabaco, es una enfermedad fitosanitaria, difícil de controlar. La marchitez provocada por *Fusarium oxysporum* Schlecht. En las regiones centrales de Cuba la presencia de la bacteria *Nocardia* sp provoca la enfermedad del falso Orobanche. Diferentes virus de la familia *Geminiviridae* como los que causa la enfermedad del *encrespamiento foliar* y el del *grabado del tabaco* provocan afectaciones de impacto económico negativo en las regiones occidentales. La planta parásita *Orobanche ramosa* es un problema fitosanitario extendido en todas las áreas tabacaleras del país. La presencia de las especies de áfidos (*Myzus nicotianae* Blackman y *Myzus persicae* spp. *nicotianae*

Blackman) en las regiones occidentales han coincidido con el incremento de enfermedades provocadas por virus vegetales (Espino, 2009).

1.5. La enfermedad *pata prieta* en el cultivo del tabaco y su importancia.

Es la enfermedad más destructiva del cultivo del tabaco y la que más daños económicos provoca en el productor. Presenta una distribución global, prácticamente se encuentra en todas las regiones donde se cultiva la solanácea. La mayoría de los países utilizan estrategias de manejo integrado para controlar su incidencia (Sullivan y col., 2005). El control químico es muy costoso, aunque los fungicidas sistémicos son los más efectivos (Nesmith, 2001). Los principales productores de tabaco mundial como China, Brasil, India y EEUU, informan anualmente, pérdidas millonarias por las afectaciones provocadas por este *Oomycete*. En Cuba la enfermedad *pata prieta* ha aumentado su incidencia desde la campaña 1988 (Espino, 2009). Existen focos epidémicos recurrentes en todas las campañas, fundamentalmente en la región occidental (Espino, 2009). En la cosecha tabacalera 2007-2008 constituyó el problema fitosanitario más significativo, ya que produjo un nivel de afectación del 46 % del área total sembrada (Espino, 2010). En las últimas cuatro campañas (2011-2014) desplazó al moho azul como la enfermedad más importante del cultivo del tabaco. En las provincias centrales en la campaña 2014-2015 se cultivó un área total de 2492 ha. Sin embargo, se informó una afectación de 237,40 ha, que representa un 10 % de incidencia de *pata prieta*. El 41 % de esta afectación fue clasificada de intensa según el área analizada (99,65 ha) (comunicación personal Dr. Ubaldo Alvarez; jefe del Dpto Agronomía). En las regiones occidentales la incidencia de la enfermedad supera el 10 % del área afectada (Msc. Anayansi Cuéllar, Director del

Instituto de Investigaciones del Tabaco). El desarrollo de las poblaciones de *Phytophthora nicotianae* se ha favorecido con el incremento de la temperatura media y la humedad relativa de los últimos inviernos en detrimento de las poblaciones de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* (Espino, 2010). La siembra de cultivares resistentes es la práctica más utilizada y generalizada para controlar las afectaciones de *P. nicotianae* en la fase de plantación, pues el uso de fungicidas sistémicos es incosteable por los altos precios de venta en el mercado internacional.

1.5.1. Clasificación taxonómica de *Phytophthora nicotianae* y los síntomas de la pata prieta de *N. tabacum* L.

Los estudios sistemáticos de la especie *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan (Erwin y Ribeiro, 1996) la ubican en el Phylum Heterokontophyta; Clase Oomycete; Orden Pythiales; Familia Pythiaceae; Género *Phytophthora*.

La enfermedad *pata prieta* puede atacar toda la planta de tabaco, provoca la obstrucción de los vasos del floema y el xilema, lo que limita el ascenso de las sustancias nutritivas hacía el resto de la planta, afectando el crecimiento, la calidad de las hojas y por tanto el rendimiento de la cosecha (Shew y Lucas, 1991). En las raíces los síntomas más frecuentes son la necrosis parcial y generalizada, que impide la absorción de agua y nutrientes por este órgano durante la fase de semilleros y plantación (Nesmith, 2001). También se pueden observar las afectaciones en los tallos con el ascenso del marchitamiento provocando la caída de las hojas, figura 1. El patógeno continúa su avance hasta una altura entre 15-20 cm, la médula se seca, se torna de color pardo y se separa formando discos (Shew y Lucas, 1991). En las hojas se observa un

marchitamiento paulatino, decoloración, presencia de manchas amarillas y en estados avanzados de la enfermedad se produce la pérdida total de estas. El *Oomycete* es capaz de parasitar nuevas hojas cercanas a la base del tallo mediante las salpicaduras de las precipitaciones (Shew y Lucas, 1991).

1.5.2. Ciclo de la enfermedad, infección y epidemiología.

El ciclo de vida de *P. nicotianae* es complejo ya que presenta varios tipos de esporas. Los esporangios y las clamidosporas pertenecen a la fase asexual del patógeno, mientras que el ciclo sexual está determinado por las oosporas (Erwin y Ribeiro 1996). Las clamidosporas son estructuras resistentes en el tiempo y se forman en los tejidos muertos, estas pueden sobrevivir en el suelo durante años y son la fuente del inóculo primario (Erwin y Ribeiro 1996).



Figura 1. Afectaciones en el tallo producidas por la pata prieta en un cultivar de *Nicotiana tabacum*. Se observa el desarrollo de la enfermedad caracterizada por el marchitamiento de las hojas y la necrosis (color oscuro) desde la base del tallo.

Cuando las condiciones de temperatura, humedad y nutrientes son favorables las clamidosporas germinan produciendo hifas o esporangios que inician la fase asexual del patógeno. Los esporangios producen zoosporas que se desplazan en condiciones acuosas mediante un par de flagelos, los cuales poseen valor taxonómico para el género, en busca de las raíces de las plantas hospedantes (Narayan y col., 2010). Posteriormente, en este órgano forman quistes y germinan produciendo una hifa o liberando más zoosporas con lo cual se completa ciclo asexual (Hardham, 2009). Estas estructuras son muy importantes en la epidemiología y la dispersión del patógeno. Las oosporas son las estructuras sexuales que contienen la diversidad genética de la especie aunque su presencia ha sido poco observada, sin embargo la adaptación de las poblaciones del patógeno a diferentes cultivares resistentes son evidencias de la plasticidad genómica que puede mostrar este microorganismo (Blackman y col 2010), (Figura 2).

Infección:

Las zoosporas infectan las plantas penetrando a través de los pelos radicales y las aberturas estomáticas (Hardham, 2009). Los esporangios producen un tubo germinativo que penetra directamente en la epidermis de la planta. El posterior desarrollo de un micelio en el interior de los tejidos vegetales dará origen a una nueva generación de esporangios en las raíces y hojas del hospedante (Hardham, 2009). En condiciones climáticas favorables el *Oomycete* completa el ciclo reproductivo asexual entre 48 h y 72 h. El inóculo primario se multiplica exponencialmente en breve tiempo y ocurre la dispersión inmediata del patógeno (Hardham, 2009).

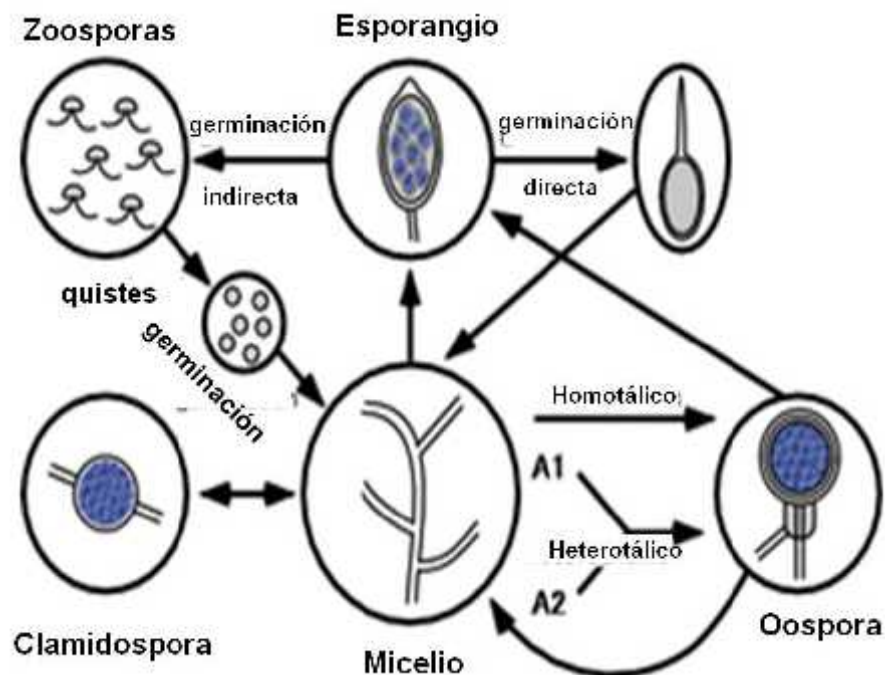


Figura 2. Ciclo de vida sexual y asexual de *Phytophthora nicotianae*.

Epidemiología:

Los esporangios y zoosporas se trasladan a través del agua de riego y las precipitaciones (Sullivan y col., 2005). En esta circunstancia son dispersados por los surcos, las zanjas, las lagunas de drenaje, los arroyos y ríos infestando nuevos campos de cultivos (Shew y Lucas, 1991). Otras vías comprobadas son los utensilios de labranza, las patas de los animales de campo, los zapatos de los agricultores, las ruedas de los tractores y camiones (Shew y Lucas, 1991). Un aspecto importante a tener en cuenta es la siembra continua e intensiva de tabaco en los campos tradicionales, lo cual incrementará la concentración del inóculo en el suelo paulatinamente. Por esta razón, se recomienda realizar un monitoreo del número de propágulos por gramo (g) de suelo con el objetivo de conocer su concentración y estimar si es factible o no plantar el cultivo (Espino, 2009).

1.6. *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*, agente causal del *moho azul* del tabaco. Características generales.

El *moho azul* del tabaco es una de las enfermedades más devastadoras del cultivo de *Nicotiana tabacum* L. Su aparición en Cuba por primera vez fue en 1957, informándose pérdidas considerables en las regiones de Artemisa y Mayabeque (Pandiello, 1958). Posteriormente aparece en la campaña 1979-1980 destruyendo el 90 % de la cosecha plantada y convirtiéndose en una enfermedad endémica (Pérez y Aguiar, 1982). Por esta razón, el sistema de sanidad vegetal en Cuba continúa desarrollando y perfeccionando el control y manejo integrado para esta enfermedad. *Peronospora hyoscyasmi* f. sp. *tabacina* es el agente causal del moho azul del tabaco. Es un biótrofo obligado de *N. tabacum* L y pertenece al Phylum *Heterokontophyta*, Clase *Oomycetes*, Orden *Peronosporales*, Familia *Peronosporaceae*, Género *Peronospora* (Diana, 1993). Todas las regiones tabacaleras de Cuba presentan incidencia de moho azul en mayor o menor grado. Los periodos de máxima incidencia comienzan a finales del mes de noviembre y disminuyen en los primeros días de abril (Espino, 1996). Los inviernos más cálidos y con escasa humedad, en las últimas 5 campañas, han provocado una disminución en la severidad de ataque de la enfermedad. Actualmente es la pata prieta y no el moho azul la enfermedad del tabaco más importante provocada por *Oomycetes* (Espino, 2010). El patógeno en su ciclo de vida asexual forma esporangios en el envés de la hoja del hospedante. Estas estructuras son las encargadas de dispersar el *Oomycete* en cortas o grandes distancias mediante las corrientes de aire (Main, 2002). El ciclo de vida se completa en el hospedante, sin embargo es capaz de desarrollar oosporas que son las estructuras sexuales de este patógeno. Aunque se ha comprobado la

presencia de estas, no es común encontrarlas en la época de plantación, no obstante son las encargadas de sobrevivir después de la recolección del tabaco y constituir el inóculo primario para la nueva campaña (Heist, 2000). Los síntomas de la enfermedad en semilleros se evidencian con la presencia de parches con hojas destruidas, posteriormente en plantas de mayor altura es posible observar decoloraciones amarillas y la aparición de un moho veloso que son las esporulaciones del patógeno (David y Main., 1990). En plantas adultas muy infestadas el moho veloso es más abundante y tupido, con una coloración azulada, lo que es más evidente en las hojas proximales a la base del tallo, estas lesiones forman áreas necróticas (Fillers, 2004). La infección sistémica de la planta ocurre cuando el patógeno infesta el sistema vascular del hospedante provocando la distorsión y ruptura de tallos y hojas, decoloración vascular y enanismo (Main, 2002).

1.7. Aspectos generales sobre el manejo integrado de enfermedades para el control de la *pata prieta* y el *moho azul del tabaco*.

Las medidas fitosanitarias para el manejo integrado de estas enfermedades provocadas por *Oomycetes* tienen en cuenta diferentes aspectos como la selección de terrenos adecuados para la siembra. El suelo no debe exceder el número de propágulos de *P. nicotianae* que debe ser inferior al 21 % (Espino y col., 1999). La estrategia varietal debe seguir la zonificación recomendada, donde las variedades más tolerantes a las enfermedades deben estar en las regiones de mayor incidencia sin que esto comprometa el rendimiento y la calidad del producto final (Espino y col., 1999). Por otra parte, se debe tomar en cuenta el periodo de mínima incidencia de estas enfermedades para comenzar a plantar los

cultivares más productivos, por ello el trasplante de las posturas se realiza en noviembre para alguno de ellos, ya que las temperaturas invernales retrasan el desarrollo de *P. nicotianae*. Otra herramienta importante en el manejo integrado, lo constituye el uso de un sistema de pronóstico para la aparición de estas enfermedades. El mismo posee un carácter predictivo y probabilístico que se encuentra en estrecha relación con las condiciones climáticas y la presencia de focos del patógeno o la identificación del inóculo primario (Espino y col., 1999). Es también fundamental, el uso racional de agroquímicos preventivos y curativos, combinado con la aplicación de productos biológicos como la utilización de *Trichoderma* contra la *pata prieta*. La selección negativa de las plantas infestadas no es menos importante, dada la importancia epidemiológica que posee. La sostenibilidad de los suelos y la presencia de microorganismos benéficos se logran con la siembra de leguminosas como el maíz y el sorgo después de la cosecha de tabaco (Espino y col., 1999).

1.8. Interacción planta – patógeno.

1.8.1. Sistema de inmunidad innata en plantas.

Las plantas han desarrollado estrategias que les permiten reconocer a los patógenos que las invaden y activan una defensa efectiva (Van der Biezen y Jones, 1998). De la misma forma, los patógenos poseen mecanismos que les posibilitan evadir y/o suprimir estas respuestas defensivas provocando la enfermedad en las plantas (Gohre y Robatzek, 2008). Los mecanismos de defensa y ataque de ambos organismos se encuentran en continua evolución y su comprensión permite la aplicación de medidas fitosanitarias basadas en las disciplinas de la biotecnología y la biología molecular (Dodds y Rathjen, 2010).

Las plantas son resistentes a la mayoría de los microorganismos patógenos mediante un mecanismo de defensa basal, denominado sistema de inmunidad innata (Jones y Takemoto, 2004; Chisholm y col., 2006; Jones y Dangl, 2006). El modelo zigzag (Jones y Dangl, 2006) trata de explicar la respuesta inmune de la planta tomando en cuenta dos fases fundamentales de percepción y reconocimiento de las bio-moléculas del patógeno (Figura 4).

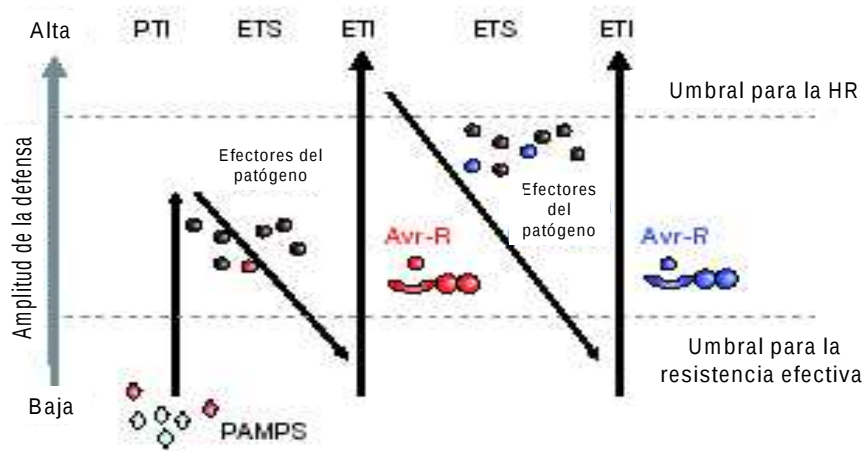


Figura 4. Modelo zigzag de Dangl y Jones. Fases de reconocimiento del patógeno y activación de la respuesta de inmunidad innata en plantas (PTI y ETI).

En una primera fase, el sistema de inmunidad innata es activado por la acción de los receptores de membrana celular de la planta (PRRs) que reconocen las estructuras biológicas de los patógenos (patrones moleculares asociados a patógenos) o PAMPs, (Thomma y Joosten, 2011). La interacción proteica entre PRRs-PAMPs promueve la activación de la defensa de la planta llamada sistema inmune activado por PAMPs o PTI (Zipfel, 2009; Boller y Felix, 2009). Sin embargo, determinados patógenos utilizan proteínas especializadas, llamadas efectores, que logran suprimir la activación del PTI y provocan en la planta la susceptibilidad a la enfermedad o ETS (Jones y Dangl, 2006). Los genes *avr*

codifican para las proteínas efectoras (Avr) del patógeno que están localizadas en el citoplasma y pueden ser reconocidas de forma específica por una proteína de resistencia (R) de la planta (Jones y Dangl, 2006). La interacción R-Avr es el segundo momento de reconocimiento o percepción del patógeno. Esta vez el sistema de inmunidad innata de la planta es activado por la acción de las proteínas R de la planta sobre los efectores del patógeno y es llamado ETI o activación mediada por efectores (Swiderski y col., 2009; Jones y Dangl, 2006). Durante el ETI se produce una transducción de señales hacia el interior de la célula de la planta activando una cascada de genes que generalmente termina en una reacción de hipersensibilidad (HR), (Van der Hoorn y Kamoun, 2009). La HR evita la infección y el desarrollo posterior del patógeno. En ocasiones el efector tiene mutado el sitio de reconocimiento de la proteína R de la planta por tanto se produce una nueva susceptibilidad a la enfermedad para esta nueva variante del patógeno (Jones y Dangl, 2006). La presión de selección de esta nueva mutación hará que otra proteína R aparezca en la población de plantas activándose nuevamente la inmunidad mediada por efectores o ETI (Jones y Dangl, 2006). El modelo zigzag fue propuesto tomando en cuenta la interacciones de plantas con biótrosos del tipo *Oomycetes*, como son los casos de *P. nicotianae* y *P. hyoscyami* f. sp *tabacina*. En la actualidad se utiliza como marco teórico en la comprensión inicial de lo que se entiende por sistema de inmunidad innata en plantas. Entre las principales limitaciones del modelo podemos citar que no se ajusta a otros tipos de interacciones que no sean con *Oomycetes*; tales como, bacterias, hongos necrótrofos, virus e incluso simbioses (Pritchard y Birch, 2014). En otro aspecto, el modelo no posibilita la cuantificación de ninguna de las fases o factores que influyen en la interacción. Así mismo, el tiempo en el que ocurre la respuesta de

defensa de la planta es ambiguo, cuando en realidad, los procesos que ocurren a nivel poblacional, como la aparición de un nuevo gen R, en la planta demoran evolutivamente y no ocurren de inmediato. Tampoco queda definido el espacio en el que ocurre la respuesta, pues las primeras fases se describen en un número limitado de células y el resto a nivel poblacional. Por último no toma en cuenta el medio ambiente y los factores abióticos que influyen directamente en la interacción (Pritchard y Birch, 2014). No obstante, en la actualidad el modelo zigzag es la herramienta expositiva, teórica y pedagógica más utilizada en la fitopatología para comprender los mecanismos moleculares que definen la inmunidad innata de las plantas.

1.8.2. Resistencia parcial o poligénica.

La resistencia poligénica, multigénica, parcial, horizontal o cuantitativa, está determinada por un grupo de genes que codifican para numerosas proteínas que actúan de forma coordinada para detener el avance y el posterior desarrollo del patógeno (Agrios, 2005). Cada uno de estos genes aporta individualmente a la resistencia basal de la planta. Como resultado se obtiene un tipo de resistencia conformada por el aporte cuantitativo de estos genes frente a las posibles variantes patogénicas de razas, cepas, patovares y biotopos en diferentes géneros y especies (resistencia de amplio espectro), (Agrios, 2005). La activación de esta resistencia constituye la primera línea de defensa de la planta. Entre los genes de la resistencia poligénica que son activados se encuentran los que codifican para las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), (Kou y Wang, 2010). La acumulación de las proteínas PR está asociada directamente con la presencia de cultivares de resistencia poligénica de amplio espectro, incluso se

han informado biomoléculas que activan la respuesta de HR en ausencia de la proteína de resistencia R (Sels y col., 2008). Por tanto existen dos factores fundamentales que influyen en el desarrollo efectivo de la resistencia poligénica, ellos son: los genes de expresión constitutiva involucrados en las barreras estructurales y bioquímicas y los genes que codifican para las proteínas PR y que están asociadas a la respuesta de HR.

1.8.3. Resistencia vertical o monogénica.

La resistencia vertical, monogénica, raza-específica o de genes R, está presente en muchas interacciones planta – patógeno, especialmente aquellas en las que participan *Oomycetes* biótrophos, hongos (mildius polvorientos, royas), nemátodos, virus y bacterias (Agrios, 2005). La resistencia de la planta, ocurre a través de pares complementarios de genes, un gen R (planta) codifica para una proteína R que reconoce específicamente el producto de un gen del patógeno o proteína Avr (Agrios, 2005; Oijen y col., 2007). Existen dos hipótesis acerca de la percepción de las proteínas Avr del patógeno por la planta: la primera plantea la interacción directa “gen a gen” y la segunda aboga por la interacción indirecta a través de “*proteínas guardianas*” (Hoorn y Kamoun, 2009). La respuesta de hipersensibilidad o HR es la culminación de la cascada de señales que se produce una vez que la proteína R de la planta reconoce a la proteína Avr del patógeno (Dangl y Jones, 2006). Los cambios bioquímicos en la célula vegetal son drásticos, se produce el incremento de las reacciones de oxidación (estallido oxidativo) debido a la presencia de las especies reactivas del oxígeno, y activación de lipoxigenasas, se incrementa el movimiento de iones K^+ y H^+ a través de la membrana celular (Møller y Sweetlove, 2010). Además, se produce la

disrupción de la membrana y la pérdida de los compartimiento celulares. La pared celular se refuerza (lignina y suberina) y se le asocian compuestos fenilpropanoides y alcoholes aromáticos (Coll y col., 2011). Se activa temporalmente la actividad quinasa debido al daño tisular y al ácido salicílico, hay producción de compuestos de naturaleza fenólica como las fitoalexinas y las proteínas de la patogénesis PR ambas con función antimicrobiana (Coll y col., 2011).

1.8.4. Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).

Es un grupo muy diverso de proteínas que se encuentran en muy poca concentración en la planta en condiciones normales, sin embargo, durante el estrés biótico se producen en altas concentraciones provocando la toxicidad en el patógeno (Sels y col., 2008). Los órganos de la planta pueden producir diferentes tipos de proteínas PR, su localización puede ser intra o extracelular. Las proteínas PR se clasifican de acuerdo a su función, grupo serológico, peso molecular, secuencia de aminoácidos, etc. Son muy solubles en agua, con pH muy básicos o ácidos (Sels y col., 2008). Están descritas unas 14 familias, las más conocidas son las PR1 con función anti-fúngica y anti-*Oomycete*. Las PR2 presentan actividad glucanasa (β -1,3-glucanasas), las PR3 son quitinasas, PR4 anti-fúngicas y las PR6 son inhibidores de proteasas (Agrios, 2005). Otras proteínas PR son las de tipo taumatina, defensinas, tioninas, lisosimas, lipoxigenasas, proteínas ricas en cisteínas y glicinas, proteinasas, quitosanasas y peroxidasas. La inducción de estos genes está regulada por las concentraciones de SA (ácido salicílico), JA (jasmonato) y ET (etileno), (Agrios, 2005).

1.8.5. Los Inhibidores de proteasas en plantas.

Los organismos vivos han desarrollado diversos mecanismos de control de la actividad proteolítica, entre los que se encuentra la acción de los inhibidores de proteasas, muchos de los cuales, son de naturaleza proteica (Farady y Craik, 2010). En las plantas estas proteínas regulan las proteasas endógenas y a su vez interactúan con la batería enzimática de los fitopatógenos, contribuyendo a formar la primera línea de defensa en la inmunidad innata. Existe una base de datos de 95 inhibidores de proteasas con sus isoformas en mas de 129 especies de plantas que puede ser consultada en la dirección electrónica: <http://plantpis.ba.itb.cnr.it/>. Los inhibidores de proteasas se clasifican con un sistema de nomenclatura basado en su origen, estructura y mecanismo de acción, (Laskowski y Kato, 1980), además se toma en cuenta la existencia de varios dominios proteicos presentes con diferente especificidad por las proteasas. Sin embargo, la base de datos MEROPS presenta la agrupación más completa de estas proteínas que son agrupadas mediante familias y clanes según su secuencia de aminoácidos y su estructura proteica cristalizada en tres dimensiones (Rawlings y col., 2014). Los inhibidores de proteasas del tipo serino constituyen el grupo más conocido y mejor caracterizado hasta la actualidad (Rawlings y col., 2014) y de acuerdo al mecanismo o tipo de interacción estructural con la proteasa blanco, se clasifican en *serpinas* (del inglés: “*serine protease inhibitors*”), canónicos y no canónicos. Los inhibidores canónicos del tipo serino se unen a la enzima de forma similar al sustrato, el enlace puede ser hidrolizado y sintetizado nuevamente, sin que ocurran cambios en su estructura terciaria (Krowarsch y col., 2003). En las plantas los inhibidores del tipo serino son pequeñas proteínas que se encuentran en los tejidos de almacenamiento, tales

como: tubérculos, semillas y zonas aéreas de la planta. Estos se inducen cuando la planta es atacada por insectos u otros fitopatógenos (Habib y Fazili, 2007). La protección que le brindan al hospedero radica en su actividad anti-metabólica contra el proceso digestivo de los insectos fitófagos y en su capacidad para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, tales como: hongos, bacterias y virus (Habib y Fazili, 2007). En la familia solanácea se han descrito distintos tipos de inhibidores entre los que se encuentran los de papa tipo I y II. Estos han sido purificados y caracterizados bioquímicamente a partir de tubérculos de esta especie, generalmente son proteínas monoméricas sin puentes disulfuros y también se han descrito en tomate y en los exudados del floema de la calabaza (Dunse y col., 2010). Otras especies de solanáceas como *Nicotiana alata* presentan inhibidores de proteasas de bajo peso molecular y en las hojas de *Nicotiana tabacum* se ha informado la presencia de 6 isoformas de estas proteínas que se activan durante el daño tisular (Lay y Anderson, 2003). Por otra parte las especies como: *N. glutinosa*, *N. glauca*, *N. langsdorffii*, *N. sylvestris*, *N. attenuata*, *N. simulans*, *N. cavícola*, *N. hesperis*, *N. benthamiana* presentan inhibidores de proteasas bien caracterizados. Particularmente, en la especie *N. megalosiphon* se ha comprobado la presencia de un inhibidor del tipo serino-peptidasa II relacionado con los descritos en pimiento, perteneciente a la familia I 20, clan IA, (<http://plantpis.ba.itb.cnr.it/>).

1.8.6. Los inhibidores de proteasas y su importancia en la protección de plantas.

Los inhibidores de proteasas en las plantas han tenido aplicación práctica en la protección contra plagas de insectos tales como lepidópteros, hemípteros,

coleópteros, etc., (Dunaevsky y col., 2005). Los inhibidores de tripsina de la soya se han utilizado en el control de larvas de coleópteros del género *Tenebrio* que afectan a la especie *Tribolium confusum* (Habib y Fazili, 2007). El control de *Heliothis virescens* se ha logrado mediante la aplicación de un inhibidor de tripsina de la planta *Vigna radiata* en la dieta artificial de estas larvas (Dunaevsky y col., 2005). El control en plantación del lepidóptero *Spodoptera litura* sobre plantas de *Nicotiana tabacum*, se logró mediante la expresión de un inhibidor de tripsina de *Ipomoea batatas*, (Dunaevsky y col., 2005). Resultado similar se obtuvo sobre *Manduca sexta* en tabaco, pero con inhibidores de tripsina y quimiotripsina de *Solanum tuberosum* y *Solanum lycopersicum*, respectivamente (Lawrence y Koundal, 2002). Además, en estas plantas se ha expresado un gen de soya que codifica para un inhibidor de tripsina tipo Kunitz con actividad biológica contra las larvas de *Heliothis virescens* (Habib y Fazili, 2007). La inducción de resistencia a diferentes virus, tales como: TEV (virus del grabado del tabaco) y PVY (virus Y de la papa), en plantas de tabaco transgénicas se ha obtenido mediante la expresión de un inhibidor del tipo cisteíno-proteasa de arroz (Habib y Fazili, 2007). En *Nicotiana tabacum* se ha informado la presencia de dos inhibidores de proteasas (TIMP A y TIMP B) del tipo serino que se activan durante la reacción de HR frente al virus del Mosaico del Tabaco (VMT), (Heizt y col., 1993). Estos inhibidores mostraron actividad *in vitro* frente a 4 proteasas microbianas de bacterias y hongos fueron relacionados con la activación de proteínas PR y la presencia del SA (Geoffroy y col., 1990). Los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Sclerotium rolfsii* retardan su crecimiento frente a inhibidores del proteasas del tipo cisteína, previamente caracterizados, en cebada y malanga respectivamente (Carillo y col., 2011). Otras investigaciones informan que el inhibidor de tripsina y quimiotripsina

PT-1 de *Solanum tuberosum* presenta actividad biológica frente a la bacteria *Clavibacter michiganense* y contra los hongos *Candida albicans* y *Rhizoctonia solani* (Kim y col., 2005).

1.8.7. Herramientas moleculares de la genómica funcional y su aplicación en la interacción planta-patógeno.

La Genómica Funcional es un campo de la biología molecular que se propone utilizar la acumulación de datos producidos por los proyectos de secuenciación génica para describir las funciones e interacciones entre genes y proteínas (Schneider y Collmer, 2010). Utiliza principalmente técnicas de alto rendimiento para describir la abundancia de productos génicos como el ARNm y las proteínas. Algunas plataformas tecnológicas son:

- Análisis Seriado de la expresión génica, del inglés *SAGE* o *SuperSAGE*.
- Secuenciación de alto perfil (Illumina, Pirosecuenciación, etc).
- Amplificación de fragmentos de ADN en tiempo real o *QPCR*.
- Utilización de vectores virales para el silenciamiento y expresión temporal de genes (*VIGS*).
- Utilización de programas informáticos, aplicado al análisis de genes y proteínas (MEGA 5, BLASTn, Blast2go, Genbank, etc).

1.8.7.1. Análisis seriado de la expresión génica (*SuperSAGE*)

Es una de las técnicas de alto rendimiento de reciente uso por los fitopatólogos, para conocer la activación de los genes de la planta, frente al ataque de uno o varios patógenos (Matsumura y col., 2010). La técnica produce 26 pares de bases

(pb) de ADN que son el punto de partida del análisis de la expresión génica de un hospedante, en una determinada condición (Matsumura y col., 2003). En el caso mas sencillo, existe una interacción planta –patógeno de la cual se extrae el ARN mensajero (ARNm). Posteriormente se realiza una transcripción inversa donde se obtiene un ADN complementario (ADNc). Finalmente el ADNc es cortado en pequeños fragmentos de 26 pb mediante la utilización de la enzima EcoP151 tipo III del fago P1, con actividad endonucleasa (Matsumura y col., 2003). La novedad de esta técnica radica en que estos fragmentos, de ADN de 26 pb, representan la expresión, inactivación o invariabilidad de un gen durante la interacción, ya sea de la planta o el patógeno (Matsumura y col., 2008). La extensión del fragmento obtenido permite la anotación funcional de manera precisa de un gen determinado (Matsumura y col., 2005). Por ello, permite analizar la variación en la expresión del genoma completo, bajo una determinada condición. Además, se podría obtener la secuencia completa de un gen de interés, previamente analizado. Se obtiene la ventaja de poder analizar dos organismos a la vez, ya que la precisión en la anotación funcional permite discriminar entre los genes de la planta y los del patógeno (Matsumura y col., 2008). Es una técnica que se ha digitalizado y acoplado a otras plataformas biotecnológicas, como la secuenciación de alto rendimiento, el PCR en tiempo real, los microarreglos y el silenciamiento o expresión génica mediada por virus (Matsumura y col., 2010). Además, no es conocer las secuencias de los genes de interés, ya que la técnica de por sí, permite el descubrimiento de nuevos genes, (Matsumura y col., 2005).

1.8.7.2. Secuenciación del genoma a gran escala o de alto rendimiento (*Next Generation Sequence*).

Plataforma tecnológica basada en un alto procesamiento de muestras de ADN donde se utiliza un soporte sólido para amplificar y secuenciar de miles a millones de pares de bases (pb), (Knief, 2014). Esta secuenciación masiva es capaz de procesar mas de 600 giga-bases (gb) en un corto periodo de tiempo, por ejemplo, en 27 h se ha logrado secuenciar el genoma humano completo (Westermann y col., 2012). La utilización de la *Pirosecuenciación*, el *Illumina* y la secuenciación por ligación son tecnologías que aplican este principio, basadas en equipos de alta complejidad. Entre estas, el *Illumina* presenta mejores ventajas por su velocidad de procesamiento, costo de la secuencia 0.05-0.15 \$ y precisión, Aunque, el precio del equipo es elevado de 500000 a 700000 \$. Las lecturas que se obtienen son relativamente cortas entre 100 y 150 bases de extensión y en 10 días se logran obtener 6 genomas humanos, (Westermann y col., 2012). El *Illumina* utiliza un paso de clonación *in vitro* para generar muchas copias de cada molécula individualmente. Los fragmentos de ADN se unen a una superficie sólida que contiene los cebadores y se produce una amplificación o *PCR puente* (Westermann y cols., 2012). Posteriormente, se obtienen muchas copias de un solo fragmento de ADN que están físicamente aislados. Luego, se realiza una secuenciación en paralelo de todas las moléculas de ADN utilizando un terminador marcado con un colorante, que en este caso, será una base conocida, la cual se agrega a la nueva molécula por síntesis de su ADN complementario. Cada posición de la nueva base será registrada mediante fluorescencia, proporcionando así, la lectura de la molécula (Westermann y col., 2012). Las técnicas de alto flujo, como la secuenciación por *Illumina*, se han acoplado

digitalmente a otras, como el *SuperSAGE* (Matsumura y col., 2010). Diversos programas bio-informáticos como el *PERL* permiten la interpretación biológica de la expresión génica a partir del acople digital de las técnicas anteriores (Mount, 2004). En la actualidad, debido a la secuenciación de alto rendimiento y otros proyectos similares, se encuentran disponibles de bases de datos los genomas completos de diferentes especies de plantas entre ellos *N. tabacum*, *N. benthamiana*, *Solanum tuberosum* y otras solanáceas (*Sol Genomics Network*, <http://solgenomics.net>), (Fernández-Pozo y col, 2014).

1.8.7.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real. (PCR cuantitativa o PCR en Tiempo Real).

La clave en la PCR cuantitativa consiste en que el fragmento amplificado en cada ciclo puede ser detectado y cuantificado en el mismo instante de tiempo en el que está ocurriendo la técnica en cuestión. Para ello, se utilizan sustancias químicas fluorescentes que son llamados *reporteros*. Estas sustancias cuando se intercalan en el ADN amplificado permiten monitorear, en todo momento, la reacción de amplificación, lo cual representa su mayor ventaja con respecto a la PCR de punto final o normal (Costa, 2004). Una de sus aplicaciones más usadas consiste en la cuantificación de cambios en la expresión génica mediante la detección de los niveles del ARNm, procedente de interacciones entre los organismos (planta-patógeno). Las señales de fluorescencia, de las sustancias que se utilizan como *indicadores* son captadas por equipos ultrasensibles que generalmente llevan acoplado una computadora (Zipper y col, 2004). Estos programas generan un gráfico que modela la cinética de la reacción PCR (Costa., 2004). Las aplicaciones de esta técnica son disimiles en la fitopatología. Numerosos genes

de plantas que son inducidos en la respuesta a patógenos han sido caracterizados mediante PCR en Tiempo Real (Q-PCR). Las investigaciones de Zhang y Zaitling., 2008 revelan que el gen HSR203J de *Nicotiana langsdorffii* se expresa notablemente en la interacción incompatible con *P. hyoscyasmi* f.sp. *tabacina*, lo cual indica que es un gen relacionado con la defensa de la planta. Chacón y col., 2009, demostraron en *N. megalosiphon* la expresión de genes relacionados con la inmunidad innata frente a la infección de *P. nicotianae* mediante esta técnica.

1.8.7.4. Caracterización funcional de los genes de plantas mediante el silenciamiento o la expresión génica mediada por virus.

Es una técnica de la biología molecular que se utiliza para determinar el aporte funcional de un determinado gen o un grupo de ellos, frente a un genotipo o fenotipo dado. La esencia de la técnica consiste en utilizar a los virus que infestan las plantas como transportadores de estos genes modificados. Los genes que llevan estos virus, interactúan con el mecanismo de silenciamiento de la planta que se activa, debido a la presencia del gen sin modificaciones del hospedante, que posee homología de secuencia génica con el que lleva el virus (Lu y col., 2003). En pocas semanas, la planta a través de sus mecanismos defensivos, suprime la replicación directa del virus y degrada de forma específica el ARNm correspondiente al gen endógeno de la planta, que finalmente no puede expresarse (Ratcliff y col., 2001). Esta técnica permite la caracterización de fenotipos en relación con el gen, ya sea reprimido o sobre-expresado, además, ofrece un potencial para el silenciamiento de miembros múltiples e individuales de la familia de un gen (Lu y col., 2003). Los vectores virales más utilizados en los

estudios de interacción planta patógeno son el Virus del Mosaico del Tabaco (VMT), el Virus X de la Papa (PVX) y el TRV (Lu y col., 2003). Generalmente se utiliza la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* para transportar los virus hacia la planta, mediante un procedimiento llamado Agro-infiltración (Terahuchi y col., 2005). La planta modelo utilizada en estos experimentos es *Nicotiana benthamiana*, debido a sus características específicas para infestarse con los virus rápidamente (Terahuchi y col., 2005). El control de la eficiencia del silenciamiento se lleva a cabo con dos genes fundamentales, el gen *pds* que codifica para una enzima que evita la foto-oxidación de la clorofila (Fitoeno desaturasa) y el gen *chs*, que produce una proteína llamada Chalcona-sintasa relacionada con la coloración naranja de los carotenoides (Wani y col., 2010). La represión de estos genes produce un blanqueamiento o decoloración del pigmento verde en la planta (Wani y col., 2010; Baulcombe 2004; Lu y col., 2003).

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Construcción de bibliotecas de ADN complementario a partir de la interacción entre *Nicotiana megalosiphon* y *Phytophthora nicotianae*.

La construcción de la biblioteca experimental de ADN complementario se llevó a cabo mediante la inoculación del aislado patogénico de *P. nicotianae* PpnIIT 23 en 20 plantas de *N. megalosiphon*, con 42 días de edad. Posteriormente, se colectaron muestras de 0,3 g de hojas, tallos y raíces de estas plantas por un intervalo de tiempo de 1d, 3d y 7d. Las muestras anteriores, se unieron para purificar el ARN total de la interacción. Igual procedimiento se utilizó para la construcción de la biblioteca control, aunque las plantas no fueron inoculadas con el patógeno. El ARN total se extrajo de las dos bibliotecas utilizando el protocolo comercial *RNeasy* (Qiagen, Valencia, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se sintetizó una doble cadena de ADN complementario utilizando el cebador-adaptador oligo dT biotinilado (5'-bio-CTGATCTAGAGGTACCGGATCCCAGCAG(T)¹⁷-3'), (Matsumura y col., 2010). Luego, se utilizó la enzima *Nla* III para digerir la doble cadena de ADN biotinilada. Los fragmentos de la digestión enzimática fueron unidos a perlas de estreptavidina (*Dynabeads streptavidin* M-270). Posteriormente, se utilizó el adaptador-2 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGATCTAACGATGTACGCAGCAGCATG-3' y 5'-

La amplificación por PCR se llevó a cabo con el siguiente programa: 98°C, 60 s, 3-10 ciclos a 98°C por 30 s y 60°C, 30 s. Se utilizaron 8 tubos de esta amplificación de PCR (cada uno de 15 µl), los productos de PCR se concentraron utilizando el kit de reacción de purificación *MinElute* (Qiagen, Valencia, CA) y se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizado al 8%. El gel fue teñido con SYBR green (Takara Bio), y luego se procedió a cortar la banda de ADN producto de la amplificación (123-125 pb). Se estimó la concentración del previamente purificado mediante el equipo *Agilent Bioanalyzer 2100* y posteriormente, se utilizó el secuenciador de base sólida *Illumina Genome Analyzer II*. Las reacciones de secuencia utilizaron el cebador GEX (DpnII) siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura digital de las muestras se realizó mediante la clasificación suministrada por el programa informático GEP de la firma comercial GenX (Pro GmbH, Frankfurt am Main, Alemania).

2.2. Identificación de los genes que se activan durante la interacción de *N. megalosiphon* con *P. nicotianae* y que están relacionados con los inhibidores de proteasas en plantas.

El programa informático *Perl Scripts* se utilizó para determinar las secuencias únicas en ambas bibliotecas de ADN. Se tomó como criterio, el cálculo del factor de cambio o FC para cada gen, donde un valor superior a 2,5 significó la activación de este en la muestra experimental (Matsumura y col, 2010). El FC se define como la razón matemática entre los valores de la biblioteca experimental sobre la librería control para cada gen en particular. Se normalizó el número de datos obtenidos para un número de copias de 100000 por cada gen. Los genes de mayor FC fueron seleccionados para buscar en estos, los de mayor homología

de secuencias de ADN, con inhibidores de proteasas caracterizados en plantas. Para ello se utilizó el programa informático de alineamientos de secuencias de tipo local (BLAST). Las secuencias con valores inferiores a 10^{-5} se escogieron como homólogas a los genes de interés (Altschul y col., 1997). Posteriormente, se utilizó el programa informático BLAST2GO (<http://www.blast2go.org>) para realizar la anotación funcional de cada gen, relacionado con inhibidores de proteasas en plantas (Conesa y col., 2005). La activación de los ARNm relacionados con los inhibidores de proteasas, obtenidos en el *SuperSAGE* se comprobaron mediante la amplificación rápida del extremo 3' (3'-RACE-PCR) de sus ADN complementarios (ADNc), (Kairun y col., 2005). Para ello, se tomaron los fragmentos de 26 pb como cebadores, de las regiones del ADNc relacionados con los inhibidores de proteasas en plantas y el cebador con cola de timina, poliT, (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)¹⁷-3'), complementario al otro extremo del ADNc. El fragmento de ADN obtenido se separó en un gel de agarosa de 1,5%. Las bandas correspondientes se cortaron del gel y se purificó el ADN con el paquete comercial Qiaquick (QIAGEN, Hilden, Alemania). Los productos de PCR se secuenciaron por la vía de prisma de fluorescencia multicolor ABI, basado en sistema de análisis de ADN (Applied Biosystems), Foster City CA, USA). En todos los casos se utilizó como gen de referencia el 26S ARNr.

2.3. Análisis de la expresión de los genes activados durante la interacción en el tiempo y en los órganos de *N. megalosiphon*.

En un experimento independiente, 0,3 g de muestras totales de 20 plantas de *N. megalosiphon*, inoculadas previamente con *P. nicotianae* se colectaron durante 1d (24 h), 3d (72 h) y 7d (168 h). Paralelamente, fueron separadas muestras de 0,3 g

de las hojas, tallos y raíces de las plantas de *N. megalosiphon*, anteriormente infestadas con *P. nicotianae* y agrupadas por órganos a diferentes tiempos 1d, 3d y 7d. El ARN total de los tratamientos anteriores fueron purificados mediante el paquete comercial *RNase kit* (Qiagen, Valencia, CA). Posteriormente, se aplicó la técnica de PCR en tiempo real, en un primer caso, para analizar el comportamiento cinético de los ARNm relacionados con los inhibidores de proteasas en plantas, que fueron activados, con respecto al tiempo. En el segundo caso, fue seleccionado el ARNm que mayor activación y estabilidad temporal presentó, durante la interacción y se evaluó la expresión, en los distintos órganos de la planta, con respecto al tiempo (1, 3 y 7 días). El ADN complementario se sintetizó utilizando el cebador adaptador oligo dT (5'-CTGATCTAGAGGTACCGGATCCCAGCAG(T)¹⁷-3') utilizando, el paquete comercial de la reverso transcriptasa SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente, se utilizó la secuencia de 26 pb, resultante del *SuperSAGE*, como primer cebador, para obtener la secuencia completa del gen *nmimsp* mediante 3'-RACE RT-PCR, en combinación con el segundo cebador con cola de timina, poli-T (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC(T)¹⁷-3') complementario. El PCR en tiempo real cuantitativo se llevó a cabo en Rotor - *Gene 3000 PCR machine* (Corbett, Australia) con el equipo *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (Qiagen, Valencia, CA). Las condiciones para el PCR en tiempo real fueron: un paso inicial de desnaturalización a 95°C, por 15 min, seguido por una desnaturalización con 15 s a 95°C, luego una hibridación complementaria por 30 s a 60 °C y finalmente una extensión por 30 s a 72 °C durante 40 ciclos, los datos fueron analizados en el programa del Rotor - *Gene 3000* (Corbett, Australia). En el PCR en tiempo real se

utilizaron cinco réplicas por cada muestra y los experimentos se realizaron por duplicado.

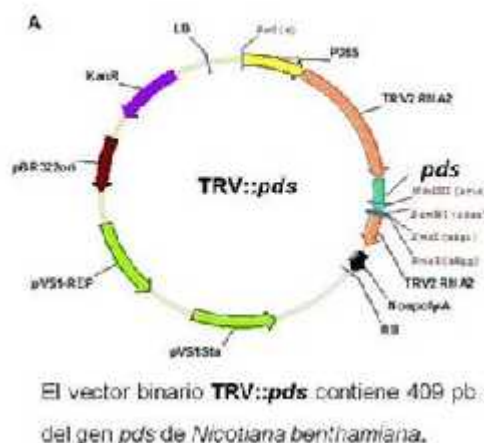
2.4. Caracterización molecular (filogenia y bioquímica) de la proteína NmIMSP mediante programas bioinformáticos.

El alineamiento múltiple de secuencias proteicas, relacionadas con los inhibidores de proteasas en plantas, se realizó mediante los algoritmos del sub-programa *CLUSTAL W* (Thompson y col., 1994). La obtención de las distancias genéticas y la generación del árbol filogenético con su tipología, fueron realizados con los programas informáticos de agrupamiento de secuencias, *Vecinos Cercanos* (del inglés, *Neighbour-Joining*, (NJ)), (Saitou y Nei, 1987) y *MEGA*, versión 4 (del inglés, *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), (Tamura y col., 2007). La matriz de distancias evolutivas se calculó usando el modelo de dos parámetros de Kimura (1980). Se realizó un análisis de re-muestreo (en inglés, *bootstrap*) (Holmes, 2003) con 1 000 réplicas para asignar el apoyo estadístico a los distintos agrupamientos, a partir de los datos del análisis tipo *NJ*. Las predicciones del péptido señal, posible función biológica, punto isoeléctrico, peso molecular y localización celular fueron realizadas mediante los algoritmos del programa informático *Signal P* versión 4, (Petersen y col., 2011).

2.5. Pérdida en la función del gen *nmimsp*. Silenciamiento génico mediado por el virus TRV en *Nicotiana megalosiphon*.

Se procedió a inactivar la expresión del gen *nmimsp* en *N. megalosiphon* mediante silenciamiento génico mediado por TRV (tobacco rattle virus), (Ratcliff y col, 2001). El ADNc de *nmimsp* se amplificó del ARNm de *N. megalosiphon* con los siguientes cebadores, 5'- CCCGGGATACCGCTAACGGCGAGAGA-3'; 5'-

CTGCACGTTTCGTTAGCTTCG-3'. La banda de ADN fue digerida con la enzima *Sma*I. Un fragmento del ADN anterior de 150 pb se insertó en idéntico sitio de restricción enzimática del vector binario de *Agrobacterium tumefaciens* *pGreenII 0000* (Hellens y col., 2000), donado gentilmente por el Dr. David Baulcombe (Universidad de Cambridge) y se nombró *TRV::nmimsp*. El vector *pGreenII 0000* contiene la partícula viral ARN 2 del virus TRV, donde se encuentran los genes estructurales que conforman el virus TRV. Además, se utilizó el vector binario *pBINTRA6* que contiene la ARN polimerasa dependiente de ARN y constituye la partícula viral 1 (ARN 1) del virus TRV (Hellens y col. 2000). La efectividad del silenciamiento se llevó a cabo mediante la construcción genética *TRV::pds*, donada gentilmente por el Dr. David Baulcombe. La enzima Fitoeno Desaturasa es esencial en la función de la clorofila. El silenciamiento de *pds* produce una decoloración del pigmento clorofílico en la planta donde las zonas verdes se deben observar blanquecinas (Ratcliff y col 2001). La cepa *A. tumefaciens* GV3101 se transformó individualmente mediante electroporación con las construcciones *TRV::nmimsp*, *TRV::pds*, (Figura 6) y el vector binario *pBINTRA6* (Lu y col., 2003).



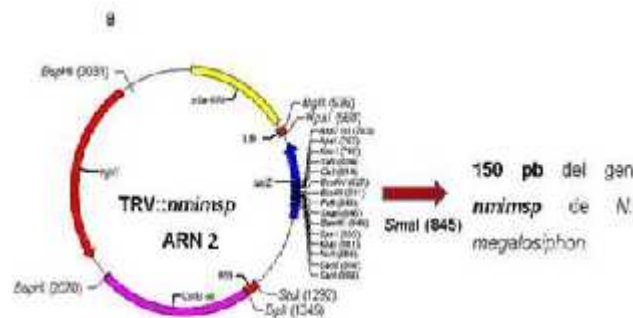


Figura 6 A y B. Vectores binarios TRV::*pds* y TRV::*nmimsp* utilizados en el silenciamiento.

2.5.1. Agroinfiltración de las plantas de *N. megalosiphon* con los vectores binarios de TRV.

Un total de 30 plantas de *N. megalosiphon* fueron utilizadas para cada uno de los siguientes tratamientos de agroinfiltración. **Agroinfiltración 1**, cepa 1 de *A. tumefaciens* (GV3101) transformada con el vector TRV::*pds* y la cepa 2 de *A. tumefaciens* (GV3101) transformada con el vector *pBINTRA6*. **Agroinfiltración 2**, cepa 1 de *A. tumefaciens* (GV3101) transformada con el vector TRV::*nmimsp* y la cepa 2 de *A. tumefaciens* (GV3101) transformada con el vector *pBINTRA6*. Las cepas transformadas de *A. tumefaciens* fueron incubadas en 50 ml de medio Luria Bertani (LB) suplementado previamente con antibióticos (50 ug/ml Kanamicina, 25 ug/ml Gentamicina), 20 mM de Acetosiringona y 10 mM de MES(2-(4-Morfolono) Ácido etano-sulfónico). El cultivo creció durante 12 h a 28°C, en agitación a 50 rpm. Posteriormente, se realizó una centrifugación a 4000 rpm durante 5 min y fue desechado el sobrenadante. Las células se homogenizaron en 100 ml de tampón

de infiltración (10 mM de $MgCl_2$, 10 mM de MES, 200mM de Acetosiringona). Se ajustó la densidad óptica (D.O) en 1,5 a 600 nm con espectrofotómetro (*Fujitsu, Japan*) y fueron mezcladas las suspensiones bacterianas a razón de 1:1 (Ratcliff y col., 2001). Las mezclas se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente antes de la agroinfiltración. Las plántulas de *N. megalosiphon* con un total de 6 hojas (cotiledones) fueron inoculadas con 300 μ l de la mezcla bacteriana de las cepas de *A. tumefaciens* (GV3101). La inoculación se realizó en el envés de las hojas con una jeringuilla de 2 ml de volumen total, sin aguja presionando, el tejido vegetal, sin dañarlo (Ratcliff y col., 2001). La concentración del ARNm del gen *nmimsp* se monitoreó mediante PCR en tiempo real, con igual procedimiento que en la sección anterior. Las plantas de *N. megalosiphon* que no expresaron el gen *nmimsp* fueron escogidas para la evaluación de la resistencia a *P. nicotianae*.

2.5.2. Evaluación de la prueba de resistencia a *P. nicotianae* en las plantas de *N. megalosiphon* silenciadas en el gen *nmimsp*.

Se utilizó el aislado de *P. nicotianae* **PpnIIT23** de la raza 0, identificado previamente en el Instituto de Investigaciones del Tabaco mediante la clave taxonómica de Erwin y Ribeiro, (1996). Se utilizaron placas de Petri con medio de cultivo V8 para inocular e incubar el aislado PpnIIT23, durante 10 d a 27 °C. Posteriormente, se extrajo asépticamente un ponchete circular de 5 mm de diámetro con micelio del aislado mediante un palillo estéril de madera de 80 mm de longitud y 30 mm de diámetro. Placas de Petri con medio sintético Agar, Papa y Dextrosa fueron inoculadas con estos ponchetes para el crecimiento del aislado PpnIIT23. El palillo con los ponchetes y el aislado en crecimiento activo fueron utilizados en la inoculación de las plantas. El ponchete se colocó en los tallos de

las plantas (de 6 semanas de edad) a 3 cm de la base del sustrato (Sullivan y col., 2005). Se estableció una temperatura de 30 °C durante 10 d en condiciones controladas de casas verdes, para la posterior evaluación de los síntomas. Se utilizaron como controles del experimento plantas de *N. megalosiphon* (15) no silenciadas genéticamente y plantas (15) de *Nicotiana tabacum* var. Sumatra, cultivar muy susceptible a la enfermedad pata prieta. La evaluación de la prueba de resistencia a la enfermedad se realizó con un total de 15 réplicas. Se utilizó la escala de Csinos, (1999) para estimar las lesiones en el tallo ocasionadas por *P. nicotianae*. La misma, consta de 10 unidades, donde 1; significa una planta sin afectación, 5; una planta afectada en un 50 % y 10; una planta totalmente destruida. Los datos generados por las pruebas de resistencia a *pata prieta* se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple con el programa bioestadístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, California, 2012). Las diferencias significativas entre las medias se determinaron con una prueba de Rango Múltiple de Duncan estimando una probabilidad (P) < 0,01.

2.6. Ganancia temporal de la función del gen *nmimsp* mediada por el virus PVX en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

Se procedió a expresar el gen *nmimsp* en plantas de *N. benthamiana* mediante el vector viral *pgR106* (donado gentilmente por el Dr. David Baulcombe), derivado del PVX (Potato X Virus), (Ratcliff y col., 2001). El gen completo *nmimsp* se amplificó a partir del ADN de *N. megalosiphon* con los cebadores 5'-GGATCCATGGTGAAGTTCGCGCACGTGGTGGC-3' y 5'-GAGCTCTTACCCACCTGCGGCGTCTGC-3'. El gen se insertó entre los sitios

de restricción enzimática *Bam*HI y *Sac*I del *pgR106* (Figura 7). La construcción genética se nombró PVX::*nmimsp*. Se utilizó el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (*gfp*) para corroborar la eficiencia de la expresión temporal; utilizando *pgR106* (Lu y col., 2003). El gen *gfp* (717 pb) se amplificó del plásmido comercial psfGFP-pBAD (Addgene, Cambridge, UK) con los cebadores 5'-GGCGCGCCAACTTTAAGAAGGAGATATACAT-3' y 5'-GCCGTACCTGCTCGACATGTTCATTCGCCGGCG-3'. El fragmento de ADN se insertó en el vector viral *pgR106* entre los sitios de corte enzimáticos *Not*I y *As*I, la construcción se nombró PVX::*gfp* (Figura 7). Las cepas de *A. tumefaciens* LB 4404 con el plásmido *pSoup* fueron transformadas por electroporación con las construcciones genéticas PVX::*nmimsp* y PVX::*gfp* individualmente (Hellens y col., 2000).

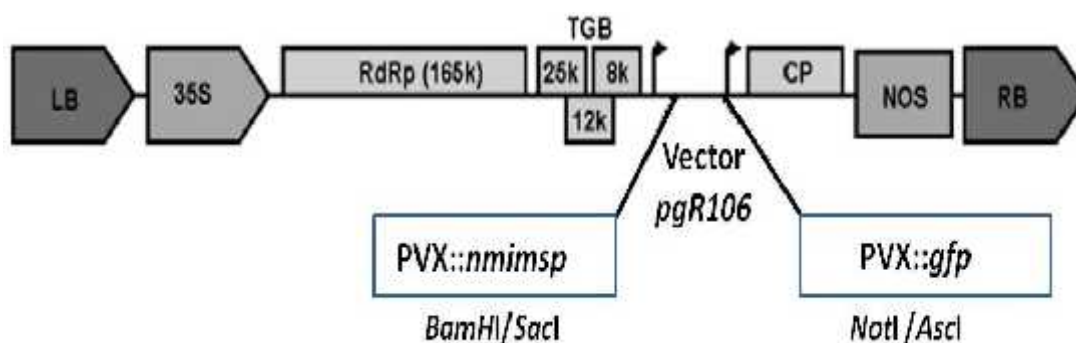


Figura 7. Vectores binarios PVX::*nmimsp* y PVX::*gfp* utilizados en el experimento de expresión temporal.

2.6.1. Expresión del gen *nmimsp* en *Nicotiana benthamiana* mediante el virus PVX.

Se procedió con el mismo protocolo de agroinfiltración utilizado en el acápite 2.5.1. Las construcciones genéticas que se agroinfiltraron fueron la cepa de *A.*

tumefaciens LB 4404 (*pSoup*) con el vector PVX::*nmimsp* o con PVX::*gfp*. Se utilizaron un total de 20 plántulas de *N. benthamiana* por construcción, con el mismo procedimiento de inoculación en el envés de la hoja y con los tampones de infiltración mencionados en el acápite 2.5.1 (Ratcliff y col., 2001). La expresión relativa del gen *nmimsp* se monitoreó después de los 15 d de agroinfiltración mediante PCR en tiempo real. Se evaluó la expresión del gen *nmimsp* en las plantas de *N. benthamiana* con las construcciones PVX::*nmimsp*, PVX::*gfp* y sin agroinfiltrar. Se purificó en ARN total de 0,1g de hojas *N. benthamiana* mediante el paquete comercial RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Posteriormente, el ADNc se sintetizó a partir de 5 ug de ARN utilizando los cebadores 5'-GGATCCATGGTGAAGTTCGCGCACGTGGTGGC-3' de *nmimsp* y el cebador oligo poli-(dT) del paquete comercial de Transcriptasa Inversa *SuperScript III* (Invitrogen, Carlsbad, CA). El programa del PCR en tiempo real cuantitativo se llevó a cabo en Rotor - Gene 3000 PCR machine (Corbett, Australia) con el *QuantiTect SYBR Green* PCR paquete comercial (Qiagen, Valencia, CA). Las diferencias significativas en la expresión del gen *nmimsp* fueron estimadas mediante el análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, con el programa bioestadístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, California, 2012). Las diferencias significativas entre las medias se determinaron con una prueba de Rango Múltiples de Duncan para una probabilidad (P) < 0,01.

2.6.2. Evaluación de la prueba de resistencia frente a *P. nicotianae* en plantas de *N. benthamiana* expresando el gen *nmimsp*.

El procedimiento de preparación del aislado de *P. nicotianae* PpnIIT23, el proceso de inoculación en las plantas de *N. benthamiana* y la evaluación de los daños de

la enfermedad mediante la escala de 1 a 10 de Csinos, (1999) se realizó de la misma forma que en lo descrito en el acápite **2.5.2**. Sin embargo en este caso se utilizaron un total de 20 plantas, de 6 semanas de edad, (inoculadas previamente con el patógeno) por cada construcción agroinfiltrada (PVX::*nmimsp* y PVX::*gfp*) y la especie sin agroinfiltrar (fenotipo normal).

2.6.3. Evaluación de la prueba de resistencia frente a *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* en plantas de *N. benthamiana* expresando el gen *nmimsp*.

El aislado de *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* (**PhtII324**) se conservó en hojas de *Nicotiana tabacum* var *Corojo Tradicional* durante la campaña 2013-2014. Plántulas de este cultivar, de 15 a 20 días de sembradas, se trasplantaron a pequeños pots plásticos de 7 x 7 x 10 cm, previamente preparados con suelo estéril y se mantuvieron a una temperatura entre los 16 °C y 18 °C, un fotoperiodo de 12 h y una humedad relativa superior al 95%. Se inocularon las hojas de este cultivar susceptible con 10 µl de una suspensión de esporangios de 10⁴ esporas/ml, ajustada previamente, en una cámara de Neubauer y se mantuvo de esta forma el aislado monospórico, hasta su utilización posterior. El inóculo resultante se extrajo con pincel estéril, se ajustó la concentración a esporas a 10⁴ esporas/ml y se procedió a infestar hojas de plantas de *Nicotiana benthamiana*, en condiciones controladas (Borrás-Hidalgo y col., 2006). Un total de 10 plantas de *N. benthamiana* (6 semanas de edad) se inocularon con 10⁴ esporas/ml del aislado PhtII324, después de los 15 d de agroinfiltración, con las construcciones (PVX::*nmimsp*, PVX::*gfp*) y las plantas control (sin agroinfiltrar). La severidad de la enfermedad se estimó mediante la evaluación del periodo de incubación del

patógeno, a los 10 d después de la inoculación. Se utilizó la escala de 0 a 4 utilizada por Reuveni y col., (1986), donde 0 representó una hoja sin lesiones, 1; lesiones cloróticas amarillas < 25%; 2, clorosis >25 % y < 51%; 3; lesiones cloróticas >51% y < 74%; 4, lesiones >75%-100%. Los datos generados por las pruebas de resistencia a *P. hyoscyasmi* f. sp. *tabacina* se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple con el programa bioestadístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, California, 2012). Las diferencias significativas entre las medias se determinaron con una prueba de Rango Múltiple de Duncan estimando una probabilidad (P) < 0,01.

2.7. Inmuno-detección por electrotransferencia (*Western Blot*) de la proteína NmIMSP en extractos vegetales de *Nicotiana benthamiana* que expresan el gen *nmimsp*.

El vector binario pG-PVX-6His (Donado gentilmente por el Dr. David Baulcombe) se utilizó para insertar el gen *nmimsp* en el sitio enzimático de restricción *Sal* I - *Not* I. El gen *nmimsp* se fusionó a una cola de 6 histidinas (Avesani y col., 2007) y a la construcción se le nombró PVX-6His-*nmimsp*. Esta, se agroinfiltró en una planta de *N. benthamiana* con el mismo procedimiento utilizado en el acápite 2.6.1. Las proteínas totales se procesaron mediante la homogeneización del tejido vegetal (0,5 g de hojas), en presencia de tampón de extracción de proteínas (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerol 25%, SDS 2%, DTT 350 mM), (Giavalisco y col, 2003). Luego se procedió a una centrifugación a 13000 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante se colectó en un nuevo tubo. Posteriormente, se estimó la concentración total de las proteínas, Bradford, (1976) y se realizó una corrida electroforética de proteínas (20 ug) en un gel al 7 % de poliacrilamida, Laemmli,

(1970). Se utilizaron como control, las proteínas totales de *N. benthamiana* de fenotipo salvaje. Una corrida en paralelo se realizó con Azul Coomassie para observar la separación de las proteínas totales. Posteriormente, se realizó el *Western Blot* y para ello se llevó a cabo la transferencia de las proteínas de la corrida anterior a una membrana de nitrocelulosa, (Towbin y col., 1979), mediante un equipo *Trans-blot Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio- Rad, Hercules, CA, USA). La proteína NmIMSP con cola de histidina se detectó mediante un anticuerpo monoclonal anti-histidina AD1.1.10, Sigma-Aldrich (1:5000). Un segundo anticuerpo anti-conejo IgG conjugado con peroxidasa de rábano, Sigma-Aldrich, (1:5000), se utilizó para visualizar la fusión proteica.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Construcción de bibliotecas de ADN complementario a partir de la interacción entre *Nicotiana megalosiphon* y *Phytophthora nicotianae*.

Se obtuvo una biblioteca control de ADNc utilizando el hospedero *N. megalosiphon* en ausencia del patógeno. Otra biblioteca, llamada experimental, se obtuvo del ADNc sintetizado a partir de la interacción entre *N. megalosiphon* y *P. nicotianae*. El perfil de expresión obtenido permitió analizar un total de 2,864,417 secuencias (Tags) entre las dos bibliotecas. En la biblioteca control fueron obtenidas 1,437,878 y en la experimental 1,426,539. Un total de 726,251 secuencias resultaron exclusivas (Unitags), de ellas se encontraron 339,230 en la biblioteca control y 387,021 en la experimental (Tabla 1).

Tabla 1. Representa el número de genes activados o silenciados en las dos librerías; control y experimental mediante *SuperSAGE*.

Librerías	Librería Control	Librería experimental	Total
"Tags" secuenciados	1,437,878	1,426,539	2,864,417
Secuencias exclusivas de cada librería (UniTags)	339,230	387,021	726,251

Las secuencias únicas o exclusivas (UniTags) en la biblioteca experimental representaron aquellos genes que mostraron un cambio significativo en su expresión. En la actualidad existen herramientas moleculares que permiten

monitorear los genes regulados positiva y negativamente en un hospedante determinado durante su interacción con un fitopatógeno. Dentro de estas técnicas se encuentra el análisis seriado de la expresión génica (*SuperSAGE*), (Matsumura y col., 2005) la cual basa su principio de funcionamiento en obtener valores de cuantificación absoluta de un fragmento de 26 pb de ADNc. Estos pequeños fragmentos representan la expresión de genes bajo una determinada condición y en un tiempo dado. Lo que permite comprobar en cuando los genes, condiciones bióticas o abióticas, cambian el perfil de expresión y por tanto, cuáles de estos, podrían ser decisivos en la aparición de un determinado carácter o fenotipo. En este caso, la búsqueda del perfil de expresión se realizó sobre los genes de *Nicotiana megalosiphon* en interacción con *P. nicotianae*. Los resultados de la librería experimental demostraron que un total 21676 cambiaron su perfil de expresión notablemente, en comparación con la librería control. Esta es una cifra mayor de genes que la obtenida en la interacción de *Oryza sativa* y *Magnaphorte grisea*, analizada por *SuperSAGE*, (Matsumura y col., 2008). En esta, se obtuvo un total de 12119 secuencias específicas. Una cifra inferior (806 UniTags) se obtuvo de la interacción entre *Solanum tuberosum* y *Pythophthora infestans* utilizando el mismo protocolo de investigación (Draffent y col., 2013). En otro tipo de interacciones, como los abordados por Gilardoni y col., (2010), se analizaron los cambios que se produjeron en la expresión génica de las hojas de *N. attenuata* frente a las larvas de *Manduca sexta*. En esta interacción se obtuvieron 547 genes en total, caracterizando con ello, la respuesta defensiva y temprana de la planta, en presencia de las proteínas efectoras del insecto (Gilardoni y col., 2010). Sin embargo en los trabajos de Matsumura y col.,(2010) se produjeron 31 bibliotecas de ADNc entre diferentes interacciones, las cuales analizaron diversos

tejidos vegetales, hojas, plántulas, semillas, órganos sexuales de plantas, fitopatógenos, tejido embrionario de peces, etc. En este caso, se obtuvo un conteo masivo de 13 millones de secuencias específicas entre los organismos involucrados. El número de genes afectados depende de varios factores, primero, la interacción involucra dos organismos que expresan su genoma en dependencia de su relaciones inter-específicas, cada interacción es única para la técnica en cuestión (Matsumura y col., 2005). Además, el tiempo en el que se acumula o produce el ARNm de ambos organismos es determinante en la expresión, inactivación o invariabilidad de los genes. Por otra parte, hay patógenos que comienzan a infestar y colonizar tejidos desde las 24 h, sin embargo, otros requieren más tiempo, por tanto los mecanismos de defensa de la planta se activarán en dependencia de los mecanismos de infección de cada patógeno, (Egan y Talbot, 2008). La longitud del fragmento de 26 pb que se produce con la aplicación del *SuperSAGE* permite la asignación funcional de genes en las bases de datos de forma precisa, para cada una de estas secuencias (Matsumura y col., 2003). Otras técnicas antecesoras como el *SAGE* o el *LongSAGE* presentan la desventaja de que al producir una secuencia más corta de ADNc (8 y 14 pb) respectivamente, la asignación funcional de los genes presenta una mayor probabilidad de error.

3.2. Identificación de los genes que se activan durante la interacción de *N. megalosiphon* con *P. nicotianae* y que están relacionados con los inhibidores de proteasas en plantas.

Un total de 1301 genes fueron regulados positivamente durante la interacción de *N. megalosiphon* y *P. nicotianae*. En todos los casos el factor de cambio (FC) de

los genes escogidos fue superior a 2,5. Sin embargo, solo 5 genes (ADNc) o secuencias específicas (Tags) fueron relacionados directamente con proteínas relacionadas con inhibidores de proteasas de plantas de acuerdo a la asignación funcional realizada con el programa informático Blast2GO (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias específicas de ADNc que representan los genes que se activan en la interacción y están relacionados con inhibidores de proteasas en plantas. En color rojo se destaca el Tag 49066 por presentar el mayor valor de FC (44,7).

Secuencia (26 pb) específica de los "Tag" o genes relacionados con los inhibidores de proteasas en planta.	Cantidad absoluta del ADNc o "Tag"*		Factor de Cambio FC
	Muestra Control	Muestra experimental	
Tag_32716 CATGTATTAATCCATTATTGGTGAT	16.5	54.2	3.2
Tag_14613 CATGGCCAGAACTTATTGGTGTACCA	45.3	217.0	4.7
Tag_78459 CATGTCTCAGTCCGATGGTTGCCAG	4.1	43.4	10.5
Tag_2318 CATGTACTCCATTGTTTGCGATAAA	272.3	4594.0	16.8
Tag_49066 CATGGAACGTTAACCATACAGCTCC	8.2	368.9	44.7

*

Las bibliotecas se normalizaron a 100,000 "tags". El Factor de Cambio o FC en cada muestra se calculó dividiendo el número de "tags" en la muestra experimental por el número de "tags" de la muestra control.

El Tag_49066 mostró el mayor valor de FC= 44,7 y con ello la mayor activación en la expresión de los genes que se encuentran relacionados con inhibidores de proteasas en plantas. En orden decreciente, continúa el Tag_2318 con un FC=16,8. Luego, le siguen los Tags 78459, 14613 y 32716 con valores de FC de 10,5; 4,7 y 3,2 respectivamente, mostrando los valores más inferiores de activación durante la interacción (Tabla 2).

Los resultados obtenidos en el *SuperSAGE* fueron corroborados en el experimento del 3'-RACE-PCR (Figura 8). Sin embargo, los Tags 14613 y 2318 presentaron una señal muy débil en la librería experimental. Los Tags 32716 y 78459 presentaron una señal muy fuerte en las dos librerías sin embargo las

diferencias entre ellas son escasas. El Tag 49066 presentó diferencias notables en cuanto a su expresión, pues esta fue mayor en la biblioteca experimental que en la control, lo cual evidencia la fuerte activación de este gen durante la interacción. La expresión del gen 26 ARNr fue constitutiva y constituyó el gen de referencia durante el experimento (Figura 8).

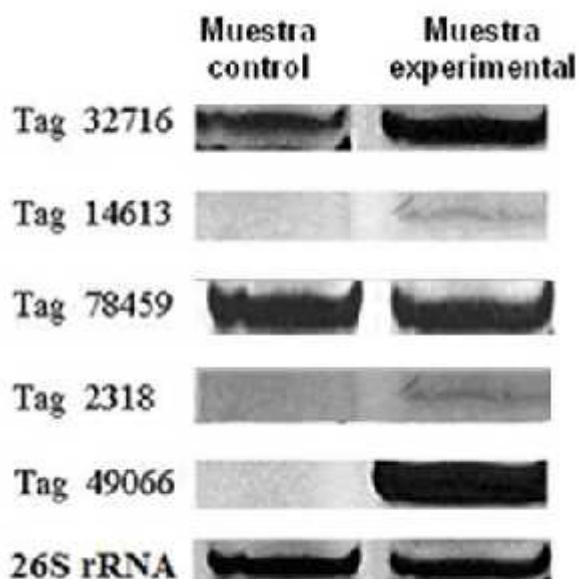


Figura 8. Bandas de ADN del 3'-RACE-PCR mostrando los niveles de expresión de los Tags relacionados con los inhibidores de proteasas en las dos bibliotecas previamente obtenidas por *SuperSAGE*. Se utilizó como control el gen 26S del RNA de plantas

Una población de ADNc de 26 pb se obtuvo mediante *SuperSAGE* a partir de la interacción *N. megalosiphon-P. nicotianae*. Se buscaron, específicamente, aquellos genes que codificaron para inhibidores de proteasas; ya que son biomoléculas que se expresan en la resistencia poligénica de la planta. La precisa anotación funcional que permitió el *SuperSAGE* estuvo determinada por la longitud del ADNc obtenido de 26 pb (Matsumura y cols., 2003). Los Tags. 32716, 2318, 78459, 14613 y 49066 fueron relacionados, inequívocamente, con

inhibidores de proteasas descritos en plantas y que se encuentran en la base de datos *MEROPS* y *UNIPROTKB* (Rawlings y col., 2015, UniProt Consortium, 2010). El factor de cambio o $FC > 2,5$ permitió identificar los genes que se activan o son regulados positivamente por la planta cuando interactúa con *P. nicotianae*. En otras interacciones se ha utilizado este criterio que representa el número de copias del gen en una condición determinada, con respecto a su estado normal. La interacción de *Arabidopsis thaliana* y *Alternaria brassicicola* demostró la activación de 35 genes relacionados con la resistencia en la planta mediante análisis de la expresión génica (Shenk y col., 2003). Las investigaciones realizadas sobre el ADNc (transcriptoma) obtenido de la infección de *Fusarium oxysporum* en *A. thaliana* reveló un total de 571 genes regulados positivamente, y relacionados con la defensa del hospedante (Zhu y col., 2012). La variación en el potencial de membrana celular en *Arabidopsis thaliana* por las infecciones de *Spodoptera littoralis*, *Myrzus persicae* y *Pseudomonas syringae* se relacionó con los cambios detectados en la expresión génica en este hospedante (Bricchi y col., 2013). Los genes que se activaron en estas interacciones presentaron un factor de cambio superior a 2,5; con respecto a *S. littoralis* se informaron 190 genes, 1840 frente a *M. persicae* y 416 en relación a *P. syringae* (Bricchi y col., 2013). En los trabajos de Gilardoni y col., (2010) se analizaron los cambios que se produjeron en la expresión génica de las hojas en *N. attenuata* frente a larvas de *Manduca sexta*. En esta interacción se identificaron 430 genes regulados positivamente, caracterizando la respuesta defensiva y temprana de la planta en presencia de las proteínas patogénicas del insecto Gilardoni y col., (2010). Aunque los genes que fueron regulados negativamente ($FC < 0,4$) en *N. megalosiphon* no fueron un objetivo directo en esta investigación, se debe

destacar de forma general, su importancia biológica en el resultado final de las interacciones con el patógeno. Debido a que su regulación también determina la susceptibilidad o la resistencia de la planta. Por ejemplo, en interacciones incompatibles de *P. nicotianae* con *N. tabacum*, los genes que intervienen en el estrés oxidativo de la planta y que codifican para catalasas de función protectora son inactivados o silenciados (Blackman y Hardham., 2008). De la misma forma, la expresión de genes que codifican para proteínas quinasas en *N. tabacum* se inactiva durante la interacción compatible con el hongo *Rhizoctonia solani* (Borrás y col., 2012). Incluso, los genes de la fotosíntesis disminuyen notablemente su expresión en las hojas de *N. benthamiana* en presencia de la proteína efectora INF1 de *Phytophthora infestans* (Matsumura y col., 2003) y se inactivan prácticamente durante la interacción de *Solanum tuberosum* con *P. infestans* (Gilardoni y col., 2013; Bilgin y col., 2010). Además, no se debe obviar la expresión génica del patógeno, que no fue analizada en este trabajo, sin embargo, la regulación de sus genes y el producto de estos, modularán los mecanismos de percepción, reconocimiento y respuesta de defensa en la planta (Petre y Kamoun, 2014).

3.3. Análisis de la expresión de los genes activados durante la interacción en el tiempo y en los órganos de *N. megalosiphon*.

Los Tags relacionados con los inhibidores de proteasas en *N. megalosiphon* se activan 1d después de haber inoculado el patógeno (Figura 9). Sin embargo, el Tag_49066 presentó una activación mucho mayor que el resto. Un día después de haberse iniciado la interacción, la expresión relativa del Tag_49066 fue significativamente mayor. A los 3d y hasta los 7d posteriores a la inoculación con

el patógeno, la expresión se mantuvo constante mostrando las mismas diferencias significativas, lo cual demuestra su activación estable en el tiempo. El resto de los Tags presentaron un comportamiento similar, el primer día experimentaron una activación (significativamente menor que el Tag 49066) sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Posteriormente se aprecia una disminución notable en los niveles de expresión entre los 3 d y hasta los 7 d de evaluación. (Figura 9).

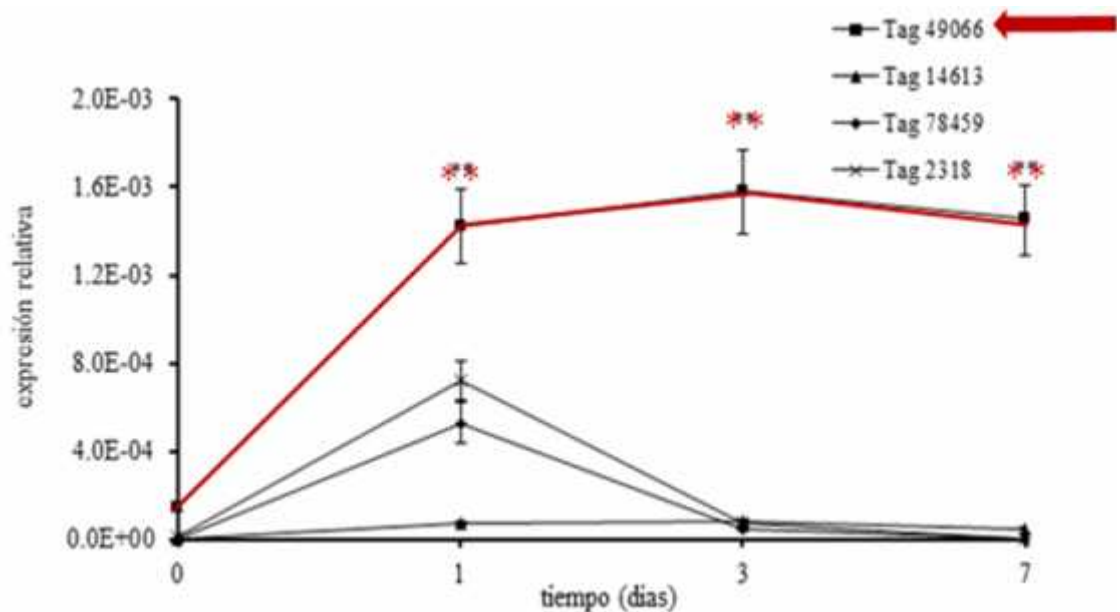


Figura 9. Gráfico que muestra la expresión relativa en el tiempo de los Tags (muestras totales) seleccionados en plantas de *N. megalosiphon* relacionados con inhibidores de proteasas plantas inoculadas con *P. nicotianae*. Las barras representan el error estándar de la media (N=5; +/- DE). Las diferencias significativas fueron determinadas por ANOVA **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$; NS: no significativo. GraphPad Prims Software Inc. (La Jolla, CA, USA).

Se seleccionó el Tag 49066 para la evaluación de su expresión en los diferentes órganos de la planta ya que presentó una activación estable y constante en el tiempo, después de la inoculación con el patógeno en *N. megalosiphon*. Los

niveles de expresión relativa del Tag 49066 resultaron significativamente mayor en las hojas que en tallos y raíces, un día después de la inoculación con el patógeno. Sin embargo, los niveles de expresión en tallos y raíces aumentaron desde los 3 d y hasta los 7 d mientras que los niveles en las hojas se mantuvieron estables. Por tanto, a partir de los 3 d los niveles de expresión en los órganos de la planta no mostraron diferencias significativas y se pueden considerar sistémico (Figura 10).

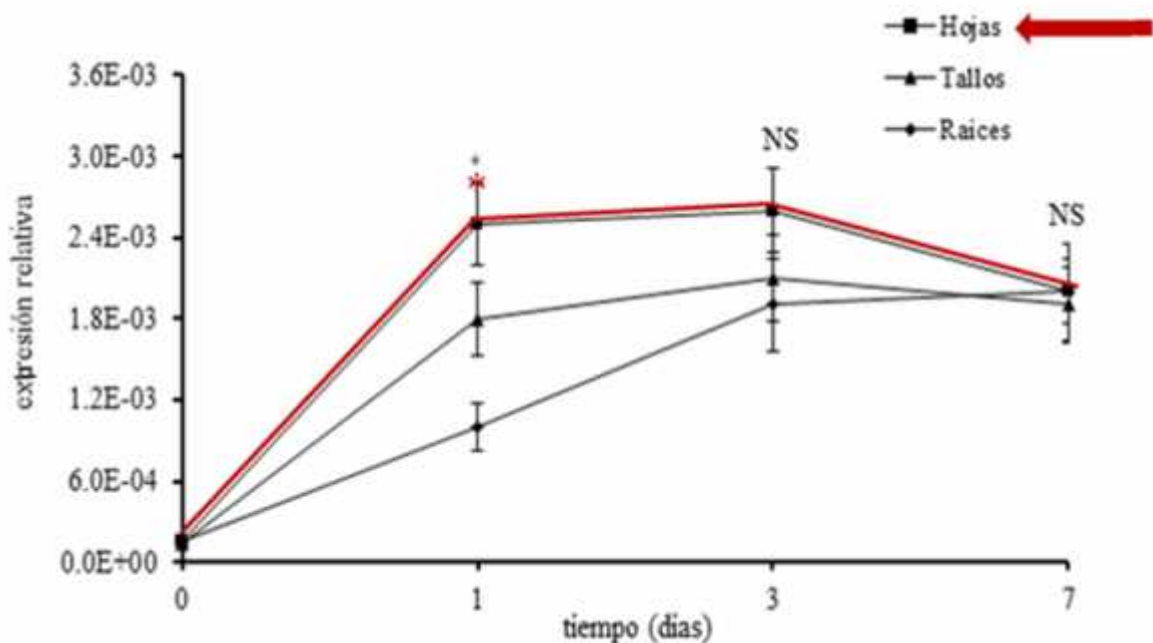


Figura 10. Gráfico que representa la expresión relativa en el tiempo del Tag 49066 en los diferentes órganos de la planta de *N. megalosiphon* previamente inoculadas con *P. nicotianae*. Las barras representan el error estándar de la media (N=5; +/- DE). Las diferencias significativas fueron determinadas por ANOVA **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$; NS: no significativo. GraphPad Prims Software Inc. (La Jolla, CA, USA).

Los Tags 32716, 2318, 78459, 14613 y 49066 fueron relacionados con inhibidores de proteasas descritos en plantas, sin embargo, 49066 mostró niveles de expresión constantes durante el tiempo de evaluación y además, pudo ser detectado en todos los órganos de la planta a diferencia del resto. Existen

numerosas investigaciones que plantean que en la defensa de la planta, los genes pueden actuar aumentando sus niveles de expresión o inactivándose, en dependencia de la especie hospedante o el patógeno que le ataca (Thomma y col., 2011). En *Nicotiana megalosiphon* se han informado algunos genes relacionados con la resistencia poligénica a diferentes patógenos. La defensina NmDEF02 es un ejemplo de proteína que se ha caracterizado en este hospedante y que presenta actividad antimicrobiana *in vitro* contra *P. nicotianae*, *Fusarium oxysporum* var *cubense*, *Alternaria solani* y *Verticillium daliae* (Portielles y col., 2010). En experimentos de campo, las plantas transformadas de tabaco con esta defensina mostraron resistencia contra *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* y *P. nicotianae*, además plantas transgénicas de tomate y papa fueron muy resistentes a *P. infestans* (Portielles y col., 2010). En la interacción de *N. megalosiphon* con *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* se demostró que los genes que codifican para el factor de transcripción EIL2 y la Glutación Sintetasa se activan y aportan positivamente a la resistencia poligénica contra el *moho azul de tabaco* (Borras y col., 2006). El estrés biótico provocado por los patógenos induce una elevada expresión de genes involucrados en la defensa de las plantas. Por ejemplo, las investigaciones sobre la resistencia cuantitativa en papa frente a *P. infestans*, mediante *SuperSage* demostraron la expresión de numerosos genes (tags) que fueron asignados funcionalmente a 17 categorías metabólicas (Draffehn y col., 2013). Los genes involucrados en la función defensiva de la planta, se encuentran representados por proteínas de la resistencia (PR) tales como: PR1b, PR10, β -1,3 glucanasas (PR2), diferentes quitinasas, (PR3) y proteínas parecidas a las taumatinas (PR5), (Draffehn y cols., 2013). Entre las proteínas de la resistencia se hallan los inhibidores de proteasas. Estas se

pueden encontrar en tejidos de reserva tales como tubérculos y semillas, también, se han descrito en el polen y otras zonas aéreas de las plantas (L. van der Hoorn., 2008). Los genes que codifican para los inhibidores de proteasas se inducen ante el ataque de insectos, hongos, *Oomycetes*, bacterias y virus (Feldman y col., 2014). Entre sus funciones más importantes se encuentran la regulación de la maquinaria endo-proteolítica, la inhibición de la digestión enzimática de insectos fitófagos, y la destrucción de proteasas microbianas secretadas por fitopatógenos que dañan la pared celular vegetal y otros tejidos de la planta (Hartl y col., 2011; Habib y Fazili., 2007). La activación de inhibidores de proteasas en directa relación con el daño tisular, debido al ataque de patógenos ha sido informada en disímiles investigaciones, Heitz y col., (1993) informan la activación de dos genes que codifican para inhibidores (isoformas) de proteasas del tipo serino, nombradas TIMP A y TIMP B, debido a la infección de VMT (virus de mosaico del tabaco). Estos autores demostraron la acumulación de ARNm correspondiente a estos dos genes, en las zonas de infección del VMT en plantas de *Nicotiana tabacum* que experimentaron reacciones de HR. Posteriormente, demostraron que TIMP A y TIMP B presentaban actividad inhibitoria contra subtilasas y proteinasas K de bacterias y hongos respectivamente. La presencia de estos inhibidores fue ligeramente sistémica en plantas de *N. tabacum* afectadas por VMT y se comprobó que presentaban relaciones filogenéticas con inhibidores de proteasas del tipo serino en papa y tomate (Heitz y col., 1993). En otras investigaciones, se ha correlacionado la acumulación del ARNm con la posterior presencia de sus inhibidores de proteasas. En interacciones de plantas y herbívoros fitopatógenos se ha comprobado la acumulación de ARNm de los inhibidores de papa del tipo I y II, inhibidores del tipo Bowman-Birk y de tipo

Kunitz (Feldman y col., 2014). Sin embargo, otros inhibidores de proteasas del tipo serino se expresan constitutivamente, como es el caso de SaPIN2b; localizado en los tricomas de la especie *Solanum nigrum* (Luo y col., 2012). SaPIN2b presenta actividad contra las proteasas intestinales del insecto plaga *Helicoverpa armigera*, e inhibe proteasas del tipo serino, tripsina y quimotripsina (Luo y col., 2012).

3.4. Caracterización molecular (filogenia y bioquímica) de la proteína NmIMSP mediante programas bioinformáticos.

Se obtuvo la secuencia completa de nucleótidos de ADN para el Tag 49066 mediante la amplificación y secuenciación de su ADNc. El gen se nombró *nmimsp* y está formado por 324 pares de bases (pb). El marco de lectura teórico de este gen codificó para una supuesta proteína de 107 aminoácidos, nombrada NmIMSP, (Figura 11).

```

1      ATGGTGAAGT TCGCGCACGT GGTGGCGTTC CTACTACTAG CGAGTCTATT
      TACCACTTCA AGCGCGTGCA CCACCGCAAG GATGATGATC GCTCAGATAA

51     CATAACGCTA ACGGCGAGAG ACGTAGAGAT AAACGTGCTA CAGCTAGACG
      GTATGGCGAT TGCCGCTCTC TGGATCTCTA TTTGCACGAT GTCGATCTGC

101    TGAGTCAGAG TGGGTGCCCG GGGGTGACCA AGGAGAGATG CCGGAGCTA
      ACTCAGTCTC ACCACGCGGC CCCCCTGCT TCTCTCTTAC CGGCTCGAT

151    CTAGGGACGC CGGCGAAGTT CGCGATGGCG ATAATACAGA AGGAGGCGCC
      GATCCCTGCG GCGGCTTCAA GCGCTAOCGC TATTATGTCT TCCTCCGCGG

201    GAAGCTAACG AACGTGCAGA CGGTGCTAAA CGGGACGGCG GTGACGGAGG
      CTTGATTGTC TTGCACGTCT GCCACGATTT GGCCTGCCGC CACTGCCTCC

251    ACCTAAGATG CAACAGAGTG AGACTATTCT TGAACGTGCT AGACTTCCTA
      TGGATTCTAC GTTGTCTCAC TCTGATAAGC ACTTGCACGA TCTGAAGGAT

301    GTGCAGACGC CGCAGGTGGG GTAA
      CAAGTCTGCG GCGTCCACCC CATT
  
```

Secuencia nucleotídica del gen *nmimsp* de 324 pares de bases (pb).

```

MVKFAHVVAFLLLASLFIPLTARDLEINVLQLDVBSQSCCPQVTKERWPELLQTPAKFA
MAIIQKLEAFKLINVQTVLNGTAVFLDLKRNKRVRLTFVNVLDELVLQTFQVG
  
```

Secuencia aminoacídica (107 aa) de la proteína NmIMSP.

Figura 11. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos del gen *nmimsp* y la proteína NmIMSP respectivamente.

La secuencia de aminoácidos de NmIMSP mostró niveles altos de homología con otras 24 secuencias, relacionadas con inhibidores de proteasas (base de datos *UNIPROTKB*) de la familia *Solanaceae*, Tabla 3.

Tabla 3. Proteínas relacionadas filogenéticamente con NmIMSP mediante el porcentaje de similitud.

Número de Acceso –Tipo de Inhibidor- Especie de solanáceas	% de Similitud con NmIMSP
X67076.1 Inhibidor de endoproteinasa tomate I (<i>Nicotiana tabacum</i>)	96.0%
Q03199 Inhibidor de proteasa I-B (<i>Nicotiana tabacum</i>) TIMP-B	95.0%
Q03198 Inhibidor de proteasa I-B (<i>Nicotiana tabacum</i>) TIMP-A	92.0%
Q40416 Inhibidor de proteasa I (tumores) (<i>N. glauca</i> x <i>langdor.</i>)	78.0%
Nb0000S 3673 Inhibidor de peptidasa de tomate I (<i>N. benthamiana</i>)	75.0%
Nb00010572 Inhibidor de peptidasa de tomate I (<i>N. benthamiana</i>)	75.0%
Nb0000367301 Inhibidor de peptidasa de tomate I (<i>N. benthamiana</i>)	75.0%
P16231 Inh. Prot. Activado por daño tisular (<i>Solanum peruvianum</i>)	50.0%
P08454 Inh. Prot. Activado por daño tisular (<i>Solanum tuberosum</i>)	50.0%
E0WCF2 Inhibidor de proteasa de tipo serino (<i>Solanum tuberosum</i>)	49.0%
Q43648 Inhibidor de proteasa I (<i>Solanum tuberosum</i>)	49.0%
Q43651 Inhibidor de proteasa I (<i>Solanum tuberosum</i>)	49.0%
Q4FE22 Inhibidor de proteasa I PPI3A4 (<i>Solanum tuberosum</i>)	48.0%
Q00783 Inhibidor de proteasa I (<i>Solanum tuberosum</i>)	48.0%
Q07459 Inhibidor de proteasa I (<i>Solanum tuberosum</i>)	48.0%
Q4FE23 Inhibidor de proteasa I PPI3A2 (<i>Solanum tuberosum</i>)	47.0%
Q4FE26 Inhibidor de proteasa PPI3B2 (<i>Solanum tuberosum</i>)	47.0%
P05118 Inh. Prot. Activado por daño tisular (<i>Solanum lycopersicum</i>)	46.0%
Q4FE25 Inhibidor de proteasa I PPI2C1A (<i>Solanum tuberosum</i>)	46.0%
Q3S484 Inhibidor de proteasa I (<i>Solanum tuberosum</i>)	45.0%
Q4FE24 Inhibidor de proteasa I PPI2C4 (<i>Solanum tuberosum</i>)	45.0%
Q3S492 Inhibidor de proteasa I (<i>Solanum tuberosum</i>)	45.0%
Q0Z7S3 Isoforma de un Inhibidor de protease (<i>Solanum phureja</i>)	40.0%

Las 4 especies de *Nicotiana* representadas fueron; *Nicotiana glauca*, *N. langsdorffii*, *N. tabacum* y *N. benthamiana*). El género *Solanum* mostró homología con otras 4 especies; *Solanum lycopersicum*, *S. peruvianum*, *S. phureja* y *S. tuberosum*) respectivamente, (Tabla 3). Las especies de *Nicotiana* presentaron los mayores niveles de homología. *Nicotiana tabacum* evidenció un porcentaje del 96 % con un inhibidor de peptidasas de tomate, luego están los inhibidores de proteasas TIMP-B y TIMP-A con porcentajes del 95 % y 92 % respectivamente. El 78 % de homología correspondió a un inhibidor de proteasas relacionado con tumores en plantas a partir de un cruce de *N. glauca* y *N. langsdorffii*. La especie *Nicotiana benthamiana* presentó tres inhibidores de proteasas con un 75 % de homología, (Tabla 3). La proteína madura NmIMSP, presentó un total de 6 sitios polimórficos con respecto a los inhibidores TIMP A y TIMP B (Figura 12 A y B). La presencia de los aminoácidos Alanina (79) y Leucina (99) resultaron exclusivos en la secuencia de NmIMSP. Estos aminoácidos podrían ser utilizados como marcadores específicos de esta proteína, ya que prácticamente, debido a su homología con TIMP A y TIMP B, NmIMSP podría ser considerada una isoforma mas con respecto a las anteriores, encontradas en *N. tabacum*. Es probable que en otras especies de *Nicotiana* estén presentes variables polimórficas de este inhibidor. Por otra parte, NmIMSP mostró un mayor número de polimorfismos en comparación con los inhibidores de proteasas de *N. benthamiana* y del cruce genético entre *N. glauca* y *N. landgdorsfii*. En este caso se observaron 12 cambios en los aminoácidos en la zona del péptido señal y 40 en la proteína madura (Figura 12 A y B). Es por ello, que las distancias genéticas entre estas especies son mayores y se observan menos cercanas en el árbol filogenético

(Figura 13). Sin embargo, las mayores diferencias de homologías y distancias genéticas se encontraron en los representantes del género *Solanum* (Tabla 3), en este caso la identidad de secuencia osciló entre un 50% y un 40%. Por tanto, los mayores niveles de homología se concentraron en estos dos géneros de la familia Solanáceas. Lo cual podría indicar la presencia de un ancestro común y ancestral, en la posterior evolución y aparición de nuevos inhibidores, relacionados genéticamente y con una función similar. El árbol filogenético muestra a NmIMSP muy cercano a las ramas evolutivas que forman los inhibidores de proteasas de *Nicotiana tabacum* y *N. benthamiana* (Figura 13). El resto de los inhibidores del género *Solanum* (Sp y St) se ubicaron más alejados filogenéticamente, mostrando una mayor distancia genética (Figura 13). Lo antes mencionado se corresponde con lo observado en el porcentaje de homologías de secuencia aminoacídicas. Las secuencia aminoacídica de NmIMSP presentó elevada homología con representantes de la especie *N. tabacum*, tales como X67076, Q03199, y Q03198. Estos dos últimos inhibidores de proteasas del tipo serino son las isoformas TIMP-A y TIMP-B, que se activan frente a la infección de VMT (virus del mosaico del tabaco), (Heizt y col., 1993). Estos inhibidores han sido caracterizados bioquímicamente y prácticamente, la proteína NmIMSP presenta características de secuencia aminoacídica muy similares a TIMP A y TIMP B, reforzando el criterio de que NmIMSP pueda ser un inhibidor de proteasas del tipo serino (Figura 14). En un alineamiento específico, con estos inhibidores, se demuestran las similitudes estructurales con NmIMSP, incluso, la presencia del aminoácido **E** (Glutamato), destacado en color azul, que representa la posición 1 o residuo activo P1, muy común en los inhibidores de proteasas del tipo serino, (Figura 14), (Krowarsch y col., 2003). Estas proteínas presentan un mecanismo

de inhibición del tipo canónico, Laskowski y Kato, (1980). El inhibidor forma un lazo convexo en la molécula, que se coloca entre las posiciones de los aminoácidos P3-P3' y tiene una complementariedad con el sitio activo y cóncavo de la proteasa en particular en las posiciones, S1 y S1' (Farady y Craik, 2010, Krowarsch y col., 2003), (Figura 15).

Accession	Sequence	Position
X67076.1	M-----VFHVVAFLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	37
Q03199	M-----VFHVVAFLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	37
Q03198	M-----VFHVVAFLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	37
Q40416	M-----VKLALVVTLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	25
NB000003673	M-----AKLALVVAFLLSVSLFQPLTAQS-----	25
NB000010572	M-----VKLALVVTLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	25
NB000003673	M-----EKLVVAFLLASRVK-----	18
P16231	ME-----AKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	43
P08454	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q53K28	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
K0WCF2	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	43
Q4FE22	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q00703	ME-----LKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q4FE23	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q43648	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q43651	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
P05118	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	43
Q07459	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q4FE26	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q4FE25	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q38404	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q38492	ME-----MEGKIMLKLSHVLAFLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	49
Q05703	ME-----MEGKIMLKLSHVLAFLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	49
Q4FE24	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39

Figura 12 A. Alineamiento de los aminoácidos de la proteína NmIMSP con los inhibidores de proteasas del género *Nicotiana* y *Solanum*. En el recuadro rojo se encuentra la secuencia de NmIMSP y las letras en negro señalan las regiones polimórficas de esta proteína con respecto a los inhibidores de proteasas de las especies de *Nicotiana*.

Accession	Sequence	Position
X67076.1	M-----VFHVVAFLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	37
Q03199	M-----VFHVVAFLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	37
Q03198	M-----VFHVVAFLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	37
Q40416	M-----VKLALVVTLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	25
NB000003673	M-----AKLALVVAFLLSVSLFQPLTAQS-----	25
NB000010572	M-----VKLALVVTLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	25
NB000003673	M-----EKLVVAFLLASRVK-----	18
P16231	ME-----AKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	43
P08454	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q53K28	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
K0WCF2	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	43
Q4FE22	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q00703	ME-----LKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q4FE23	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q43648	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q43651	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
P05118	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	43
Q07459	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q4FE26	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q4FE25	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q38404	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39
Q38492	ME-----MEGKIMLKLSHVLAFLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	49
Q05703	ME-----MEGKIMLKLSHVLAFLLASLEQLTARDL-EI--NVLQLDVSQS-----	49
Q4FE24	ME-----SKFAHIIVFLLATSFETLMARKE--SDGPEVIEL-LKEF--SDS	39

Figura 12 B. Alineamiento de los aminoácidos de la proteína NmIMSP con los inhibidores de proteasas del género *Nicotiana* y *Solanum*. Se destacan las posiciones Alanina 79 y Leucina 99 exclusivas de la proteína NmIMSP.

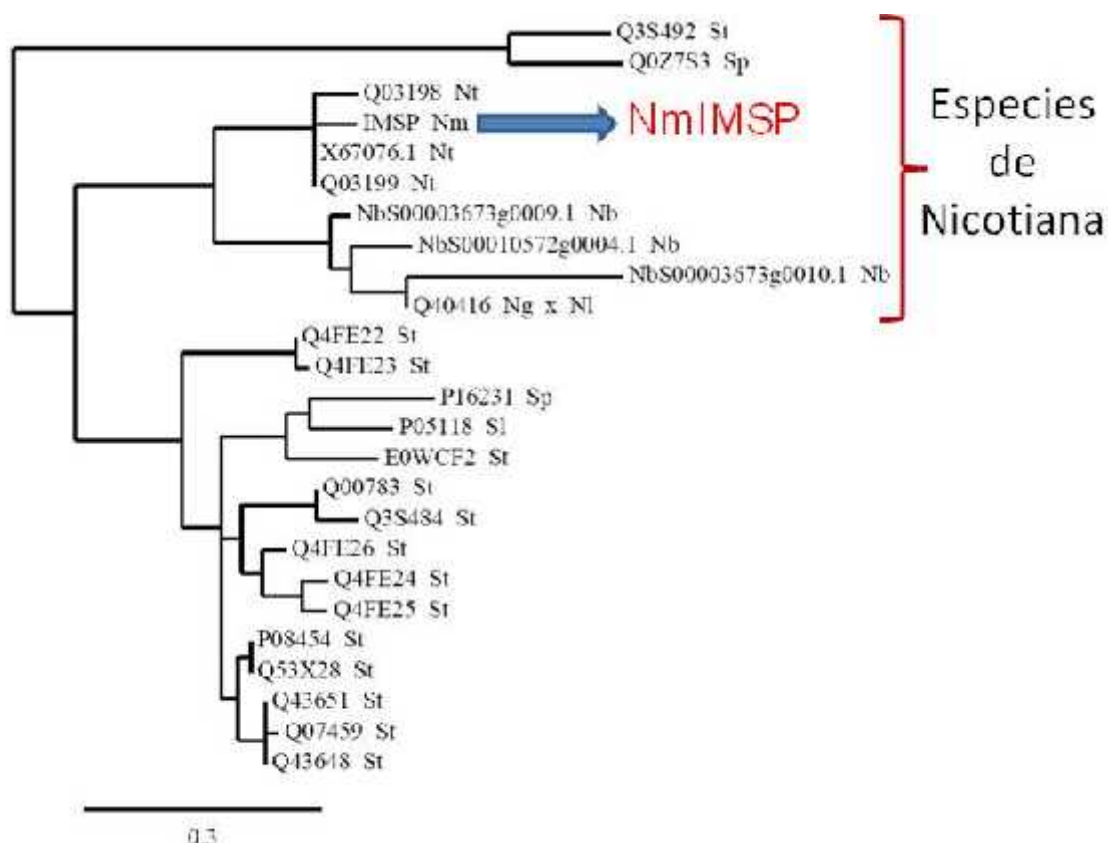


Figura 13. Representa las distancias genéticas entre la proteína NmIMSP y los inhibidores de proteasas relacionados de las especies *Nicotiana* y *Solanum* (MEGA versión 4). Las proteínas están codificadas por su número de acceso, seguido del nombre abreviado de la especie. Ng: *Nicotiana glauca*, Nt: *Nicotiana langsdorffii*, Nt: *Nicotiana tabacum*, Nb: *Nicotiana benthamiana*, Nm: *Nicotiana megalosiphon*, St: *Solanum lycopersicum*, Sp: *Solanum peruvianum*, Sp: *Solanum phureja*, St: *Solanum tuberosum*.



Figura 14. Alineamiento de secuencias de los inhibidores NmIMSP, TIMP A y TIMP B. Las flechas verticales indican los sitios homólogos del péptido señal y la proteína madura en TIMP A y TIMP B. En el círculo rojo se destaca el aminoácido E (en azul), sitio activo de los inhibidores.

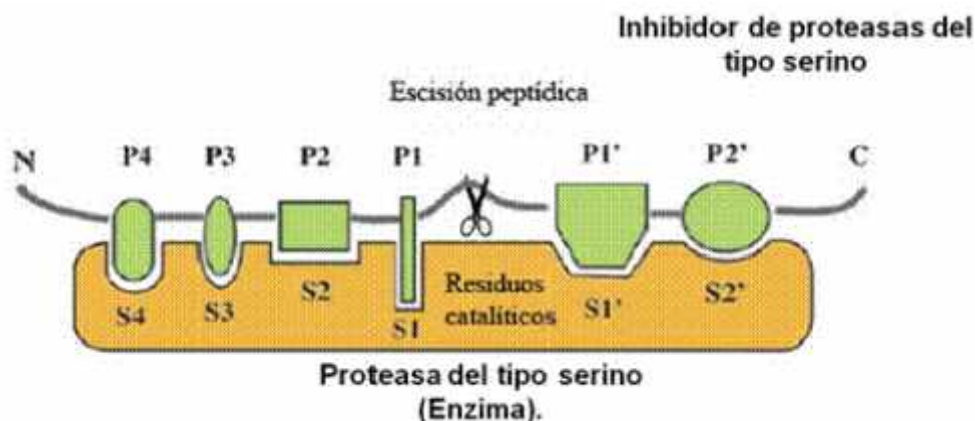


Figura 15. Representa en mecanismo de acción de los inhibidores de tipo canónico (interacción inhibidor-proteasa). Los sitios están señalados de acuerdo a con la nomenclatura de Schechter y Berger (1967), **S** denota los sub-sitios de interacción de una proteasa y **P** los sitios de unión del inhibidor. El sitio **S1** de la proteasa interactúa con el enlace peptídico escindible del inhibidor (sitios P1-P1').

Otra característica interesante en NmIMSP que comparte con los inhibidores TIMP A, TIMP B y otras proteínas, es la presencia de una secuencia de aminoácidos que se repite en la familia de los inhibidores de tipo I de *Solanum tuberosum*. Esta secuencia en NmIMSP aparece en la posición del aminoácido 47 (---WPELLGPA---) y caracteriza a la familia de los inhibidores de papa (Feldman y col., 2000). Generalmente, el dominio estructural o secuencia está compuesto por 8 aminoácidos, algunos muy conservados y otros polimórficos. Recientemente, Feldman y col, (2014), caracterizaron un nuevo inhibidor de proteasas del tipo serino en papa nombrado PLPKI que posee esta secuencia y presentó homología estructural con NmIMSP. La secuencia de PLPKI fue homóloga, en estos 8 aminoácidos al inhibidor TIMP B (Feldman y col., 2014), (Figura 16). PLPKI se activa cuando se produce la infección de *Phytophthora infestans* en papa, su actividad inhibitoria fue comprobada frente a proteasas microbianas del tipo serino, como la subtilisina y la proteinasa K (Feldman y col., 2014). Además, se corroboró que los cultivares resistentes de papa frente a *P.*

infestans presentaron una elevada concentración de este inhibidor (Feldman y cols., 2014).

Especie-Enzima	Secuencia típica de los inhibidores I de proteasas en papa	Número de acceso
potato PLPKI	LTCNG--LRNPGLGVPAIA	
potato PinI	fec-rg--kqNPGLGVPAIA	AA208249.1
potato PinI	fec-rg--kqNPGLGVPAIA	AAS46024.1
potato PinI	fec-rg--kqNPGLGVPAIA	Q00783
potato PinI	fec-rg--kqNPGLGVPAIA	P08454.2
potato PinI	fec-rg--kqNPGLGVPAIA	I314299A
potato PinI	fec-rg--kqNPGLGVPAIA	AAA69780.1
potato PinI	fec-rg--kqNPGLGVPAIA	AAC49603.1
potato PinI	fec-rg--kqNPGLGVPAIA	P01052.1
potato PinI	fec-rg--kqNPGLGVPAIA	AAZ08245.1
potato PinI	fec-rg--kqNPGLGVPAIA	S27218
tomato PinI	LTCNG--kqNPGLGVPAIA	P05118.1
tomato PinI	STC-pqvtkerNPGLGVPAIA	NP_001234615.1
<i>L. peruvianum</i> PinI	STC-KQ--kqNPGLGVPAIA	AAA34198.1
TIMP B <i>N. tabacum</i> PinI	sqc-pqvtkerNPGLGVPAIA	Q03199.1
<i>N. sylvestris</i> PinI	-----ketNPGLGVPAIA	Q02214.1
<i>N. glauca</i> X <i>N. langsdorffii</i> PinI	-----ketNPGLGVPAIA	BAA05472.1
<i>N. glauca</i> X <i>N. langsdorffii</i> PinI	-----ketNPGLGVPAIA	BAA02823.1
<i>Cucurbita maxima</i> PinI	--c-pq--kqNPGLGVPAIA	P19873

Secuencia de 8 aminoácidos NmIMSP --kerWPELLGtPAkfa

Figura 16. Alineamiento de la secuencia de 8 aminoácidos característica de la familia de los inhibidores de papa. En el recuadro azul se señala en la secuencia de NmIMSP los aminoácidos conservados en los inhibidores. El recuadro rojo se destaca el inhibidor PLPKI. Figura adaptada de Feldman y col., (2014).

Características bioquímicas de la proteína NmIMSP mediante programas bionfomáticos.

La función general de la proteína NmIMSP, por métodos informáticos, está relacionada con los mecanismos de resistencia de las plantas, cuando aparece el daño vegetal por factores bióticos o abióticos (Rawlings y col., 2004). De acuerdo con su estructura secundaria, (dominios proteicos), se obtuvo homología con un inhibidor de proteasa I13 perteneciente a la familia tipo I de los inhibidores de

Solanum tuberosum (IPR000864). Su función molecular específica es la de inhibir proteasas del tipo serino. Teóricamente, presentó un punto isoelectrico de 7, 81 y un peso molecular de 11788, 92 Da.

La base de datos de proteasas y sus inhibidores (*MEROPS*) agrupa a estas proteínas en Clanes y Familias; con los criterios de poseer un ancestro común y si presentan homología de secuencia en sus aminoácidos (Rawlings y col., 2014). Atendiendo a esta base datos y por su secuencia aminoacídica, la proteína NmIMSP se ubicó en el clan IG, familia I13 relacionada con inhibidores de *Solanum tuberosum* (IPR000864) o papa de tipo I (Rawlings y col., 2014). Estos poseen actividad inhibitoria frente a las familias S1 y S8 de las proteasas del tipo serino y se activan cuando ocurre una afectación biótica o abiótica en los tejidos vegetales. Los inhibidores pertenecientes a esta familia I13 están ampliamente distribuidos en plantas y se han descrito en muchas especies. Estos inhibidores se han encontrado en tubérculos de papa, frutos y hojas de tomate, cebada, cundeamor chino, calabazas, trigo zarraceno, frijol, arroz y amaranto (Rawlings y col., 2014). Fundamentalmente, su actividad inhibitoria está dirigida hacia la subtilisinas, tripsinas y quimotripsinas. Generalmente, el peso molecular de estas proteínas es de aproximadamente 8 kDa, sin embargo, el estimado teórico para NmIMSP fue de 11, 8 kDa.

Péptido señal de la proteína NmIMSP.

El programa informático, *SignalP* 4.1, procesó la secuencia de aminoácidos de la proteína y predijo la presencia de un péptido señal teórico con un sitio de clivaje en la posición 22 (Petersen y col., 2011). La proteína madura presentó un total de 85 aminoácidos a partir de la posición 23 que pertenece a un residuo Arginina (R),

(Figura 17). El recuadro rojo destaca los aminoácidos que con mayor probabilidad formarían parte del péptido señal, (Figura 17).

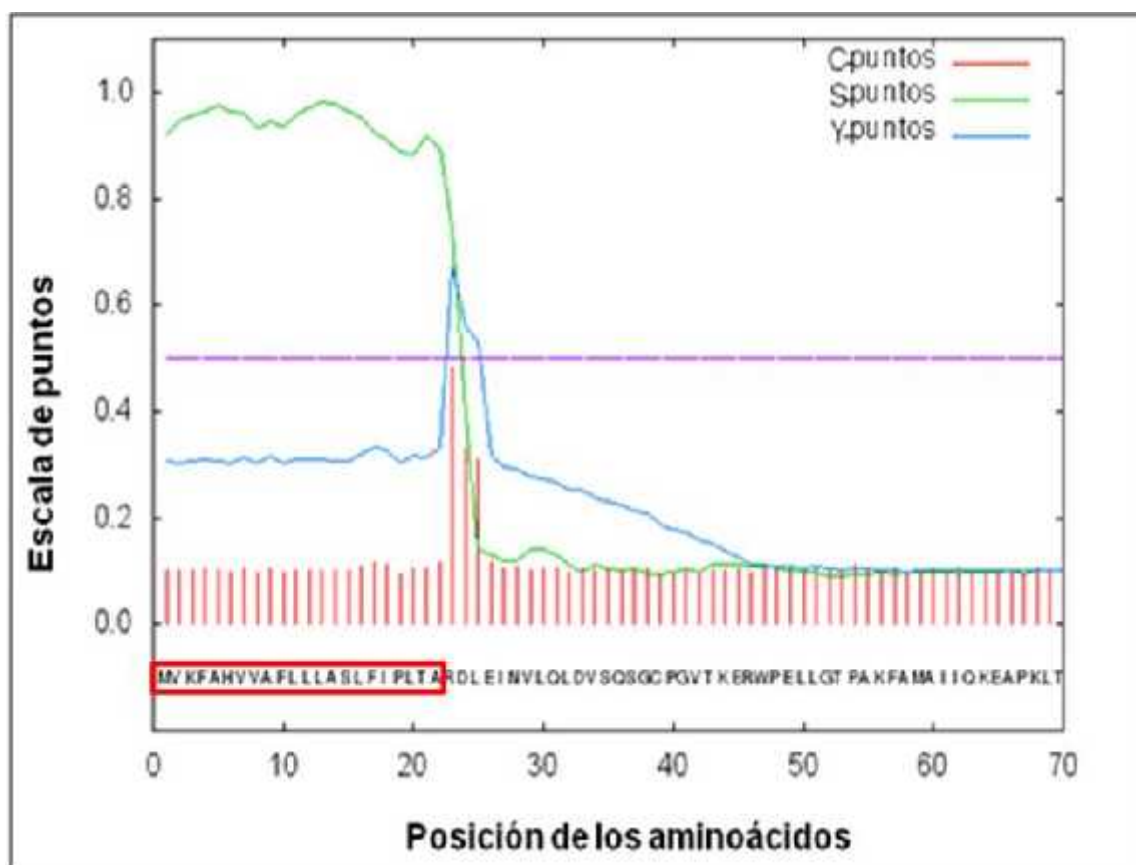


Figura 17. Gráfico sobre la predicción del péptido señal en la secuencia aminoacídica de NmIMSP mediante el programa informático *SignalP* 4.1. Los mayores valores numéricos de C significan la mayor probabilidad de encontrar en un aminoácido de la secuencia, el sitio de corte o escisión del péptido señal. Los mayores valores numéricos de S caracterizan los aminoácidos que con mayor probabilidad forman parte del péptido, los menores valores de S señalan la secuencia que forma parte de la proteína madura. Los valores de Y son una combinación de los obtenidos en C y S, y el sitio de corte. Los primeros 22 aminoácidos enmarcados en rojo representan con mayor probabilidad la presencia de un péptido señal en NmIMSP.

La proteína NmIMSP pudiera sintetizarse en forma inmadura o inactiva debido a que presenta un péptido señal teórico, hidrofóbico de 22 aminoácidos. El programa bioinformático *SignalP* versión 4.1 evidenció la posible presencia de esta estructura, que también se encuentra en los inhibidores de proteasa del tipo serino TIMP A y TIMP B (Petersen y cols., 2011), (Figura 18).



Figura 18. Péptido señal teórico estimado por el programa bioinformático SignalP 4.1 y los informados para los inhibidores de proteasas del tipo serino TIMP A y TIMP B. Los péptidos son prácticamente idénticos.

El péptido señal, en las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) está vinculado, directamente, con la secreción de estas hacia el apoplasto celular. En esta zona interactúan con las proteasas de los fitopatógenos. En la especie *Nicotiana benthamiana* se informó la presencia de seis defensinas con péptidos señales en su extremo N-terminal. Estos fueron procesados en el retículo endoplasmático de la célula vegetal y las proteínas maduras fueron dirigidas hacia el apoplasto, donde actúan posteriormente frente a las proteasas de los patógenos (Bahman y col., 2009). El apoplasto celular es una de las zonas mas activas durante la interacción planta- patógeno. El arsenal de biomoléculas infecciosas del patógeno, como los PAMPs, efectores, proteasas, enzimas que degradan la pared celular, entre otras, son secretadas por el patógeno hacia esta zona (Rovenich y col., 2014) por tanto, la mayoría de estas proteínas necesitan un péptido señal. Por otra parte, la planta dirige un determinado número de proteínas hacia el apoplasto celular mediante su péptido señal, estas proteínas pueden ser inhibidores de proteasas, poligalacturonasas, proteasas, glucanasas, quitinasas, xilanasas y otras proteínas de la patogénesis (PR), (Sels y cols., 2008). La proteína NmIMSP se encuentra relacionada con inhibidores de proteasas tipo I de

papa. La misma podría actuar en el apoplasto celular de la especie *N. megalosiphon* contra subtilisas y otras proteasas del tipo serino del patógeno *P. nicotianae*. El gen *nmimsp* que codifica para esta proteína, se activa cuando la planta percibe a través de los PAMPs la presencia del patógeno, por tanto la producción de esta proteína tiene lugar durante la activación de la inmunidad innata mediada por PAMPs o PTI, Zipfel, (2009). Las características de esta biomolécula hacen suponer que la misma está relacionada con las proteínas de la patogénesis y su activación contribuye a la resistencia poligénica de *N. megalosiphon*.

3.5. Pérdida en la función del gen *nmimsp*. Silenciamiento génico mediado por el virus TRV en *Nicotiana megalosiphon*.

Las construcciones TRV::*pds* y TRV::*nmimsp* fueron agroinfiltradas en 30 plantas de *N. megalosiphon*. Se cuantificó la expresión del gen *nmimsp* y fueron escogidas aquellas plantas que menores niveles de expresión presentaron. En la figura 19 se observa la expresión del gen *nmimsp* en un total de 30 plantas de *N. megalosiphon*. Las plantas que mostraron un silenciamiento efectivo del gen *nmimsp* presentaron los niveles de expresión mas bajos. Los niveles de expresión de *nmimsp* en 17 plantas de 30, fueron indetectables lo cual evidencia un 58% de efectividad en el silenciamiento, (Tabla 4). No obstante, se seleccionaron 15 plantas para los ensayos de resistencia frente a *P. nicotianane*. Las plantas silenciadas con el gen *pds* fueron seleccionadas de acuerdo con la pérdida del pigmento clorofílico y al blanqueamiento que se refleja en las hojas y tallos. Un total de 19 plantas presentaron síntomas de decoloración clorofílica y la efectividad del silenciamiento se estimó en un 62%, (Tabla 4). Fueron

seleccionadas un total de 15 plantas para la evaluación de la resistencia frente a *P. nicotianae*.

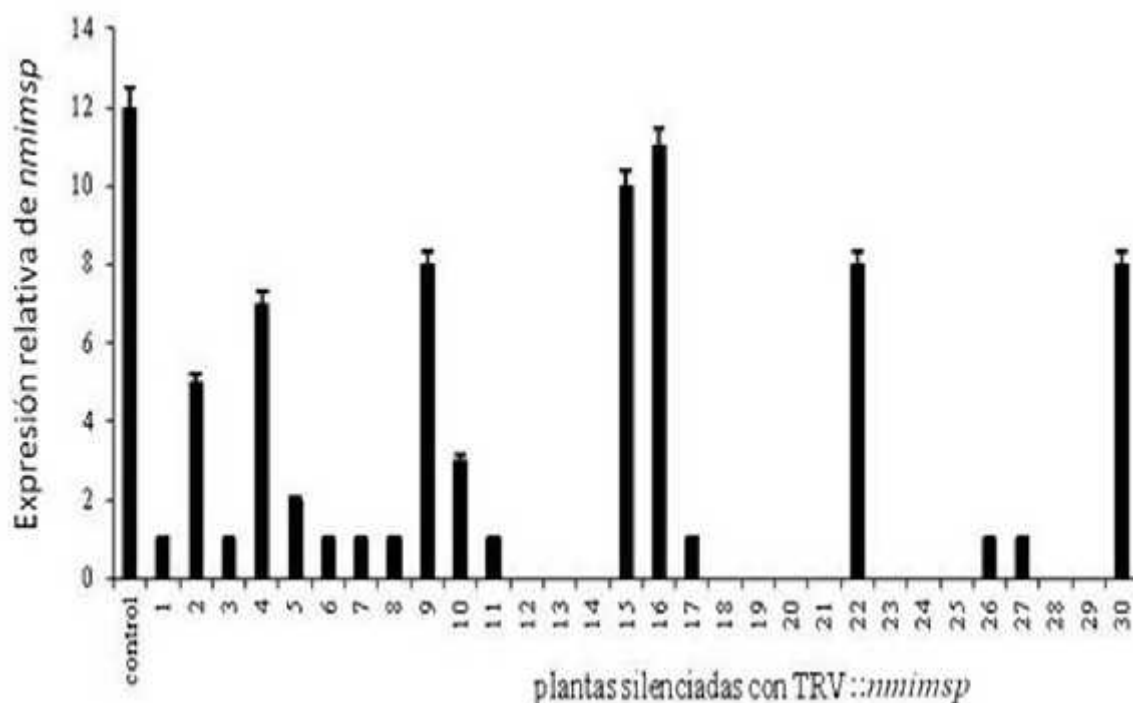


Figura 19. Evaluación del silenciamiento del gen *nmimsp* a los 15 d. Niveles de expresión relativa del gen en las plantas de *N. megalosiphon* agroinfiltradas con la construcción TRV::*nmimsp*.

Tabla 4. Efectividad del silenciamiento de los genes *nmimsp* y *pds* utilizando el vector viral TRV en plantas de *N. megalosiphon*.

Construcciones agroinfiltradas en <i>N. megalosiphon</i>	Número de plantas	Silenciadas	No-silenciadas
TRV:: <i>nmimsp</i>	30	17	13
TRV:: <i>pds</i>	30	19	11

Las plantas control de *N. megalosiphon* (no silenciadas), las agroinfiltradas con TRV::*pds* (plantas silenciadas en el gen *pds*), las plantas silenciadas en el gen *nmimsp* (TRV::*nmimsp*) y las plantas del cultivar Sumatra de *N. tabacum* fueron inoculadas con el aislado PpnIIT23 de *P. nicotianae*. Las plantas control (1c) y las

silenciadas en el gen *pds* (1c) se mostraron inmunes a los 10 días después de la inoculación (Tabla 5).

Tabla 5. Evaluación del grado de afectación de la enfermedad *pata prieta* en plantas de *N. megalosiphon* (TRV::*nmimsp*) silenciadas en el gen *nmimsp*.

Grado de lesión en el tallo *			
<i>N. megalosiphon</i> no silenciada	TRV:: <i>pds</i>	TRV:: <i>nmimsp</i>	<i>N. tabacum</i> cv. 'Sumatra'
1 c	1 c	3.2 ± 0.1 b	9.8 ± 0.1 a

La escala se utilizó para evaluar el nivel de afectación de la enfermedad (1 a 10); donde 1 es altamente resistente y 10 muy susceptible, Csinos, (1999). Los valores son la media de 15 réplicas. El grado de ataque o severidad de la enfermedad se evaluó en el tallo a los 10 d después de la inoculación con el patógeno. ANOVA, diferencias significativas determinada por la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P < 0.01$).

Las afectaciones de la enfermedad en la especie *N. tabacum* cultivar Sumatra fueron notables (9,8). Este fenotipo es muy susceptible a la incidencia de la *pata prieta*. En el cultivar se observó la pudrición en los tallos en el 98% de las plantas. Los tallos se mostraron de color oscuro, frágiles y el desarrollo de la raíz fue escaso, por tanto podemos concluir que los niveles de afectación por *pata prieta* en estas plantas fue muy significativo con respecto al resto (Tabla 5). Por último, las plantas de *N. megalosiphon* con el gen silenciado *nmimsp* (TRV::*nmimsp*) mostraron niveles de afectación significativos con respecto a las plantas controles no silenciadas y a las silenciadas en el gen *pds*. Lo cual demuestra que la pérdida de función del gen *nmimsp* compromete la resistencia de las plantas de *N. megalosiphon* (3,2 b), aunque no completamente. Pues estas plantas mostraron un nivel de resistencia mayor que el presentado por el cultivar Sumatra. Lo cual conduce, a valorar la posibilidad de que la función del

gen *nmimsp* es importante en el aporte a la resistencia cuantitativa o poligénica de *N. megalosiphon* frente a este *Oomycete*.

La especie *N. megalosiphon* es prácticamente inmune a los *Oomycetes* fitopatógenos que afectan el cultivo del tabaco. En investigaciones realizadas con el *Oomycete* *Peronospora hyoscyasmi* f. sp. *tabacina* los genes de la resistencia poligénica, que codifican para el factor de transcripción EIL2 y la Glutathione Sintetasa son activados (Borras y col., 2006). En experimentos de silenciamiento con estos genes, utilizando el vector viral TRV se comprobó que su inactivación comprometió la resistencia de la especie; ya que aparecieron síntomas asociados a la inoculación de este patógeno, en sus hojas (Borras y col., 2006). La inactivación de los genes ICS1 (isocorismato sintasa 1) y EIN2 (etileno-insensible 2), relacionados con la síntesis de las hormonas vegetales SA y ET, y con la resistencia de las plantas adultas de *N. benthamiana* fueron silenciadas con TRV lo cual provocó la desaparición total del sistema de defensa de este hospedero frente a *P. infestans* (Shibata y col, 2010). El gen SerK3 es un receptor del tipo quinasa, con varios repeticiones consecutivas del aminoácido leucina y que actúa como principal modulador de la respuesta PTI en *N. benthamiana* frente a *Phytophthora infestans* (Chaparro-García y col., 2011). La inactivación por silenciamiento génico mediado por virus (TRV::SerK3) mostró una marcada susceptibilidad de esta especie frente al ataque de *P. infestans*. El gen SerK3 contribuye a la resistencia frente al *Oomycete* mediante la vía de reconocimiento de INF1, proteína del patógeno que es un PAMP importante y activa el PTI en *N. benthamiana* (Chaparro-García y col., 2011). Un análisis similar al anterior ocurre en el silenciamiento de los genes FLS2 y BAK1 en *N. benthamiana*, lo cual compromete la activación de PTI en esta especie, debido a que las funciones que

se inactivan son la de reconocer el epítotope 22 de la flagelina bacteriana (PAMP), en el caso de FSL2 y la función co-receptora y de transducción de señales del receptor de membrana BRI1, muy importantes en la cascada de señales relacionadas con la activación de la respuesta defensiva de la planta (Chakravarthy y col., 2010). Los ejemplos anteriores, tienen en común, que en todos los casos los genes silenciados comprometen en mayor o en menor medida la resistencia poligénica de la planta. Por otra parte, el silenciamiento génico mediado por virus y el uso de la agroinfiltración son técnicas muy frecuentes en el estudio de los genes en plantas por las facilidades que posee. En el último caso existe una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* que libera las partículas virales del TRV (tobacco rattle virus) hacia la planta. El virus que no pierde su capacidad infectiva, lleva en su construcción genómica un fragmento del gen de la planta que se desea inactivar (Vaghchhipawala y Misore, (2006). Esto se logra, a través de la degradación del ARNm del gen de la planta que presenta homología de secuencia nucleotídica, con el que se encuentra en el vector viral. El ARNm de doble cadena se escinde proteolíticamente mediante la actividad nucleasa de las enzimas *DICER* de la planta. El virus es capaz de amplificar la inactivación del gen deseado en toda la planta, debido a su su capacidad infectiva. Posteriormente ocurre la formación de ARNm de doble cadena en el vector viral homólogo al producido en la planta. El resultado es la inactivación de este último por degradación. (Ramegowda y col., 2013). Otra de las ventajas de utilizar el TRV como vector es que los síntomas de infección, en el hospedero como la necrosis y la clorosis son escasos y el nuevo carácter o fenotipo puede ser observado con mayor facilidad. Además, a diferencia de otros vectores, como el PVX y el VMT presenta un mayor número de hospederos y su ventaja

fundamental radica en que logra infectar con mayor eficiencia, que cualquier otro vector viral, las zonas más jóvenes de la planta tales como meristemos, flores y regiones apicales con crecimiento vegetal, por lo tanto la inactivación del gen será más eficiente (Mandar y col., 2009).

3.6. Ganancia temporal de la función del gen *nmimsp* mediada por el virus PVX en plantas de *Nicotiana benthamiana*.

3.6.1. Expresión del gen *nmimsp* en *Nicotiana benthamiana* mediante el virus PVX.

La expresión relativa deAL gen *nmimsp* se analizó por PCR en tiempo real, en 20 plantas individuales de *N. benthamiana*, agroinfiltradas previamente, con la construcción (PVX::*nmimsp*), como control se agroinfiltró la misma cantidad de plantas con PVX::*gfp* y además se analizaron plantas de *N. benthamiana* sin agroinfiltrar, (Figura 20). En Las plantas, con la construcción PVX::*nmimsp*, se detectaron niveles elevados del gen *nmimsp* hasta 15 d después de la agroinfiltración. La expresión en estas plantas mostraron diferencias muy significativas con respecto a las concentraciones, prácticamente indetectables por PCR en tiempo real, de las plantas con la construcción PVX::*gfp* y en *N. benthamiana* sin agroinfiltrar (Figura 20).

La especie *N. benthamiana* es la planta modelo que se utiliza para el análisis funcional de los genes de plantas. Esta especie es de origen australiano y carece de los mecanismos defensa, típicos de otras Nicotianas, (Lu y col., 2003). Por esta razón, es muy susceptible a un amplio rango de fitopatógenos, entre ellos los virus, que al no encontrar mecanismos de defensas se dispersan y acumulan rápidamente en toda la planta. Otra ventaja de esta planta, que es un

modelo biológico, radica en que los síntomas en los experimentos de silenciamiento o expresión mediante vectores virales son más pronunciados y persistentes que en otras especies (Lu y col., 2003).

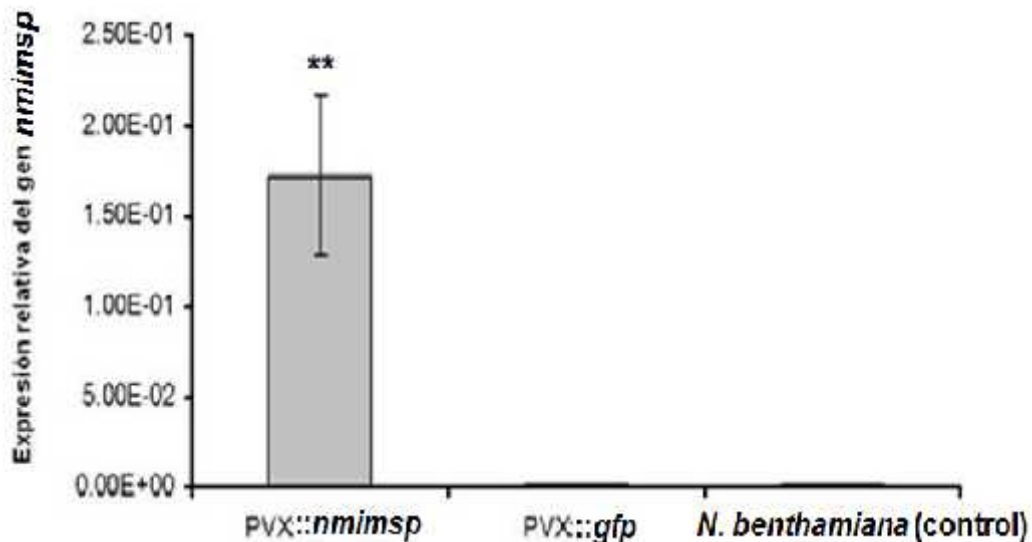


Figura 20. Niveles de expresión del gen *nmimsp* detectados a los 15 d en plantas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con PVX::nmimsp, PVX::gfp y sin agroinfiltrar (control). N=20. Las diferencias significativas fueron determinadas por ANOVA **: P<0.01; *: P < 0.05; NS: no significativo. GraphPad Prims Software Inc. (CA, USA).

El virus PVX no presenta un rango de hospederos tan amplio como el TRV. *Nicotiana benthamiana* es uno de sus pocos hospederos naturales. Sin embargo, estos organismos constituyen un sistema biológico de amplia utilización por los investigadores, en el análisis de función de los genes de plantas debido a la prontitud de los resultados, su reproducibilidad y sus bajos costos de aplicación. Existen numerosos ejemplos que corroboran la anterior afirmación. Un total de 4 inhibidores de poligalacturonasas de *Phaseolus vulgaris* L fueron expresadas en *N. benthamiana* a través del PVX, para ser evaluada su actividad inhibitoria, frente a poligalacturonasas de origen fitopatogénico (Manfredini y col., 2005). Una de las variantes del método consiste en utilizar el vector viral PVX en la búsqueda de

genes R (resistencia) del hospedante. En 10 cultivares de papa resistentes a *P. infestans* se realizó una búsqueda de genes de resistencia relacionados con HR y para ello, se expresaron 54 genes, que codificaron para efectores del patógeno, mediante el sistema *N. benthamiana* –PVX. Estas proteínas efectoras fueron probadas en cada uno de los fenotipos de papa resistentes (Vleeshouwers y col., 2008). El gen *NbCD1* proveniente de *N. benthamiana* codifica para una proteína de la clase II ERF (*ethylen responsive element binding factor*), relacionada con la activación del etileno. Este gen se caracterizó a partir de una biblioteca de ADNc de *N. benthamiana*. La biblioteca presentó un total de 40000 ADNc que fueron expresados en el sistema PVX-Sfinx. Se buscaron los genes de la planta relacionados con la respuesta HR y se comprobó que *NbCD1* es un regulador positivo de esta respuesta y que su transcripción afecta un total de 58 genes en la planta relacionados con la respuesta poligénica (Nasir y col., 2005).

3.6.2. Evaluación de la prueba de resistencia frente a *P. nicotianae* en plantas de *N. benthamiana* expresando el gen *nmimsp*.

Las plantas de *N. benthamiana* que expresaron individualmente los genes *nmimsp*, *gfp*, y las controles (fenotipo salvaje) fueron inoculadas con el aislado de *P. nicotianae* PpnIIT23. Se evaluó la resistencia de estas plantas mediante la escala de Csinos, (1999). Se estimaron los síntomas de la enfermedad *pata prieta* a los 10 días, después de la inoculación con el patógeno. La plantas que expresaron el gen *nmimsp* (PVX::*nmimsp*) no mostraron síntomas o signos de la enfermedad durante el tiempo de la evaluación. Estas plantas permanecieron sanas, sin afectaciones en los tallos, mostrando diferencias estadísticamente

significativas con respecto a las plantas controles, o a las que expresan el gen de la proteína verde fluorescente (PVX::*gfp*) (Figura 21).

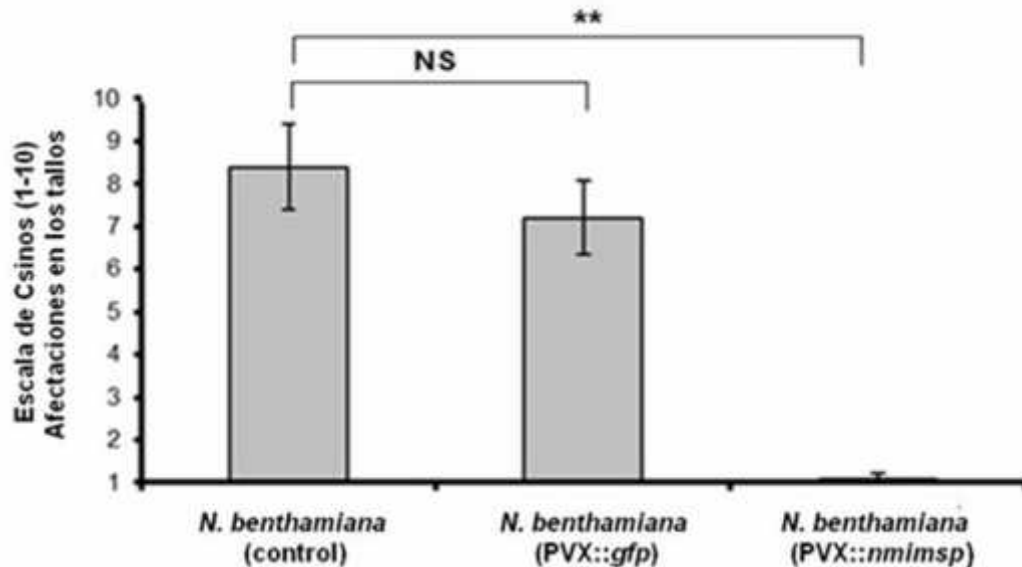


Figura 21. Evaluación por la escala de Csinos (1-10) de la incidencia de *pata prieta* en plantas de *N. benthamiana* que expresan el gen *nmimsp*, *gfp* y las plantas controles. Las barras representan los valores de la media (N=20; +/- DE). Las diferencias significativas (ANOVA) fueron determinadas por la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P < 0.01$). NS: no significativo. **: $P < 0.01$.

Las plantas que expresaron la proteína verde fluorescente y las de fenotipo salvaje o controles mostraron síntomas de la enfermedad paulatinamente. A los 10 d después de la inoculación con el patógeno presentaron daños severos por la afectación de *pata prieta*. Los valores de afectación fueron de 7,5 para las plantas con la expresión de *gfp* y 8,5 para las plantas de fenotipo salvaje o normal, (Figura 21). La figura 22 (A, B y C) permite tener una valoración gráfica del grado de afectación o severidad de la enfermedad *pata prieta* en cada una de las plantas de *N. benthamiana*. Aquellas que expresaron el gen *nmimsp* estuvieron protegidas frente a la infección del aislado de *P. nicotianae* PpnIIT23, y se mostraron altos niveles de resistencia. En contraste, el resto de las plantas (*gfp* y fenotipo salvaje) mostraron síntomas de marchitamiento intenso en los tallos,

además, de pudrición y pérdida del sistema radicular, (Figura 22 A, B y C). *Phytophthora nicotianae* es el agente causal de la enfermedad *pata prieta* en *N. tabacum* y afecta fundamentalmente, a las raíces y a la base del tallo, aunque puede afectar la totalidad de la planta. Los síntomas varían según la edad de la planta y las condiciones climáticas. En general, se observa el tallo dañado, frágil y constreñido, poco desarrollo de las raíces y pudrición de las mismas, (Shew y Lucas, 1991); características que se observaron en las plantas controles y en las que expresaron el gen *gfp* (Figura 22 B y C).

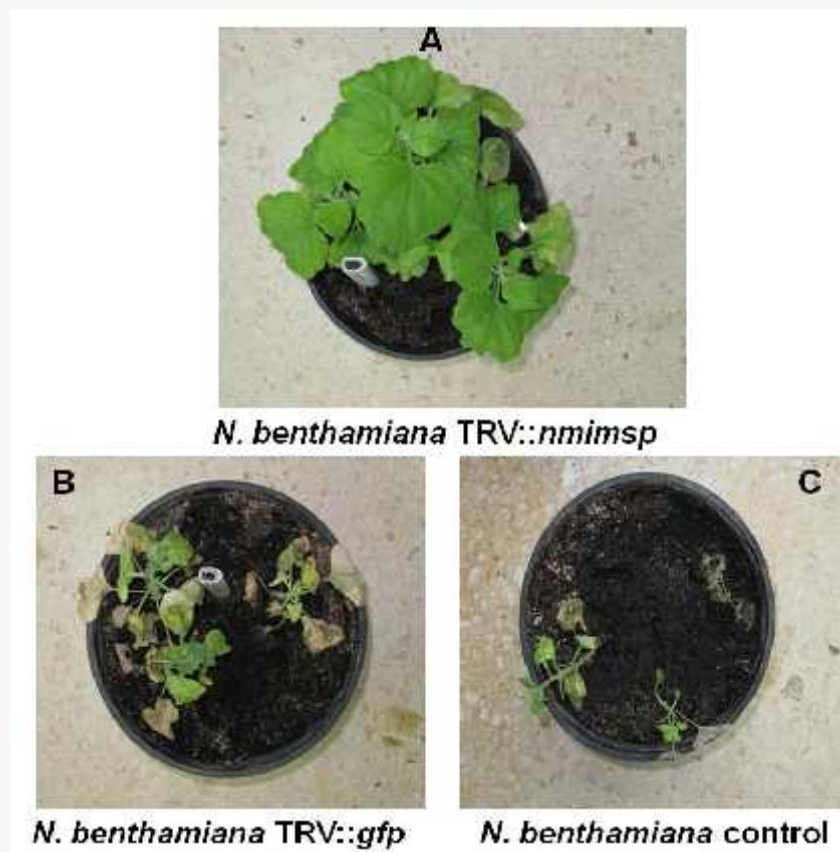


Figura 22. Síntomas de la enfermedad *pata prieta* a los 10 d después de la inoculación con *P. nicotianae*. **A:** *N. benthamiana* agroinfiltrada con TRV::nmimsp; **B:** *N. benthamiana* agroinfiltrada con *gfp*, **C:** *N. benthamiana* fenotipo normal o salvaje.

En plantación, las afectaciones por *pata prieta* en tabaco son diferentes. Las plantas se marchitan durante el periodo más caluroso del día y se recuperan

durante la noche (Fernández, 1998). El patógeno, después de afectar a la raíz, avanza hacia el tallo, llegando a una altura entre los 15-20 cm, la médula se seca y se separa formando discos, el marchitamiento se torna progresivo y se produce la caída de las hojas, las pérdidas en el cultivo, en estas condiciones son elevadas. En *P. nicotianae* se han descrito cinco razas fisiológicas (0, 1, 2, 3, 4) y son definidas por su habilidad de infectar cultivares con diferentes genes de resistencia (Sullivan y col, 2005). En esta investigación se utilizó el aislado PpnITT223 de la raza 0. La especialización fisiológica para *P. nicotianae* fue informada por primera vez por Apple (1962), quien denominó raza 0 a los aislamientos que no son patogénicos de la especie *Nicotiana plumbaginifolia* y a líneas derivadas de ésta. La raza 1 es considerada la mas destructiva y además es muy patogénica a *N. plumbaginifolia* (Li y Bass, 2006). En Cuba no ha sido identificada la raza 1, sin embargo si está comprobada la raza 0 (Peñalver, 1983). Una de las características de *P. nicotianae* (Oomycetes) que la diferencia de los hongos verdaderos, lo constituye la presencia de los β glucanos y la celulosa en su pared celular y dos tipos de flagelos. Además, su reproducción sexual es por oosporas. Por estas razones se encuentran mas relacionados con las algas pardas y las diatomeas que con los hongos verdaderos (Rossman y Palm, 2006). Las oosporas pueden sobrevivir en el suelo durante años y en ausencia del material vegetal permite al patógeno reproducirse (Attard y col, 2008). Sin embargo, su estructura vegetativa más importante es el micelio, sin septos, donde se desarrollan los esporangios y de ellos se liberan las zoosporas. Estas presentan determinadas glicoproteínas que se adhieren a las regiones mas apicales de las raíces, iniciando el proceso de infección (Attard y col, 2008). Posteriormente, se desarrolla el tubo germinativo que penetra en los espacios intercelulares y el

apoplasto del hospedante formando el haustorio. El patógeno comienza a producir una serie de enzimas hidrolíticas (llamadas CAZyme) que tienen la función de degradar la pared celular del hospedero. Estas proteínas son glicosidasas, polisacárido-liasas, carbohidrato-esterasas, glicosil-transferasas, entre otras (Blackman y col., 2014) y junto con otras biomoléculas constituyen las proteínas efectoras del patógeno. El apoplasto celular del hospedante es el espacio donde ocurren las interacciones primarias con el patógeno. Por tanto, los efectores del mismo realizan diversas funciones, entre las que se encuentran, la inactivación de las proteínas de la patogénesis (PR) y de resistencia de la planta (Kamoun y Saunders., 2013). Las proteínas EPIC1 y EPIC2b secretadas al apoplasto por *P. infestans* durante su infección neutralizan las cisteíno-proteasas PIP1, RC3 y C14 de tomate y papa (Kamoun., 2006). Una función similar realizan GIP1 y GIP2, proteínas de *P. sojae*, ya que presentan actividad inhibitoria contra las glucanasas de la planta. Los efectores de los patógenos, del tipo *Oomycetes*, como *P. nicotianae* han evolucionado para resistir el ambiente reductor de la planta, que activa sus primeros mecanismos de defensa expresando proteasas e inhibidores (Pais y col., 2013). El repertorio de moléculas efectoras en estos patógenos no solo es diverso, sino que actúa a diferentes niveles, tales como, el citoplasma celular, los organelos y el núcleo. Las proteínas tóxicas como Nep1, elicinas (CBEL, Pep13, Pcf) y NPP1 son ejemplos de biomoléculas moduladoras de la resistencia de la planta, descritas en *Oomycetes* y la mayoría informadas en *P. nicotinae* (Kamoun, 2007). Otro patógeno del tipo *Oomycete* importante para el cultivo del tabaco es el biótrofo *Peronospora hyoscyami* f. sp *tabacina*, agente causal de la enfermedad el *moho azul* en *N. tabacum*. La presencia de este patógeno en cada campaña tabacalera provoca anualmente pérdidas económicas

importantes entre los productores del cultivo. Por este motivo se decidió evaluar la resistencia de las plantas de *N. benthamiana* expresando el gen *nmimsp* frente a *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*, además se utilizó como control las plantas de fenotipo normal y además se expresó el gen *gfp* en este hospedero.

3.6.3. Evaluación de la prueba de resistencia a frente a *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* en plantas de *N. benthamiana* expresando el gen *nmimsp*.

Un resultado similar, al obtenido en el experimento anterior con *P. nicotianae*, se produjo con la inoculación del aislado PhtIIT324, de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*. Las plantas agroinfiltradas con la construcción PVX::*nmimsp* no presentaron síntomas de la enfermedad en sus hojas y no se observaron decoloraciones del pigmento clorofílico (Figura 23). Sin embargo, el resto de las plantas mostraron síntomas de la enfermedad, tanto las plantas con la construcción PVX::*gfp* como las controles exhibieron decoloraciones notables de color amarillo en los sitios donde se les realizó la inoculación del patógeno (Figura 23). La severidad de la enfermedad se estimó de acuerdo a la escala propuesta por Reuveni y col., 1983, teniendo en cuenta los síntomas observados en las hojas afectadas. La decoloración foliar en los primeros momentos de la infección del patógeno se conoce como periodo de incubación y se define como el número de días necesarios para que se observen los síntomas. Las plantas que expresaron el gen *nmimsp* (PVX::*nmimsp*) no presentaron afectaciones y se mantuvieron sanas durante el tiempo de evaluación, estas plantas mostraron diferencias muy significativas con respecto al resto. La severidad de la enfermedad, en sus primeros estadios, en las plantas controles y en las que expresan el gen *gfp*

fueron elevadas. Ambos tratamientos mostraron un grado 4 de afectación en la escala de Reuveni y col., 1983, lo que representa un daño foliar de entre el 75-100%, (Figura 24).

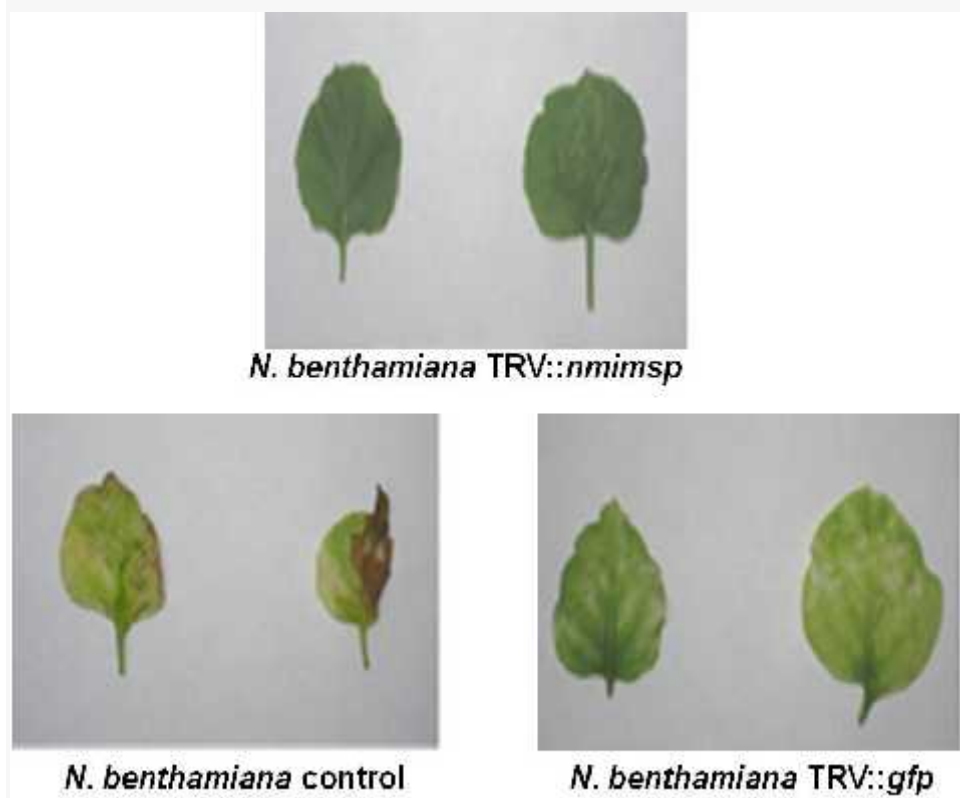


Figura 23. Hojas de *N. benthamiana* mostrando síntomas de decoloración y necrosis a los 10 d en las zonas donde se inoculó el aislado PhtIT324 de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*. En las hojas de *N. benthamiana* con la construcción PVX::nmimsp fueron observadas afectaciones y se mantuvieron sanas durante el periodo de evaluación del experimento (10 d).

Peronospora hyoscyami f. sp. *tabacina*. Es un biótrofo obligado, que requiere del tejido vivo del hospedante para completar su ciclo de vida (Wolf y col., 1934; Lucas, 1975) y es capaz de infectar otras especies de *Nicotiana* spp (Lucas, 1980; Johnson, 1989). Forma estructuras sexuales y asexuales, denominadas oosporas y esporangiosporas respectivamente. Los síntomas característicos de la enfermedad del *moho azul del tabaco* producido por el *Oomycete* son la

decoloración amarilla, la reducción acopada de las hojas en plantas jóvenes, las cuales eventualmente adquieren una coloración marrón y mueren.

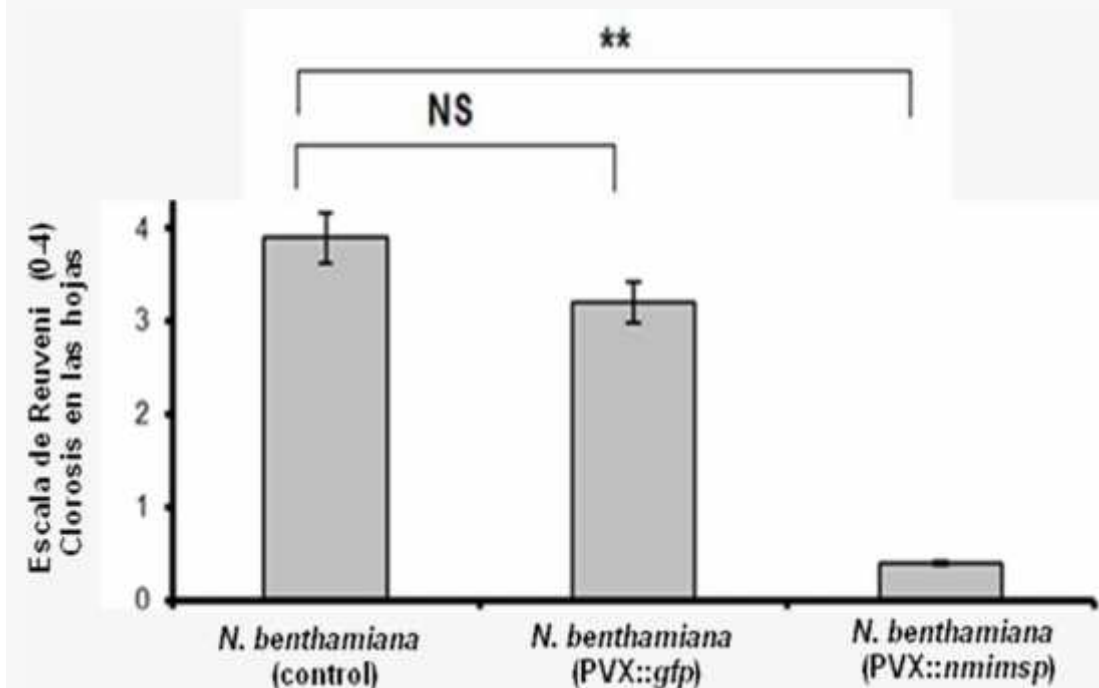


Figura 24. Evaluación del periodo de incubación del aislado PhtIIT324 de *P. hyoscyasmi* f. sp. *tabacina* por la escala de Reuveni (0-4) en plantas de *N. benthamiana* que expresan el gen *nmimsp* (PVX::nmimsp), *gfp* y las plantas control de fenotipo normal a los 10 d. Las barras representan los valores de la media (N=10; +/- DE). Las diferencias significativas (ANOVA) fueron determinadas por la prueba de rangos múltiples de Duncan ($P < 0.01$). NS: no significativo. **: $P < 0.01$.

En las plantas adultas se observan manchas amarillas en hojas, presencia de manchas de color marrón y esporulaciones que se localizan en el envés de la hoja y cuando el signo es muy evidente los esporangios pueden localizarse en todas las áreas foliares y en las regiones cercanas a la flor (Kucharek, 2001). En las plantas de *N. benthamiana* inoculadas con el aislado PhtIIT324 fueron observadas las decoloraciones amarillas a los 10 d. Estos síntomas coinciden con los descritos para las infecciones del patógeno en algunas especies de *Nicotiana* y se corresponde con su periodo de incubación en el hospedante (Cline, 2009).

Existen informes sobre la existencia de diferentes razas en este patógeno, pero su descripción ha sido controversial. En 1964 se propuso que los aislados patogénicos **APT1** de especies de *Nicotiana* spp, incluyendo a *Nicotiana tabacum*, se consideraron *formae specialis* de *Peronospora hyoscyami* (Cline, 2009). Posteriormente, en 1970, se diferenciaron dos formas especiales **APT2** y **APT3**, capaces de infectar un amplio grupo de especies de *Nicotiana* spp. La primera, se denominó *Peronospora hyoscyami* f sp. *hybrida* que infecta a *N. hybrida* y la segunda *Peronospora hyoscyami* f sp. *velutina*. No obstante, éstas no se han considerado como razas (Cline, 2009). Aunque el patógeno presenta un hospedante ideal en la *Nicotiana tabacum*, otras especies han sido susceptibles a su infección, entre ellas podemos citar: *Nicotiana benthamiana*, *N. sylvestris*, *N. repanda*, *N. attenuata*, *N. suaveolens*, *N. langsdorffii*, *N. tomentosa*, *Capsicum annuum*, *Solanum lycopersicum*, *S. melongena* y *S. nigrum* (Mordue., 1989). *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* establece una relación de dependencia, como biótrofo obligado que es, con sus hospedantes. Al igual que *P. nicotianae*, forma el haustorio como estructura alimentación, pero recientemente, existen evidencias, de que esta estructura transloca y secreta hacia el citoplasma del hospedante proteínas efectoras que modulan su respuesta de defensa (Petre y Kamoun., 2014). Recientemente, se ha secuenciado el genoma de dos aislados de *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* (Derevnina y col., 2015). De estos, se lograron identificar un gran número de genes que codifican para efectores del patógeno y proteínas involucradas en el mecanismo de infección. Aproximadamente se encontraron 120 efectores tipo RxLR-dEER, 6 del tipo CRN (efectores de acción intracelular asociados al núcleo de la planta) y 61 con dominios proteicos del tipo WY (Derevnina y col., 2015). Las secuencias comparadas con la base de datos

demostraron la proximidad filogenética con el género *Phytophthora* y *Hyaloperonospora*, sin embargo, la interacción *Nicotiana* y *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina* requiere investigaciones de mayor profundidad para su verdadera comprensión. No obstante se han descrito algunas respuestas específicas de defensa, en determinados hospedantes, frente a la infección de este patógeno. Las investigaciones de Kroumova y col., (2007) informan de la secreción de proteínas llamadas T- filoplaninas, por los tricomas de la superficie aérea de las hojas de *N. tabacum*, estas presentan actividad inhibitoria sobre la germinación de este *Oomycete*. Los esporangiósforos y las esporangiosporas, del patógeno emergen a través de los estomas, pero se determinó, que son inhibidos por la acción del β -ionona (Schiltz 1974; Salt y col., 1986), el cual es un terpenoide volátil, sintetizado por las plantas a partir de los carotenoides (Simkin y col., 2004). Ensayos mediante el empleo del cultivar de tabaco KY14, que contiene el gen N, revelaron que la inoculación inicial con VMT (*tobacco mosaic virus*)T en las hojas inferiores, incrementó la actividad de las glucanasas β -1-3 de la familia (PR-2), lo cual indujo una respuesta sistémica adquirida (SAR) en contra del *Oomycete* (Ye y col., 1990). Posteriormente, se demostró que la expresión de las PR-2 en plantas transgénicas confirió un alta protección a las plantas transformadas contra este patógeno (Ryals y col., 1996; Lusso y Kuc 1996). En *Nicotiana megalosiphon* se confirmó que la ausencia de los genes EIL2 y GST comprometen la resistencia de este hospedante a *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina* (Borras y col., 2006).

3.7. Inmuno-detección por electrotransferencia (*Western Blot*) de la proteína NmIMSP en extractos vegetales de *Nicotiana benthamiana* que expresan el gen *nmimsp*.

La proteína NmIMSP relacionada con inhibidores de proteasas en plantas se detectó en extractos vegetales de *N. benthamiana* que expresaron el gen *nmimsp* (PVX::*nmimsp*) mediante un anticuerpo que detecta la cola de histidina fusionada a la proteína (Figura 25). La fusión His-NmIMSP se identificó entre las proteínas totales de la planta lo cual evidencia la eficiencia de la agroinfiltración (PVX::*nmimsp*) y la expresión de *nmimsp* en *N. benthamiana*. La fusión proteica mostró un peso similar al previsto teóricamente, superior a los 11 kDa, sobre todo, influye la ganancia en el peso molecular de los 6 aminoácidos de la histidina (Figura 25). En conclusión se observó una fuerte expresión de gen *nmimsp* en las plantas de *N. benthamiana*. La expresión temporal se observó con la inmuno-detección de la cola de histina fusionada a la proteína NmIMSP; mientras que en las plantas controles (Nb) no hubo señal detectable.

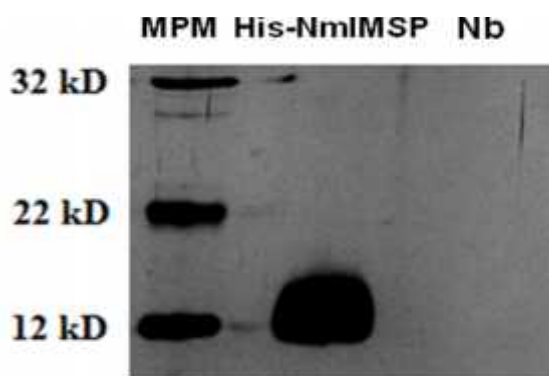


Figura 25. Membrana de *Western Blot* donde se observa la detección de la proteína NmIMSP con cola de histidina en las proteínas totales de las plantas de *N. benthamiana* que expresan el gen *nmimsp*. MPM: marcador de peso molecular de proteínas; His-NmIMSP, producto del gen *nmimsp* fusionado a la cola de 6 histidina; Nb, proteínas totales de plantas de *Nicotiana benthamiana* de fenotipo normal o salvaje.

La planta desarrolla un sistema defensivo basada en la expresión de muchos genes que codifican para proteínas con funciones anti-patogénicas. Entre ellas se encuentran los inhibidores de proteasas, los cuales actúan contra enzimas, proteasa y efectores del patógeno. Los inhibidores de proteasas en plantas forman parte de las proteínas PR, las cuales están relacionadas con la activación de la respuesta ROS (estallido oxidativo y la presencia de especies reactivas del oxígeno), el reconocimiento de efectores mediante los genes R, la transducción de señales al núcleo celular, la expresión de genes relacionados con las respuesta HR y la regulación de la respuesta hormonal (SA, ET, JA), (Jones y Dangl, 2006). El producto de un gen R en la planta que reconozca específicamente a una proteína avr del patógeno (efector) asegura la resistencia de la planta, a través de una respuesta en corto tiempo y robusta (Agrios, 2005). Sin embargo, la protección de esta planta (cultivar) está determinada por un solo gen R, por tanto, la resistencia es monogénica y no es durable en el tiempo, ya que, si el patógeno experimenta un cambio evolutivo en el gen que codifica para el efector, esta proteína R no podrá reconocer al efector y por tanto la planta exhibirá un fenotipo susceptible (Agrios, 2005). Lo antes mencionado, conduce al criterio de que el desarrollo de la resistencia cuantitativa es una vía alternativa en el control de plagas y enfermedades de plantas, debido fundamentalmente, a que este tipo de resistencia no depende de un solo gen, sino de la sumatoria de un grupo de estos, que asegura una protección de campo durante un tiempo mas prolongado (Agrios., 2005). Hay menos probabilidad de que en la población de una especie patógena ocurran un sinnúmero de cambios a corto plazo, por ello, la resistencia poligénica ofrece una mayor seguridad al fito-mejorador. Por tal motivo, es importante conocer qué genes son los que influyen en este tipo de

resistencia, ya que su aplicación aseguran la protección de amplio espectro a diferentes razas, patovares, biotopos o a diferentes aislados de una misma especie de patogenicidad variable. Entre las proteínas de la resistencia poligénica de mayor aplicación para una protección estable en campo se encuentran los inhibidores de proteasas (Habib y Fazil., 2007). Estos se han utilizado en la transformación de cultivos, creando cultivares resistentes, sobre todo frente a plagas de insectos (Habib y Fazil., 2007) y además, como marcadores moleculares de especies con resistencia poligénica (Feldman y col., 2014). Existen numerosas investigaciones que informan la expresión de genes heterólogos que codifican para inhibidores de proteasas en plantas de arroz, tabaco, papa, pimiento, algodón, etc. Inhibidores de proteasas de *N. alata*, que se expresan en tabaco transgénico exhiben elevada resistencia frente a *Botrytis cinerea* (Sels y col., 2008). Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones van dirigidas a obtener cultivares resistentes a insectos, como la transformación de plantas de algodón expresando inhibidores de proteasas de papa, clase I y II para el control de las plagas de *Helicoverpa punctigera* y *Helicoverpa armígera* (Dunse y col., 2010). Un inhibidor de proteasas del tipo serino (BvSTI) aislado de la especie *Beta vulgaris* fue transformando en plantas de *Nicotiana benthamiana* y se observó, que era capaz de controlar las larvas de insectos-plagas como *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera exigua* y *Manduca sexta* (Smigocki 2013). En las investigaciones de Alvarez-alfageme y col. (2011), se obtiene la resistencia de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* debido a la expresión del inhibidor de proteasa del tipo serino AtSerp1 contra dos insectos patógenos, *Spodoptera littoralis* y el ácaro *Acyrtosiphon pisum*. Otras investigaciones purifican el inhibidor y realizan ensayos *in vitro* contra diferentes patógenos (Dunaevsky y

col., 2004; Kim y col., 2005; Valdés-Rodríguez y col., 2010, Lu y col., 2003; Pernas y col., 1999; Soares-Costa y col., 2002; Haq y col., 2004; Valueva y col., 2004). Por ejemplo, los inhibidores de tripsina de semillas purificadas de *Triticum aestivum* suprimen la germinación de esporas y el crecimiento del micelio, en los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* respectivamente (Dunaevsky y col., 2004; Kim y col., 2005). Además, inhibidores de quimotripsina de tubérculos de papa suprimen el crecimiento y desarrollo de *Phytophthora infestans* (Valueva y col., 2003; Valueva y col., 1998; Woloshuk y col., 1991). Inhibidores de proteasas del tipo cisteína en *Pennisetum glaucum* retarda notablemente el crecimiento de hongos patógenos, incluyendo a *Trichoderma reesei* (Joshi y col., 1998). Por otra parte, los genes de la resistencia poligénica pueden ser considerados como marcadores moleculares en las especies de plantas y su identificación, constituye una herramienta importante en la selección de progenitores con una resistencia estable y duradera en el tiempo, (Draffehn y col., 2013). En tal sentido, los genes StAOS1 y StAOS2 que codifican para las isoformas de la Aleno-Oxido-Sintasa, una enzima involucrada en la síntesis del jasmonato, en *Solanum tuberosum* están asociados a la resistencia poligénica contra *P. infestans* (Draffehn y col., 2013). De este modo, PLPKI es un inhibidor de proteasa del tipo serino, aislado de papa y con actividad biológica contra *P. infestans* y *Rhizoctonia solani* (Feldman y col, 2014). Los cultivares de papa más resistentes a *P. infestans* expresaron con mayor concentración el inhibidor PLPKI, al contrario de lo más susceptibles, que expresaron a bajos niveles este gen (Feldman y col, 2014). Las diferencias en cuanto a la expresión del inhibidor en estos cultivares determinaron la supervivencia de los que mas expresaron a PLPKI frente al *Oomycete*. En la planta de *N. benthamiana* se

demuestra la presencia de la proteína NmIMSP, relacionada con inhibidores de proteasas, en los órganos de la planta mediante un anticuerpo que reconoce una cola de histidina fusionada con el inhibidor. Las diferencias aminoacídicas entre los inhibidores TIMP A, TIMP B y NmIMSP son escasas, esta última podría considerarse una isoforma de las anteriores, sin embargo, las diferencias en los niveles de expresión de estos genes podrían determinar la resistencia o la susceptibilidad frente a *P. nicotinae*. Por otra parte, la activación de los genes podría estar determinada por el tipo de interacción, ya que TIMP A y B se expresan en presencia del VMT en *N. tabacum*, mientras que *nmimsp* se activa en *N. megalosiphon* frente a *P. nicotianae*. Existe la posibilidad de que otras especies y cultivares de tabaco resistentes a *pata prieta* presenten genes homólogos a *nmimsp* y con una expresión similar a la de *N. megalosiphon*. La evaluación funcional de este gen en estas plantas podría reforzar la idea de utilizar el mismo como marcador molecular de la resistencia poligénica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Se demostró que la biblioteca de ADNc a partir de la interacción entre *N. megalosiphon* y *P. nicotianae* produjo un perfil de expresión de 1,426539 genes, de ellos 21676 mostraron un cambio notable en su regulación génica.
2. En la interacción de *N. megalosiphon* con *P. nicotianae* se determinó que un total de 1301 genes fueron regulados positivamente, de ellos 5 secuencias de ADNc de 26 pb (Tag, 49066, Tag 32716, Tag 14613, Tag 78459 y Tag 2318) fueron relacionadas con genes que codificaron para inhibidores de proteasas en plantas.
3. Se comprobó que el Tag 49066 presentó los mayores niveles de expresión en el tiempo y en los órganos de la planta, excepto en las primeras 24 h donde fue mayor en la hojas de *N. megalosiphon*.
4. Se estableció que la secuencia completa del gen *nmimsp* (Tag 460066) presentó un total de 324 pb y codificó para una proteína de 107 aminoácidos nombrada NmIMSP y con un péptido señal teórico en la posición 22.

5. Se determinó, filogenéticamente que la proteína NmIMSP mostró una alta homología con los inhibidores de proteasas de las especies de *Nicotiana* spp, en particular TIMP A (92%) y TIMP B (95%) y una menor identidad genética con las especies del género *Solanum* spp (50-40%).
6. Se determinó que la proteína NmIMSP está relacionada con los inhibidores de proteasas de *Solanum tuberosum* de tipo I, perteneciente al Clan IG, Familia I13, y se estimó su peso molecular y punto isoelectrico en 11788,9 Da y 7,81 respectivamente.
7. Se comprobó que las plantas de *N. megalosiphon* que perdieron la capacidad funcional del gen *nmimsp* fueron más susceptibles a la incidencia de la enfermedad *pata prieta*.
8. Se comprobó que las plantas de *N. benthamiana* que ganaron temporalmente la capacidad funcional del gen *nmimsp* mostraron altos niveles de resistencia frente a la incidencias de las enfermedades de *pata prieta* y el *moho azul del tabaco*.

RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios bioquímicos in vitro de la proteína NmIMSP para determinar su efectividad enzimática frente a proteasas de origen fitopatogénico.
2. Realizar una búsqueda del gen *nmimsp* o sus homólogos en el germoplasma de tabaco y en los cultivares comerciales de tabaco negro cubano y corroborar su expresión con la resistencia de los mismos.
3. Comprobar la protección del inhibidor NmIMSP en especies y cultivares de tabaco susceptibles a *Oomycetes* y que sean importantes para el mejoramiento genético.
4. Aplicar y validar la utilización del gen *nmimsp* como marcador de la resistencia poligénica para el mejoramiento genético del cultivo del tabaco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios GN. Plant Pathology. 2005. 5th Edition. Academic Press, San Diego, USA.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSIBLAST: A new generation of protein database search programs. 1997. *Nucleic Acids Res*; 25: 3389-3402.
- Alvarez-alfageme F, Maharramov J, Carrillo L, Vandenabeele S. Potential Use of a Serpin from *Arabidopsis* for Pest Control. 2011. *Pest Control*; 6: 208-218.
- Anon. 1990. Illustrated book of the Genus *Nicotiana*. Japan Tobacco Inc. *Plant Breeding and Genet. Res. Lab.*, Tokyo
- Apple JL. Physiological specialization with *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. 1962. *Phytopathology*; 52: 351-392.
- Attard A, Gourges M, Galiana E, Panabieres F, Ponchet M, Keller H. Strategies of attack and defense in plant – oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn . *P . Nicotianae* Breda de Haan). 2008. *Journal of Plant Physiology*; 165: 83-92.

- Avesani L, Marconi G, Morandini F, Albertini E, Bruschetta M, Bortesi L, Pezzotti M, Porceddu A. Stability of Potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. 2007. *Transgenic Research*; 16: 587-597.
- Bahman B, Erickson R, Chuthamat A, Goodwin H. Differential expression of eight defensin genes of *N. benthamiana* following biotic stress, wounding, ethylene and benzothiadiazole treatments. 2009. *Plant Cell Reports*; 12: 703-717.
- Baulcombe DC. RNA Silencing in Plants. 2004. *Nature*,. 431: 356-363.
- Bilgin D, Zavala J, Zhu A, Clough S, Ort J, Delucia H. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. 2010. *Plant Cell Environ.*; 33: 1597–1613.
- Blackman L and Hardham A. Regulation of catalase activity and gene expression during *Phytophthora nicotianae* development and infection of tobacco. 2008. *Molecular Plant Pathology*; 9: 495-510.
- Blackman LM, Arikawa M, Yamada S. Identification of a Mastigoneme Protein from *Phytophthora nicotianae*. 2011. *Protist*; 1: 100-114.
- Blackman LM, Cullerne DP, Hardham AR. Bioinformatic characterisation of genes encoding cell wall degrading enzymes in the *Phytophthora parasitica* genome. 2014. *BMC Genomics*; 15: 785-.795.
- Boller T, Felix GA. Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. 2009. *Annu. Rev. Plant Biol.*; 60: 379–406.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borrás H, Chacón O, González M, Portieles R, González E, Pujol M. High protection of protein kinase NtPK against the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. 2012. *Biotechnol Apl.*; 29: 279-281.
- Borrás O, Thomma BPHJ, Collazo C, et al. EIL2 transcription factor and glutathione synthetase are required for defense of tobacco against tobacco blue Mold. 2006. *Mol Plant Microbe Interact.*; 19: 399-406.
- Borrás O, Thomma, Silva Y. Chacón O, Pujol M. Pathogen profile Tobacco blue mould disease caused by *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. *Molecular Plant Pathology*; 2010; 11: 13-18.
- Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 1976. *Anal. Biochem.*; 72: 248–254.
- Bricchi I, Berteaux CM, Occhipinti A, Paponov IA, Maffei ME. Dynamics of membrane potential variation and gene expression induced by *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, and *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. 2013. *PLoS One*; 7: 10-16.
- Carrillo L, Herrero I, Cambra I, Sánchez-Mongeb, Diaz I, Martinez M. Differential in vitro and in vivo effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganism. 2011. *Plant Physiology et Biochemistry*; 49: 1191-1200.
- Chacon O, Hernandez I, Portieles R, Lopez Y, Pujol M, Borrás-Hidalgo O. Identification of defense-related genes in tobacco responding to black shank disease. 2009. *Plant Sci.*; 177(3): 175-180.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chacón O., I, Hernández, R. Portieles, Y. López, M. Pujol, O. Borrás-Hidalgo. Identification of defense-related genes in tobacco responding to black shank disease. 2009. *Plant Science.*; 177: 175-180.
- Chakravarthy S, Velásquez AC, Ekengren SK, Collmer A, Martin GB. Identification of *Nicotiana benthamiana* Genes Involved in Pathogen-Associated Molecular Pattern – Triggered Immunity. 2010. *Mol Plant Microbe Interact.*; 23: 715-726.
- Chaparro-Garcia A, Wilkinson RC, Gimenez-Ibanez S, Findlay K, Coffey MD, Zipfel C, Rathjen J, Kamoun S, Schornack S. The Receptor-Like Kinase SERK3/BAK1 Is Required for Basal Resistance against the Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. 2011. *PLoS ONE.*; 6: 1-10.
- Cheng-Guo D, Chun-Han W, and Hui-Shan G. Application of RNA silencing to plant disease resistance. 2012. *Silence.*; 3: 1-8.
- Chisholm ST, Coaker GD, Staskawicz BJ. Host—microbe interactions shaping the evolution of the plant immune response. 2006. *Cell.*;124: 803-814.
- Cline E. *Peronospora hyoscyami*. 2009. Nomenclature Fact Sheets. *Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*. (Online). ARS, USDA. <http://nt.ars-grin.gov/sbmlweb/onlineresources/>
- Coll NS, Epple P, Dangl JL. Programmed cell death in the plant immune system. 2011. *Cell Death Differ.*; 18: 1247-1256.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, Terol J, Talon M, Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. 2005. *Bioinformatics*; 21: 3674 –3676.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. 2004. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*; 22: 299-305.
- Csinos AS. Stem and root resistance to tobacco black shank. 1999. *Plant Dis.*; 83: 777-780.
- Derevnina L, Reyes MF, Wood K, Froenicke L, Spring O, Michelmore R. Genome sequence and architecture of the Tobacco downy mildew pathogen, *Peronospora tabacina*. 2015. *MPMI.*; 5: 11-15.
- Diana G, Piccirillo P. 1993. La *Peronospora* sistémica del tabaco. 1993. *Informatore Fitopatologico.*; 4: 25-31.
- Dodds PN, Rathjen JP. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. 2010. *Nature Publishing Group.*;11: 539-548-
- Draffehn L, Krezdorn N, Ding J, Lübeck J, Strahwald J, Muktar M, Walkemeier B, Rotter B, Gebhardt C. Comparative transcript profiling by *SuperSAGE* identifies novel candidate genes for controlling potato quantitative resistance to late blight not compromised by late maturity infection. 2013. *Frontiers in Plant Science*; 4: 1-21.
- Dunaevsky YE, Elpidina EN, Vinokurov KS, Belozersky MA. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. 2004. *Mol Biolog.*; 39: 608-613.
- Dunse K, Stevens J, Lay T, Gaspar M, Heath R, Anderson M. Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. 2010. *PNAS*; 107: 15011–15015.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Egan MJ, Talbot NJ. Genomes, free radicals and plant cell invasion: recent developments in plant pathogenic fungi. 2008. *Current Opinion in Plant Biology*; 11: 367–372
- Eitas TK, Dangl JL. NB-LRR proteins: pairs, pieces, perception, partners, and pathways. 2010. *Current Opinion in Plant Biology*; 1: 1-6.
- Elliott PE, Lewis RS, Shew HD, Gutierrez WA and Nicholson JS. Evaluation of tobacco germplasm for seedling resistance to stem rot and target spot caused by *Thanatephorus cucumeris*. 2008. *Plant Disease*; 92: 425-430.
- Erwin C. and Ribeiro K. *Phytophthora Diseases Worldwide*. 1996. Eds American Phytopathological Society, St. Paul, MN, U.S.A.
- Espino E, Rey X, Pino AL, Quintana G, Peñalver N. y Baños C. *Habana Vuelta Arriba* variedad de tabaco negro para el cultivo en la región central y oriental de Cuba. 1999. *Cubatabaco*; 1: 40-44.
- Espino E. Dos nuevas variedades de tabaco Negro resistentes al moho azul (*Peronospora tabacina* Adam.) y otras enfermedades de importancia económica en Cuba. 1996. Tesis de Maestro en Ciencias. Facultad de Biología. Universidad de La Habana.
- Espino EM (2009) Guía para el cultivo del tabaco. 2009. Agrinfor (MINAG). La Habana, Cuba.
- Espino EM. 2010. Subdirección Técnico-Productiva del Instituto de Investigaciones del Tabaco- comunicación personal. Fecha 22 de enero de 2010.
- Espino EM. El mejoramiento genético del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) en Cuba. Boletín de reseñas. 1988. *Cubatabaco*. 14: 1-59.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Espino EM. Manual práctico el supervisor agrícola del tabaco. 2006. Eds (2). Agrinfor (MINAG). La Habana, Cuba.
- Eulgem T. Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. 2005. *Trends Plant Sci.*; 10: 71-78.
- FAO. Estadísticas de Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2013. *FAOSTAT*. <http://faostat.fao.org/site/567/>.
- Farady CJ, Craik CS. Mechanisms of macromolecular protease inhibitors. 2010. *ChembioChem*; 11: 2341-2346.
- Farina A, Rocchi V, Janni M, Benedettelli S, De Lorenzo G, D'Ovidio R. The bean polygalacturonase-inhibiting protein 2 (PvPGIP2) is highly conserved in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm and related species. 2009. *Theor Appl Genet.*; 118 (7): 1371-1379.
- Federici L, Caprari C, Mattei B, Savino C, Di Matteo A, De Lorenzo G, Cervone F and Tsernoglou D. Structural requirements of endopolygalacturonase for the interaction with PGIP (polygalacturonase-inhibiting protein). 2001. *PNAS*; 98 (23): 13425-13430.
- Feldman M, Andreu A, Candela S, Huarte L, Walling L and Daleo G. PLPKI: a novel serine protease inhibitor as a potential biochemical marker involved in horizontal resistance to *Phytophthora infestans*. 2014. *Plant Breeding*; 133(2): 275-280.
- Feldman ML, Oliva CR, Casalongue CA, and Daleo GR. Induction of a proteinase K inhibitor in a potato cultivar with a high degree of field

- resistance against *Phytophthora infestans*. 2000. *Physiol.Plant.*; 109(1): 14-20.
- Fernandez-Pozo N, Menda N, Edwards JD, Saha S, Tecle IY, Strickler SR. The Sol Genomics Network (SGN) - from genotype to phenotype to breeding. 2015. *Nucleic Acids Res.*; 43. 1036-1041.
 - Fillers E. Blue mold in tobacco. 2004. Dirección on line. [http://www.cocke.xtn.net/local/profitable_farming./Page 11 pdf](http://www.cocke.xtn.net/local/profitable_farming./Page_11.pdf).
 - Frackman BS, D P, Ekenberg S. Fluorescent Real-Time PCR. Simplified Technology: A New Chemistry for Real-Time PCR. 2005. *Promega Notes*: 90.
 - García V, Mena E, Santana N, Hernández B. Nuevas variedades de tabaco negro productoras de capa y capote, resistentes a las principales enfermedades. 2002. *Cubatabaco*; 3(2): 48-53.
 - Geoffroy P, Legrand M, Fritig B. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinase induced during hypersensitive reaction of tobacco to Tobacco Mosaic Virus. 1990. *Mol Plant Microbe Interact.*; 3(5): 327-333.
 - Giavalisco P, Nordhoff E, Lehrach H, Gobom J, Klose J. Extraction of proteins from plant tissues for two-dimensional electrophoresis analysis. 2003. *Electrophoresis*; 24 (2): 207–216.
 - Gilardoni PA, Schuck S, Jüngling R, Rotter B, Baldwin I, Bonaventure G. *SuperSAGE* analysis of the *Nicotiana attenuata* transcriptome after fatty acid-amino acid elicitation (FAC): identification of early mediators of insect responses. 2010. *BMC Plant Biology*; 10(66): 1471-2229.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gohre V, Robatzek S: Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. 2008. *Annu Rev Phytopathol.*; 46:189-215.
- Goodspeed TH. The genus *Nicotiana*: origins, relationships, and evolution of its species in the light of their Distribution, morphology, and cytogenetics. 1954. *Chronica Botanica*; 16: 1-6.
- Habib H, Fazili KM. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. 2007. *Molecular Biology*; 2(3): 68-85.
- Haq SK, Atif SM, Khan RH. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests and pathogens: natural and engineered phytoprotection. 2004. *Arch Biochem Biophys.*; 431(1): 145-159.
- Hardham AR. The asexual lifecycle in Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools. 2009. Eds. Wiley-Blackwell. 93-119.
- Hartl M, Ashok G, Harleen K, and Baldwin T. The multiple functions of plant serine protease inhibitors. 2011. *Plant Signal. Behav.*; 6(7): 1009-1011.
- Heist EP, Nesmith WC and Schardl FG. Interactions of the tobacco mildew pathogen *P. tabacina* with host roots. 2000. *Phytopathology*. 90: 1-26.
- Heitz T, Geoffroy P, Stintzi A, Fritig B. cDNA cloning and gene expression analysis of the microbial proteinase inhibitor of tobacco. 1993. *J Biol Chem.*; 268(23): 16987-16992.
- Hellens P, Edwards E, Leyland R, Bean S, Mullineaux M. pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium* mediated plant transformation. 2000. *Plant Mol Biol*. 42(6): 819-832.
- Holmes S. Bootstrapping phylogenetic trees: theory and methods. 2003. *Statistical Science* 18(2): 241-255.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hoorn VDL, Kamoun S. From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. 2008. *Plant Cell*; 20(8): 2009-2017.
- Johnson GL. *Peronospora hyoscyami* De Bary: taxonomic history, strains and host range in Blue Mold of Tobacco. 1989. Eds. American *Phytopathological Society*, St. Paul, MN. 1-18.
- Jones DA, Takemoto D. Plant innate immunity direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. 2004. *Curr. Opin. Immunol.*; 16(1): 48-62.
- Jones JD and Dangl JL. The plant immune system. 2006. *Nature*; 444 (7117): 323-329.
- Joshi BN, Sainani MN, Bastawade KB, Gupta VS, Ranjekar PK. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: A new class of antifungal protein. 1998. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 246 (2): 382-387.
- Kamoun S. Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed. 2007. *Curr. Opin. Plant Biol.*; 10(4):358-365.
- Kamoun SA. Catalogue of the effector secretome of plant pathogenic Oomycetes. 2006. *Annu. Rev. Phytopathol.*; 44: 41-60.
- Kazan K, Lyons R. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. 2014. *Plant Cell*; 26(6): 2285-2309.
- Kim J, Park S, Kim M, Lim H, Park J, Hahm K. Antimicrobial activity studies on a trypsin–chymotrypsin protease inhibitor obtained from potato. 2005. *Biochem Biophys Res Commun.*; 330(3): 921-927.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. 1980. *J Mol. Evol.*; 16(2):111-120.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Kishore K. Monograph of tobacco (*Nicotiana tabacum*). 2014. *Indian Journal of Drugs*; 2(1): 5-23.
- Knief C. Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. 2014. *Front. Plant Sci.* 5: 1-23.
- Kou Y, Wang S. Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. 2010. *Curr. Opin. Plant Biol.*; 13 (2): 181-185.
- Kroumova, A. B., R. W. Shepherd, G. J. Wagner. Impacts of Tphylloplanin gene knockdown and of *Helianthus* and *Datura* phylloplanins on *Peronospora tabacina* spore germination and disease potential. 2007. *Plant Physiol.*; 144: 1843-1851.
- Krowarsch D, Cierpicki T, Jelen F, Otlewski J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. 2003. *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (11): 2427-2444.
- Kucharek, T. Common leaf diseases of flue cured tobacco. 2001. *Plant Pathology*. 15.
- L van der Hoorn. Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanisms. 2008. *Annu. Rev. Plant Biol.*; 59: 191-223.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 1970. *Nature*; 227(5259): 680-685.
- Laluk K, Mengiste T. Necrotroph Attacks on Plants: Wanton Destruction or Covert Extortion? 2010. *The Arabidopsis Book American Society of Plant Biologists.*; 8:e0136. doi:10.1199/tab.0136.
- Laskowski M, Kato I. Protein inhibitors of proteinases. 1980. *Annu. Rev. Biochem.*; 49: 593-626.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lawrence PK, Koundal KR. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. 2002. *Electron. J. Biotechnol.*, 5(1): 93-109.
- Lay FT, Brugliera F, Anderson MA. Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. 2003. *Plant Physiol.*; 131(3): 1283-1293.
- Lemke DE and Main CE. Distribution of *Nicotiana repanda* and *Peronospora tabacina* in Southern and Central Texas. A potential source of inoculums in blue mold disease of tobacco. 1990. USA: ed, C.E Main and H.W. Spurr. 179-182.
- Li B, Bass C. Resistance to tobacco Black Shank in *Nicotiana* species. 2006. *Crop. Sci.*; 46(2): 554-560.
- Liu Y, Schiff M, Czymmek K, Talloczy Z, Levine B, Dinesh- Kumar SP. Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. 2005. *Cell*; 121 (4): 567–577.
- Lu R, Martin-Hernández AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC. Virus-induced gene silencing in plants. 2003. *Methods*; 30(4):296-303.
- Lucas GB. The war against blue mold. 1980. *Science*; 210(4466): 147-153.
- Luo M, Ding LW, Ge ZJ, Wang ZY, Hu BL, Yang XB, Sun QY, Xu ZF. . The characterization of SaPIN2b, a plant trichome-localized proteinase inhibitor from *Solanum americanum*. 2012. *Int. J. Mol. Sci.*; 13(11): 15162-15176.
- Lusso M, Kuc J. The effect of sense and antisense expression of the PR-N gene for β -1, 3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. 1996. *Physiol Mol Plant Pathol.* 49: 267-283.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lyr H. In Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, Mechanisms of Action. 1995. Ed. Gustav Fischer. Jena. Alemania, 205-258.
- Main CE. The Blue Mold Disease of Tobacco. Technical Information. 2002.<http://www.ces.ncsu.edu/Dep/pp/bluemold/diagnosis/>. Consultado en diciembre del 2013.
- Mandar R, Arunima P, Indranil D, Prakash P, Kumar L. Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. 2009. Plant Cell Reports.; 28(2): 335-335.
- Manfredini C, Sicilia F, Ferrari S, Pontiggia D, Salvi G, Caprari C Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of Phaseolus vulgaris inhibits BcPG1, a polygalacturonase of Botrytis cinérea important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. 2005. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*; 67(2): 108–115.
- Matsumura H, Ito A, Saitoh H, Winter P, Kahl G, Reuter M, Kruger DH, Terauchi R. *SuperSAGE*. 2005. *Cell Microbiol.*; 7(1): 11-18.
- Matsumura H, Krüger DH, Kahl G, Terauchi R. *SuperSAGE*: a modern platform for genome-wide quantitative transcript profiling. 2008. *Current Pharmaceutical Biotechnology*; 9(5): 368-374.
- Matsumura H, Reich S, Ito A, Saitoh H, Kamoun S, Winter P, Kahl G, Reuter M, Krüger H, Terauchi R. Gene expression analysis of plant host–pathogen interactions by *SuperSAGE*. 2003. *PNAS.*; 100(26): 15718–15723.

- Matsumura H, Yoshida K, Luo S, Kimura E, Terauchi R. High-throughput *SuperSAGE* for digital gene expression analysis of multiple samples using next generation sequencing. 2010. *PLoS ONE*; 5(8): 1-8.
- Misas-Villamil JC, Hoorn RA. Enzyme–inhibitor interactions at the plant–pathogen interface. 2008. *Curr Opin Plant Biol*; 11(4): 380-388.
- Møller IM, Sweetlove LJ. ROS signalling – specificity is required. 2010. *Trends in Plant Science*; 15(7): 370-374.
- Mordue, JE. *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. 1989. *CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria*; 975: 1-2
- Mosolov VV, Loginova MD, Fedurkina NV, Benken II. The biological significance of proteinase inhibitors in plants. 1976. *Plant Sci. Lett.*; 7(2): 77-80.
- Mount DW. Bioinformatics Programming Using Perl and Perl Modules». *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*. 2004. Eds (2). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Narayan RD, Blackman LM, Shan W, Hardham AR. *Phytophthora nicotianae* transformants lacking dynein light chain 1 produce non-flagellate zoospores. 2010. *Fungal Genet. Biol.*; 47(8):663-671.
- Nasir HB, Takahashi Y, Ito A, Saitoh H, Matsumura H, Kanzaki H, Shimizu T, Ito M, Fujisawa S, Sharma PC. High-throughput in planta expression screening identifies a class II ethylene-responsive element binding factor-like protein that regulates plant cell death and non-host resistance. 2005. *Plant J.*; 43(4): 491–505.
- Nasir KH, Takahashi Y, Ito A, Saitoh H, Matsumura H, Kanzaki H, Shimizu T, Ito M, Fujisawa S, Sharma PC, Ohme-Takagi M, Kamoun S,

- Terauchi R. High-throughput in planta expression screening identifies a class II ethylene-responsive element binding factor-like protein that regulates plant cell death and non-host resistance. 2005. *Plant J.*; 43(4): 491-505.
- Nesmith WM. Controlling Kentucky's most destructive tobacco disease-black shank. 2001. *Kentucky Pest News*; 915: 1-10. http://www.uky.edu/Ag/kpn/pdf/kpn_915.pdf.
 - Olmstead RG, Bohs LA. Summary of molecular systematic research. 2007. *Acta Hort.*; 745: 255-268.
 - Ooijen GV, Burg HA, Cornelissen BJ, Takken FL. Structure and function of resistance proteins in Solanaceous plants. 2007. *Annu. Rev. Phytopathol.*; 45: 43–72.
 - Pais M, Win J, Kentaro Y, Graham J, Cano L, Raffaele S, Banfield M, Jones A, Kamoun S, Saunders. From pathogen genomes to host plant processes: the power of plant parasitic oomycetes. *Genome Biology*. 2013:1-10.
 - Paiva PM, Pontual EV, Coelho LC, Napoleão TH. Protease inhibitors from plants: biotechnological insights with emphasis on their effects on microbial pathogens. 2013. *Drug Delivery*; 12 (5): 641-649.
 - Pandiello C. Presencia del moho azul en la zona de Partido. 1958. *Agrotecnia.*; 12(1): 32-35.
 - Peñalver N. Razas fisiológicas de *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*. 1983. *Ciencia y Técnica en la Agricultura Tabaco*. 6: 47-64.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pérez P and Aguiar L.. Evidencia de resistencia al Metalaxil en cepas de *Peronospora tabacina* en Nicaragua. 1982. *Ciencia y Técnica de la Agricultura.*; 5(2): 5-15.
- Pernas M, López-Solanilla E, Sánchez-Monge R, Salcedo G, Rodríguez-Palenzuela P. Antifungal activity of a plant cystatin. 1999. *Mol Plant-Microbe Interact.*; 12 (7): 624-627.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H: SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. 2011. *Nat Methods.*; 8: 785-786.
- Petre B, Kamoun S. How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? 2014. *PLoS Biology.*; 12(2).
- PlantPIs. An Interactive Web Resource on Plant Protease Inhibitors.
<http://plantpis.ba.itb.cnr.it/> (Consultada 2013).
- Portieles R, Ayra C, Gonzalez E, Gallo A, Rodriguez R, Chacon O, Lopez Y, Rodriguez M, Castillo J, Pujol M, Enriquez G, Borroto C, Trujillo ., Thomma, P, Borrás- Hidalgo O. NmDef02, a novel antimicrobial gene isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers high-level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. 2010. *Plant Biotechnol. J.*; 8 (6): 678-690.
- Pridchard L and P. Birch. The zigzag model of plant-microbe interactions: is it time to move on? 2014. *Mol. Plant Pathol.*; 15 (9): 865-870.
- Qian-Hao Z, Stuart S, Kemal K, Gulei J, Longjiang F, Taylor J, Elizabeth S, Dennis CA, Ming-Bo W. Characterization of the defense

- transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum* infection in *Arabidopsis* using RNA-seq. 2013. *Gene.*; 512 (2): 259-266.
- Ramegowda V, Senthil-kumar M, Udayakumar M, Mysore KS. A high-throughput virus-induced gene silencing protocol identifies genes involved in multi-stress tolerance. 2013. *BMC Plant Biol.*; 13 (193): 1471-2229.
 - Ratcliff F, Martin-Hernández AM, Baulcombe DC. Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene functions by silencing. 2001. *Plant J*; 25 (2): 237-245.
 - Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. 2014. *Nucleic Acids Research*; 42: 503-D509.
 - Reuveni M, Tuzun S, Cole JS, Siegel MR, Kúc J. The effects of plant age and leaf position on the susceptibility of tobacco to blue mold caused by *Peronospora tabacina*. 1986. *Phytopathology*; 76 (4): 455-458.
 - Rodríguez L. Caracterización morfológica-citológica molecular de híbridos interespecíficos entre *Nicotiana tabacum* L. y *Nicotiana megalosiphon* Van Heur k & Müll. Arg. 2013. *Cubataco*; 14(1): 59-61.
 - Rodríguez S, Tanda A, Hernández V, Onofre E, Labra A, Rangel A. Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi. 2010. *Plant Physiol Biochem.*; 48: 469-475.
 - Rossman AY, and Palm ME.. Why are Phytophthora and other Oomycota not true fungi? 2006. *Pest Manag.*; 17: 217-219.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rovenich H, Boshoven JC, Thomma B. Filamentous pathogen effector functions of pathogens hosts and microbiomes. 2014. *Curr Opin Plant Biol.*; 20: 96-103.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD. Systemic acquired resistance. 1996. *Plant Cell*; 8: 1809-1819.
- Saitou N and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. 1987. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Salt SD, Tuzun S, Kuc J. Effect of β -ionone and abscisic acid on the growth of tobacco and resistance to blue mold: Mimicry of effects of stem infection by *Peronospora tabacina* Adam. 1986. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*; 79 (28): 287-297.
- Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases I papain. 1967. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 27(2), 157-162.
- Schenk PM, Kazan K, Manners JM, Anderson JP, Simpson RS, Wilson IW, Somerville SC, Maclean DJ. Systemic gene expression in Arabidopsis during an incompatible interaction with *Alternaria brassicicola*. 2003. *Plant Physiol.*; 132 (2): 999-1010.
- Schiltz P. Action inhibitrice de la β -ionone au cours du développement de *Peronospora tabacina*. 1974. *Ann. Tabac.*; 11: 207-216.
- Schneider DJ, Collmer A. studying plant-pathogen interactions in the genomics Era: beyond molecular Koch' s postulates to systems biology. 2010. *Annu. Rev. of Phytopathol.*; 48: 457-479.
- Schulze-lefert P, Panstruga R. A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. 2011. *Trends in Plant Science*; 16 (3): 117-125.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Sels J, Mathys J, De Coninck BM, Cammue BA and De Bolle MF. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. 2008. *Plant Physiol. Biochem.*; 46 (11): 941–950.
- Shew HD and GB Lucas. 1991. Compendium of Tobacco Diseases. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Shibata Y, Kawakita K, Takemoto D. Age-Related resistance of *Nicotiana benthamiana* against hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* requires both ethylene- and salicylic acid mediated signaling pathways. 2010. *Mol Plant Microbe Interact.*; 23(9):1130-1142.
- Simkin AJ, Underwood BA, Auldrige M, Loucas HM, Shibuya K, Schmelz E, G. Clark DG, Klee HG. Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of β - Ionone, a fragrance volatile of *Petunia* lowers. 2004. *Plant Physiology*; 136: 3504-3514.
- Smigocki AC, Ivic-Haymes S, Li H, Savic J. Pest protection conferred by a *Beta vulgaris* serine proteinase inhibitor gene. 2013. *PLoS ONE.*; 8(2).
- Soares-Costa A, Beltramini LM, Thiemann OH, Henrique-Silva F. A sugarcane cystatin recombinant expression, purification, and antifungal activity. 2002. *Biochem Biophys Res Commun.*; 296: 1194-1199.
- Sullivan MJ, Melton TA, Shew HD. Fitness of Races 0 and 1 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. 2005. *Plant Diseases*; 89:1220-1228.
- Sullivan MJ, Melton TA, Shew HD. Managing the race structure of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* with cultivar rotation. 2005. *Plant Disease.*; 89: 1285-1294.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Swiderski MR, Birker D, Jones JD. The TIR domain of TIR-NB-LRR resistance proteins is a signaling domain involved in cell death induction. 2009. *Mol. Plant Microbe Interact.*; 22: 157-165.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis. 2007. *Mol Biol Evol.*; 24 (8): 1596-1599.
- Terauchi R, Hisam K, Nasir B, Ito A, Saitoh H, Berberich T, Takahashi Y.. High-throughput functional screening of plant and pathogen genes in planta. 2005. *Plant Biotechnology.*; 22 (5): 455-459.
- Thomma B, Nu T, Joosten M. Of PAMPs and effectors: The Blurred PTI-ETI dichotomy. 2011. *The Plant Cell.*; 23 (1): 4-15.
- Thompson J, Higgins D and Gibson T. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. 1994. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Thorsten Nurenberger and Birgit Kemmerling. PAMP-Triggered basal immunity in plants. 2009. *Advances in Botanical Research.*; 5: 1-38.
- Torrecilla G, Pino L, Alfonso P, Barroso A. Metodología para las mediciones de los caracteres cualitativos y cuantitativos de la planta de tabaco. 1980. *Ciencia Técnica Agrícola Tabaco.*; 3(1): 21-61.
- Torto TA, Li S, Styer A, Huitema E, Testa A, Gow R, van West P, Kamoun S. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora*. 2003. *Genome Res.*; 13 (7): 1675-1685.

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *PNAS.*; 76: 4350-4354.
- UniProt Consortium. Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. 2011. *Nucleic Acids Research.*; 39: 214-219.
- Vaghchhipawala ZE, Mysore KS. Agroinoculation: a simple procedure for systemic infection of plants with Viruses. 2008. *Methods Mol Biol.*; 451: 555-562.
- Valueva TA, Mosolov VV. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. 2004. *Biochemistry.*; 69: 1305-1309.
- Valueva TA, Revina TA, Gvozdeva EL, Gerasimova NG, Ozeretskovskaya OL. Role of proteinase inhibitors in potato protection. *Bioorg Khim.*; 2003; 29 (5): 499-504.
- Valueva TA, Revina TA, Kladnitskaya GV, Mosolov VV. Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and *Phytophthora* infected potato tuber. 1998. *FEBS Lett.*; 426: 131-134.
- Van der Biezen EA, and Jones JD. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. 1998. *Trends Biochem. Sci.*; 23: 454-456.
- Vleeshouwers VG, Rietman H, Krenek P, Champouret N, Young C, Oh SK, Wang M, Bouwmeester K, Vosman B, Visser RG, Jacobsen E, Govers F, Kamoun S, Van der Vossen EA. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora Infestans* avirulence genes. 2008. *PLoS One.*; 3(8).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Wani SH, Sanghera GS, Singh NB. Biotechnology and plant disease control-role of RNA interference. 2010. *American Journal of Plant Sciences.*; 1: 55-68.
- Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J. Dual RNA-seq of pathogen and host. 2012. *Nature Publishing Group*; 10 (9): 618-630.
- Wisser RJ, Sun Q, Hulbert SH, Kresovich S, Nelson RJ: Identification and characterization of regions of the rice genome associated with broad-spectrum, quantitative disease resistance. 2005. *Genetics.*; 169(4): 2277-2293.
- Wolf FA, Dixon LF, McLean R, Darkis FR. Downy mildew of tobacco. 1934. *Phytopathology*; 24: 337-363.
- Woloshuk CP, Meulenhoff JS, Sela-Buurlage M, Elzen PJ, Cornelissen BJ. Pathogeninduced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. 1991. *Plant Cell*; 3: 619-628.
- Yadeta KA, Thomma PBHJ, Walters DR. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. 2013. *Frontiers Plant Science*; 4:97.
- Zhang S, Zaitlin D. Genetic Resistance to *Peronospora tabacina* in *Nicotiana glauca*, a South American Wild Tobacco. 2008. *Phytopathology*; 98(5): 519-528.
- Zipfel C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. 2009. *Curr. Opin. Plant Biol.*; 12 (4): 1-7.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR green I, its structure

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

determination and methodological implications. 2004. *Nucleic Acids Res.*; 32 (12).

- Zvereva AS, Pooggin MM. Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. 2012. *Viruses*; 4(11): 2578-2580.