



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD IRAPUATO**

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL  
EN LAS ETAPAS TEMPRANAS DE LA  
INTERACCIÓN**  
*Phaseolus vulgaris – Colletotrichum lindemuthianum*

---

**TESIS QUE PRESENTA**

---

**Rocio Medina Chávez**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS**

**EN LA ESPECIALIDAD DE  
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**DIRECCIÓN DE TESIS:  
Dra. June K. Simpson Williamson**

**Irapuato, Guanajuato**

**2016**

**La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Ingeniería Genética en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato, bajo la dirección de la Dra. June K. Simpson Williamson, investigadora titular de esta institución.**



## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo financiero que me otorgó para la realización de este trabajo con la beca N° 488253. Al CINVESTAV por todas las facilidades otorgadas para la realización del posgrado.

A la Dra. June Simpson por su apoyo, asesoría y por permitirme ser parte de su grupo de trabajo.

A los doctores José Ruiz Herrera y Alfredo Herrera Estrella por sus acertadas sugerencias durante toda realización de este trabajo como parte del comité tutorial.

Al Dr. Octavio Martínez de la Vega, por su valiosa colaboración y sugerencias en los experimentos de análisis de la expresión diferencial, por el apoyo, la confianza y la amistad. Al Biólogo Fernando Hernández Godínez por todo su apoyo en los experimentos realizados con *Phaseolus v.* y por su amistad. A José Irepán Reyes por su ayuda en los experimentos de microscopia confocal.

A Katia Gil por el gran apoyo que me ha brindado siempre, por ser parte fundamental en todo el proceso y en mi estancia en CINVESTAV, por su afecto y amistad. A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Genética Molecular, que comparten conmigo el crédito de este trabajo.

A todo el personal administrativo y de apoyo del CINVESTAV Unidad Irapuato por su colaboración en este proyecto.

A mis padres, a quienes les debo lo que soy y lo que sueño, por darme tanto, por ser mi todo.

A mis hermanos, de sangre y de vida, de quienes estoy feliz de tenerlos a mi lado.

A los amigos que estuvieron y los que están en mi vida, por las historias, por las lecciones, por la vida que compartieron conmigo, por enseñarme un mundo que nos da, de la nada.

A Luis Antonio, mi hogar, mi familia, mi vida.

A TI, mi ángel...



## RESUMEN

La interacción entre el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y el hongo causante de la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) se ha estudiado ampliamente en suspensión celular debido a su sensibilidad a elicitores. Sin embargo este tipo de reportes no proporciona información acerca de la citología de la infección, el proceso y formación de estructuras de infección, o la respuesta de la planta a interacciones compatibles e interacciones incompatibles. Estos aspectos pueden ser mejor analizados por el uso de hipocotilos extirpados y plantas enteras (Mahe A et al. 1993; O'Connell RJ et al 1985)

Nuestro objetivo fue identificar los genes que se expresan en las etapas tempranas de la interacción compatible e incompatible entre un genotipo de *P. vulgaris* y dos patotipos de *C. lindemuthianum*. El cultivar BAT 93 es uno de los mejor caracterizados y su genoma ha sido secuenciado bajo la iniciativa PHASIBEAM, por tal motivo se seleccionó BAT93 para el desarrollo del presente estudio con la finalidad de aprovechar los datos genómicos disponibles.

Las cepas 1088 y 256 mostraron reacciones contrastantes respecto a su compatibilidad o incompatibilidad con BAT93, fueron elegidas para llevar a cabo el análisis de RNAseq de muestras obtenidas durante el desarrollo de las interacciones con este cultivar, con el fin de identificar transcritos expresados diferencialmente en estas interacciones con un solo genotipo de *P. vulgaris*. , ambas cepas fueron capaces de infectar al cultivar Victoria, el cual fue incluido como testigo, dado el hecho de que se trata de una variedad universalmente susceptible.

Las interacciones entre BAT 93 y ambos patotipos de *C. lindemuthianum* se analizaron a nivel microscópico y a nivel transcriptoma. La respuesta de contraste de BAT 93 a las razas 1088 y 256 fue la esperada dando grados de infección de 4 en la escala de Garrido para la interacción compatible y de 0 en la interacción incompatible.



Se pudo comprobar además que el sistema de inoculación sobre hipocotilos produce resultados consistentes y comparables con las inoculaciones sobre plantas completas, empleando el sistema de inoculación de hipocotilos para determinar la patogenicidad de las cepas de *C. lindemuthianum* sobre el cultivar BAT93.

El análisis microscópico se llevó a cabo realizando un análisis comparativo de las etapas tempranas de las interacciones entre las cepas 1088 y 256 con BAT93 y Victoria, transformamos cada una de las cepas (1088, 256) con un cassette que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) usando el sistema de *A. tumefaciens* el cual ha sido utilizado anteriormente en *C. lindemuthianum* (Quintero-Jiménez et al., 2010).

Se observaron diferencias entre la reacción incompatible entre la cepa 256 y BAT93 y la reacción compatible entre 256 y Victoria. Treinta minutos después del contacto entre 1088 y BAT93 se identificaron cambios morfológicos en las conidias, que indicaban el inicio del proceso de germinación. Aunque algunas conidias en la interacción BAT93/256 mostraron estos cambios, estos fueron observados en tiempos más largos (48 y 72 h después de la inoculación) y el proceso de germinación no continuó hasta el desarrollo de la enfermedad. En la reacción compatible las plantas responden a la presencia del patógeno mostrando reacciones de hipersensibilidad y restringiendo la invasión del patógeno. Los resultados muestran que las reacciones de compatibilidad se definen desde los primeros 30 minutos, lo cual es consistente a lo esperado y lo reportado en estudios previos (Saul Fraire- et al 2003).

El análisis a nivel transcriptoma permitió determinar un total de 21,325 genes codificantes putativos basados en el cDNA, debido a que en el desarrollo de este estudio no se contó con réplicas para el análisis diferencial, se implementó la estrategia de emplear los tiempos de muestreo más cercanas como pseudo-réplicas. Lo que hizo posible identificar los patrones de expresión diferencial entre las reacciones compatibles e incompatibles asociadas con la patogenicidad de *C. lindemuthianum*. En la reacción de incompatibilidad se observó un número mucho mayor de genes expresados de manera diferencial desde las primeras etapas de la interacción en comparación con la interacción compatible (susceptible) donde el número de genes



expresados fue menor, lo cual coincide con la hipótesis de que en las interacciones incompatibles, la planta es capaz de detectar la presencia del patógeno y reacciona desde las primeras etapas de contacto, lo que ocasiona una reacción en cadena de su metabolismo de defensa, lo que culmina en el rechazo del organismo patógeno y evita que el desarrollo de la enfermedad siga su curso. En el caso de la reacción compatible, la planta no es capaz de mostrar esta respuesta, lo cual desencadena la invasión del patógeno, permitiendo el avance y penetración del hongo. Las observaciones a nivel molecular concuerdan muy bien con las observaciones del progreso de la infección a nivel microscópico.

Se encontraron 1080 genes compartidos en términos de expresión diferencial en la reacción incompatible, compatible. La respuesta específica a la cepa compatible es significativa habiendo un total de 7680 transcritos expresados diferencialmente esta interacción posiblemente represente una respuesta específica estimulada por parte del patógeno para inhibir la respuesta de defensa.

Los factores de transcripción más abundantes en esta condición fueron los tipo bHLH, la cual no ha sido ampliamente estudiada en las plantas, se han caracterizado por la función de biosíntesis de antocianinas, señalización por fitocromo, expresión de globulina, la dehiscencia del fruto y carpelo y el desarrollo de la epidermis (G Toledo-Ortiz - 2003).

La presencia de los FT tipo WRKY es consistente con la respuesta de incompatibilidad, en reportes previos los describen como parte importante en la respuesta al ataque de patógenos y en la señalización de la molécula de Ácido Salicílico (SA; Eulgem y Somssich, 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio pudimos determinar que la inducción diferencial de la expresión de genes de respuesta a la infección en las interacciones compatibles e incompatibles son primordiales en las etapas más tempranas de la infección. Depende de la capacidad de la planta de reconocer el patógeno desde el contacto inicial y desencadenar los sistemas de defensa.



# ABSTRACT

The interaction between the common bean (*Phaseolus vulgaris*) and the fungus causing anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) has been studied extensively in cell suspension due to their sensitivity to elicitors. However such reports do not provide information about cytology infection, the process and formation of infection structures, or response to plant compatible and incompatible interactions. These aspects can be better analyzed by using hypocotyls excised and whole plants (Mahe A et al 1993;. O'Connell RJ et al 1985)

Our aim was to identify genes that are expressed in the early stages of the compatible and incompatible interaction between genotype of *P. vulgaris* and two pathotypes of *C. lindemuthianum*. The cultivar BAT 93 is one of the best characterized and its genome has been sequenced under the PHASIBEAM initiative for that reason BAT93 was selected for the development of this study in order to take advantage of genomic data available.

Strains 1088 and 256 showed contrasting reactions to their compatibility or incompatibility with BAT93, they were chosen to carry out the analysis RNAseq samples obtained during the development of interactions with this cultivar, in order to identify transcripts differentially expressed in these interactions with one genotype of *P. vulgaris*. Both strains were able to infect the Victoria cultivar, which was included as a witness, given the fact that it is a universally susceptible variety.

Interactions between BAT 93 and both pathotypes of *C. lindemuthianum* were analyzed at the microscopic level and transcriptome level. The contrast response BAT races 93 to 1088 and 256 was expected to give higher infection of 4 on a scale of Garrido for compatible interaction and 0 in the interaction incompatible.

It could also check that the system of inoculation on hypocotyls produces consistent and comparable results with the inoculations on whole plants, using the hypocotyls



inoculation system to determine the pathogenicity of strains of *C. lindemuthianum* on BAT93 grow.

Microscopic analysis was conducted by performing a comparative analysis of the early stages of interactions between strains 1088 and 256 with BAT93 and Victoria, transform each of the strains (1088, 256) with a cassette that expresses green fluorescent protein (GFP) using *A. tumefaciens* system which has been used previously in *C. lindemuthianum* (Quintero-Jimenez et al., 2010).

Differences between the incompatible reaction between 256 and strain BAT93 and compatible reaction between 256 and Victoria were observed. Thirty minutes after contact between 1088 and BAT93 morphological changes in conidia, indicating the start of the germination process they were identified. Although some conidia in the BAT93 / 256 interaction showed these changes were observed in these longer times (48 and 72 h after inoculation) and the germination process does not continue until the development of the disease. In reaction compatible plants respond to the presence of the pathogen showing hypersensitivity reactions and restricting the invasion of the pathogen. The results show that the reactions of compatibility are defined from the first 30 minutes, which is consistent with the expected and reported in previous studies (Saul Fraire- et al 2003).

The analysis transcriptome level possible to determine a total of 21.325 genes encoding putative based on the cDNA, because in the development of this study was not available replicas for the differential analysis, the strategy of using sampling times closer implemented as pseudo-replicates. What made it possible to identify differential expression patterns between compatible and incompatible reactions associated with the pathogenicity of *C. lindemuthianum*. In the reaction of incompatibility a much larger number of genes expressed differentially was observed from the earliest stages of interaction compared to compatible interaction (susceptible) where the number of genes expressed was lower, which coincides with the hypothesis that in incompatible interactions, the plant is able to detect the presence of the pathogen and reacts from the early stages of contact, causing a chain reaction of your metabolism defense, which culminates in the rejection of the pathogen and prevents the development of the



disease run its course. For Compatible reaction, the plant is not able to display this response, which triggers pathogen invasion, allowing advance and penetration of the fungus. At the molecular level observations agree very well with the observations of the progress of infection at the microscopic level.

1080 genes shared in terms of differential expression in the incompatible compatible reaction was found. The specific response to the strain is significant supports having a total of 7680 transcripts differentially expressed this interaction may represent a specific response stimulated by inhibiting pathogen defense response.

The factors most abundant transcript in this condition were the bHLH type, which has not been widely studied in plants, they have been characterized by the function of anthocyanin biosynthesis, signaling phytochrome expression globulin, fruit dehiscence and carpel and developing epidermis (Toledo-Ortiz G - 2003).

The presence of the FT type WRKY is consistent with the response of incompatibility, in previous reports describe them as an important part in the response to pathogens and signaling molecule salicylic acid (SA; Eulgem and Somssich, 2007).

One of the major findings is that there is no indication that these defense mechanisms are compatible stimulated reaction in the early stages of infection, which triggers the invasion and development of the disease.

According to the results obtained in this study we determined that the differential induction of gene expression in response to infection compatible and incompatible interactions are essential in the early stages of infection. It depends on the ability of the plant to recognize the pathogen from initial contact and trigger defense systems.



# INDICE

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
	a. OBJETIVO GENERAL .....	8
	b. OBJETIVOS PARTICULARES .....	8
<b>III.</b>	<b>REVISION DE LITERATURA</b> .....	<b>9</b>
	a. GENERALIDADES DE FRIJOL <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	9
	b. ASPECTOS SOCIOECONÓMICOS BÁSICOS DEL CULTIVO DE FRÍJOL .....	11
	i. PRODUCCIÓN DE FRIJOL EN MÉXICO .....	13
	c. ANTRACNOSIS ( <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ) .....	14
	i. SIGNOS Y SÍNTOMAS .....	15
	ii. EPIDEMIOLOGIA .....	16
	iii. CARACTERÍSTICAS DEL PATOGENO Y LA ENFERMEDAD .....	17
	d. IDENTIFICACIÓN DE RAZAS DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	19
	e. COEVOLUCIÓN DEL PATOSISTEMA <i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	21
	f. BIOLOGIA DE LA RESPUESTA DE DEFENSA DE LA PLANTA FRENTE AL ATAQUE DE ORGANISMOS PATOGENOS. ....	23
	i. RESISTENCIA A ENFERMEDADES .....	24
	ii. INTERACCIONES COMPATIBLE E INCOMPATIBLE .....	25
	iii. MECANISMOS DE DEFENSA .....	26
	1. Mecanismos de Señalamiento Transduccional y Activación de Respuestas de Defensa .....	26
	2. Resistencia a Nivel Molecular .....	27
	iv. MECANISMOS DE DEFENSA PASIVOS .....	29
	v. MECANISMOS DE DEFENSA ACTIVOS .....	30



1. Respuesta de Hipersensibilidad.....	31
g. RESISTENCIA RAZA-CULTIVAR ESPECIFICA .....	33
h. GENES DE RESISTENCIA .....	33
i. MOTIVOS DE LAS PROTEÍNAS R Y SU FUNCIÓN POTENCIAL .....	34
i. CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES DE DEFENSA ANTE PATOGENOS .....	36
j. MECANISMOS DE SEÑALAMIENTO TRANSDUCCIONAL Y ACTIVACIÓN DE RESPUESTAS DE DEFENSA .....	36
k. GENES DE RESISTENCIA Y RESPUESTAS DE DEFENSA EN FRIJOL ANTE ANTRACNOSIS. ....	39
i. GENES DE RESISTENCIA .....	39
ii. RESPUESTA DE DEFENSA TEMPRANA .....	41
iii. CITOLOGÍA E INDUCCIÓN DE GENES EN INTERACCIONES COMPATIBLE E INCOMPATIBLE.....	42
1. HOMÓLOGOS DE GENES DE RESISTENCIA EN FRÍJOL. ....	44
<b>IV. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>47</b>
<b>V. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>49</b>
a. MATERIAL VEGETAL.....	49
b. CULTIVO DE CEPAS DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> Y PREPARACIÓN DE INÓCULO .....	50
c. INOCULACIÓN EN HIPOCOTILOS .....	51
d. INOCULACIÓN EN PLÁNTULA.....	54
e. EXTRACCIÓN DE R N A. ....	55
f. EXTRACCION DE RNA T O T A L.....	56
g. EXTRACCIÓN DE RNA MENSAJERO.....	57
h. PURIFICACIÓN DE mRNA. SÍNTESIS DE cDNA .....	59
i. EXTRACCIÓN DE DNA <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	59
i. MÉTODO “DNeasy.Tissue.Kit” Qiagen, DNeasy Plant Mini Kit (50), 69104.....	59
ii. CONSIDERACIONES .....	60
iii. PROCEDIMIENTO .....	61



j. TRANSFORMACIÓN DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> UTILIZANDO <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	62
i.    PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN .....	63
k. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO.....	64
i.    MÉTODO DE BIRNBOIM .....	64
l. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LA INTERACCIÓN <i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	66
m. SECUENCIACIÓN POR SÍNTESIS.....	67
n. ANALISIS BIOINFORMATICO Estrategia experimental. ....	69
o. IDENTIFICACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE. ....	71
p. ANÁLISIS DEL SISTEMA FACTORIAL SIN REPLICAS. ....	72
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	74
a. MATERIAL VEGETAL.....	74
b. CULTIVO DE CEPAS DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> Y PREPARACIÓN DE INÓCULO.....	76
c. PREPARACIÓN DE INOCULO.....	77
d. INOCULACIÓN EN HIPOCOTILOS. ....	79
e. INOCULACIÓN EN PLANTULAS. ....	87
f. TRANSFORMACIÓN DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> UTILIZANDO <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	92
g. ANÁLISIS MICROSCOPICO DE LA INTERACCIÓN <i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	97
h. <i>Phaseolus vulgaris</i> - <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	105
i. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL. ....	112
j. PURIFICACIÓN DE mRNA Y PRUEBA DE SÍNTESIS DE cDNA. ....	114
k. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y SECUENCIACIÓN POR SÍNTESIS (SBS). ....	116
l. EXTRACCIÓN DE RNA, PREPARACIÓN DE LA LIBRERÍA DE cDNA Y SECUENCIACIÓN.....	120
m. MAPEO Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN LA INTERACCIÓN PLANTA – PATOGENO.....	122
n. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN LA INTERACCIÓN PLANTA – PATOGENO.....	125



i.	ANÁLISIS DEL SISTEMA FACTORIAL SIN RÉPLICAS .....	125
ii.	EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN LA INTERACCIÓN PLANTA – PATOGENO .....	127
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>158</b>
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIÓN .....</b>	<b>163</b>
<b>IX.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>166</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>		<b>167</b>



# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales productores de frijol en el mundo 2000-2010.....	26
Figura 2 Producción de frijol en México 2010-2014 .....	28
Figura 3. Síntomas de antracnosis .....	30
Figura 4 Hongo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	32
Figura 5 Proceso de la infección en interacciones compatibles.....	33
Figura 6. Modelo de Interacción Gen por Gen .....	38
Figura 7. Recuento de 5 campos de la cámara Neubauer .....	60
Figura 8. Técnica de inoculación en hipocotilos. ....	61
Figura 9. Semillas y plántulas de las variedades BAT 93 y VICTORIA. ....	84
Figura 10. Semillas y plántulas de las variedades BAT 93 y VICTORIA, en el estado fenológico propicio para la inoculación.....	85
Figura 11. Cepas de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	86
Figura 12 Cepas de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> y recolección de conidias.....	87
Figura 13. Observación microscópica de la cepa 1088 de <i>C. lindemuthianum</i> a diferentes intervalos de tiempo.....	88
Figura 14 Evaluación de la interacción entre el cultivar de frijol BAT 93 y las cepas patógenas de <i>Colletotrichum</i> pertenecientes a diversas razas una semana posterior a la inoculación.....	92
Figura 15. Análisis microscópico de la interacción entre la variedad de frijol BAT 93 y las cepas patógenas de <i>Colletotrichum</i> 256 y 1088.....	93
Figura 16. Evaluación de la interacción entre el cultivar de frijol VICTORIA y las cepas patógenas de <i>Colletotrichum</i> pertenecientes a diversas razas.....	94
Figura 17. Observación microscópica de la interacción entre el cultivar VICTORIA y las cepas patógenas de <i>Colletotrichum</i> de las razas 256 y 1088, 5 días posteriores a la inoculación.....	95
Figura 18. Observación macroscópica de hipocotilos de los cultivares de frijol BAT 93 y VICTORIA una semana posterior a la inoculación con las cepas patógenas. ....	96
Figura 19. Plántulas de frijol de diversas variedades inoculadas con la cepa de <i>C. lindemuthianum</i> raza 292.....	99
Figura 20. Plántulas de frijol siete días posteriores a la inoculación con la cepa 1088.....	101



Figura 21. Interacciones entre <i>P. vulgaris</i> y <i>C.lindemuthianum</i> .....	101
Figura 22. Diagrama del procedimiento seguido para la transformación de cepas de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	103
Figura 23. Transformación de cepas de <i>Colletotrichum</i> mediada por <i>Agrobacterium</i> , .....	104
Figura 24. Células de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> transformadas por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> positivo y control .....	105
Figura 25. Cepa 1088 de <i>C. lindemuthianum</i> transformada con <i>Agrobacterium</i> . .....	105
Figura 26. Cepa 256 de <i>C. lindemuthianum</i> transformada con <i>Agrobacterium</i> . .....	106
Figura 27. Observación microscópica de BAT 93 y VICTORIA a los 15 y 30 minutos posteriores a la inoculación.....	107
Figura 28. Observación al microscopio, interacciones entre las razas de <i>Colletotrichum</i> 256 y 1088 y los cultivares BAT 93 y VICTORIA 1, 2horas posteriores a la inoculación.....	108
Figura 29.Observación microscópica de las interacciones entre las cepas 256 y 1088 con los cultivares BAT 93 y VICTORIA a las4 y 8horas posteriores a la inoculación .....	109
Figura 30. Observación microscópica de las interacciones entre las cepas 256 y 1088 con los cultivares BAT 93 y VICTORIA 24horas posteriores a la inoculación. ....	110
Figura 31. Observación microscópica de las interacciones entre las cepas 256 y 1088 con los cultivares BAT 93 y VICTORIA 48 h posteriores a la inoculación. ....	111
Figura 32. Observación microscópica de las interacciones a las 72horas posteriores a la inoculación.....	112
Figura 33. Seguimiento a nivel microscópico a las 96 h posteriores a la inoculación. ....	113
Figura 34. Análisis microscópico a los 7 días posteriores a la inoculación de las plántulas.....	114
Figura 35. Inoculación de las plántulas del cultivar BAT 93 con las cepas patógenas 256 y 1088. ....	115
Figura 36 Observación de los síntomas mostrados en la plántula de la variedad BAT 93, 48horas posteriores a la inoculación.....	117
Figura 37 Observación macroscópica de las interacciones entre BAT 93 y las cepas 1088 y 256, a las 72horas posteriores a la inoculación. ....	118
Figura 38 Observación 96 h posteriores a la inoculación de BAT 93. ....	119
Figura 39 Interacción compatible entre los cultivares BAT 93 Y VICTORIA con la cepa 1088, una semana posterior a la inoculación. ....	120



Figura 40 Interacción de los cultivares BAT 93 y VICTORIA con la cepa 256, una semana posterior a la inoculación.....	121
Figura 41 Gel de agarosa de las muestras de RNA.....	123
Figura 45. Genes de expresion normalizados en tpm para las 15 librerias. analizadas .....	128
Figura 46. Numero de genes expresados significativamente entre cada una de las imteracciones analizadas.....	130
Figura 47 Comparación de números de genes significativos en diferentes intervalos de tiempo, en las diferentes condiciones de interacción, cepa no patogénica, cepa patoenica y control. ....	134
Figura 48 Comparación de los números de genes significativos.....	135
Figura 49 Expresion de genes significativos en diferentes etapas en la interacción entre <i>C. lindemuthianum</i> y <i>P. vulgaris</i> .....	136
Figura 50 Genes de interes expresados diferencialmente en <i>phaseolus vulgaris</i> en cada condicion en específico.....	137
Figura 51 Factores de Transcripcionen la interaccion entre <i>Phaseolus vulgaris</i> en cada condicion en específico.....	138



# LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterizacion de cultivares diferenciales.....	35
Tabla 2. Escala para evaluacion de antracnosis .....	62
Tabla 3. Relación de muestras de RNA de BAT 93 en la interacción Planta-Patógeno secuenciadas.....	78
Tabla 4. Resultados de la evaluación de síntomas en la interacción Planta-Patógeno .....	90
Tabla 5. Resultados de las interacciones en hipocotilo entre BAT 93 y VICTORIA con las cepas 1088 y 256.....	95
Tabla 6. Resultados del análisis de la interacción de las cepas de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> razas 2, 256, 292, 384, 448, 1088 y 1280 con los cultivares de frijol pertenecientes a los doce diferenciales. Las celdas coloreadas indican las interacciones que resultaron compatibles para la variedad de frijol y la cepa correspondiente. La coloración no indica nada en específico, solo es utilizado para indicar cada cepa,.....	98
Tabla 7. Resultados de las evaluaciones de la interacción.....	100
Tabla 8. Muestreo de Plantulas de BAT 93 inoculadas.....	116
Tabla 9 Cuantificación de RNA extraído por tres distintos métodos, usando el espectrofotómetro modelo ND-1000 (NanoDrop®, USA).....	123
Tabla 12 Resultados de la corrida de secuenciacion, formato de corrida: 1x100.....	125
Tabla 13. Resultados de las secuencias obtenidas procesadas mediante el programa Trimmomatic.....	126
Tabla 14 Definición de contrastes realizados y numero de genes significantes. ....	133
Tabla 15 Factores de transcripcion expresados en las distintas interacciones en <i>phaseolus vulgaris</i> .....	139



# I. INTRODUCCIÓN

Las plantas deben sobrevivir al ataque de un gran número de microorganismos patógenos particularmente hongos y bacterias, los patógenos son responsables de gran parte de la disminución en la producción agrícola.

Una vez que el patógeno ha sido reconocido por la planta, en esta se activan una serie de mecanismos de defensa mediante cascadas de señalización, las cuales aún no están completamente caracterizadas. Los mecanismos de defensa, que son inducidos como consecuencia del reconocimiento, son los responsables de la resistencia a la enfermedad, actuando muchas veces en conjunto para lograr detener el avance del patógeno. Estos mecanismos incluyen principalmente la muerte celular por reacción de hipersensibilidad, la acumulación de metabolitos secundarios, la acumulación de enzimas hidrolíticas y la deposición de sustancias de refuerzo que evitan el avance del patógeno, entre algunas otras (Collinge et al. 1994).

La comprensión de los mecanismos naturales mediante los cuales las plantas son capaces de defenderse, permite producir plantas con mayores niveles de resistencia, sin la necesidad de utilizar genes foráneos o de otros organismos extraños a la especie. Los esquemas basados en la regulación de los mecanismos naturales de respuesta al ataque por patógenos, representa una forma más viable y duradera de producir plantas “genéticamente modificadas” aprovechando estrategias de mejoramiento tradicional.

El frijol pertenece a la familia Fabacea, subfamilia Papilionoideae, tribu Phaseolae, y especie *Phaseolus vulgaris* L. Debido al alto contenido proteico que presenta (20-25%) , dentro del grupo de las leguminosas, el tercer cultivo más importante a nivel mundial, después de la soya y el cacahuate (SINGH *et al.*, 1999). El frijol constituye una de las principales fuentes de proteína en la dieta, en México es relevante debido a la existencia de un elevado nivel de desnutrición energético–proteínica, principalmente en las zonas rurales y urbanas con mayor grado de marginación.



El frijol representa la principal fuente de proteína en países subdesarrollados, donde el consumo anual per cápita alcanza los 50 Kg en algunas regiones (Broughton et al., 2003). Particularmente en México, el frijol es la leguminosa de mayor consumo humano y representa el 36% de la ingesta diaria de proteínas.

Este cultivo es producido en lugares y ambientes tan diversos como América Latina, África, el Medio Oriente, China, Europa, los Estados Unidos, y Canadá. El crecimiento de la producción mundial de frijol se ha mantenido a una tasa media de crecimiento anual de 2.8% para el periodo de 2000-2010. En 2010, la producción mundial de frijol se ubicó en 23.2 millones de toneladas (Secretaría de Economía). El cultivo de frijol se realiza prácticamente en casi todas las regiones del país y condiciones de suelo y clima. Por este motivo, el frijol ocupa el segundo lugar en importancia dentro de la superficie sembrada a nivel nacional, sólo después del maíz. No obstante lo anterior, una de las principales limitantes en su producción, la constituyen las enfermedades causadas por organismos patógenos, mismas que pueden causar enormes pérdidas.

Entre las principales enfermedades del frijol común se encuentran la roya, la antracnosis, la mancha angular de la hoja y la pudrición de las raíces. Tres patógenos han mostrado una asociación más íntima con el acervo genético del huésped, estos son: *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaeoisariopsis griseola* y *Uromyces appendiculatus*. Estos hongos presentan patogenicidad específica sobre los huéspedes del correspondiente centro de origen.

*C. lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams. –Scrib. (Telomorfo: *Glomerella cingulata* f.s. *phaseoli*, *G. lindemuthiana*) es un hongo Deuteromycete, haploide y uninucleado (Bryson et al., 1992), agente causal de la antracnosis del frijol, que provoca severas pérdidas en la producción mundial de esta leguminosa alcanzando porcentajes de hasta un 95% cuando se dan las condiciones propicias para el desarrollo del hongo y se siembran variedades de frijol susceptibles. La principal estrategia para su combate es el uso de cultivares resistentes, sin embargo, la amplia variabilidad patogénica que muestra este hongo limita el uso de cultivares resistentes a regiones específicas donde



los patotipos son conocidos y para las cuales los cultivares han sido generados. Así, el éxito de los programas de mejoramiento requiere del conocimiento de los patotipos presentes en las regiones para las cuales se generan cultivares mejorados y contar con fuentes de genes de resistencia a los patotipos prevalecientes en las mismas.

El conocimiento de la variabilidad genética y especificidad en las poblaciones nativas es preciso para el desarrollo de programas de mejoramiento y selección de fuentes de resistencia durables y efectivas. Inoculaciones cruzadas entre *P. vulgaris* y *C. lindemuthianum* han revelado un proceso de coevolución (Geffroy et al., 1999). Lo cual significa que el patógeno ha evolucionado paralelamente a su huésped, por lo que se ha generado una población del hongo especializada y adaptada a los diferentes acervos de frijol (Geffroy et al., 1999; Melotto et al., 2000; Araya, 2003). Gepts (1988), fue el primer investigador que determinó la existencia de co-evolución de los caracteres de virulencia de *C. lindemuthianum* con los acervos genéticos de frijol. Posteriormente fue confirmado por Balardin y Kelly (1998), al determinar que las razas de *C. lindemuthianum* de origen andino eran patogénicas solamente en el acervo Andino, mientras que las mesoamericanas eran patogénicas en ambos acervos genéticos de frijol.

La resistencia a antracnosis en el frijol se condiciona principalmente por trece genes mayores independientes, identificados con el símbolo Co, seguido por un número. Con excepción del Co-8, todos son genes dominantes y en algunos de ellos como Co-1, Co-3/Co-9/Co-7, Co-4 y Co-5 se han descrito múltiples alelos (Kelly and Vallejo, 2004; Kelly, 2010).

El proceso coevolutivo entre la planta y el hongo ha permitido el desarrollo de un sistema de defensa complejo y variado que abarca compuestos estructurales y compuestos inducidos por factores adversos. De los primeros estudios de la interacción genética planta-patógeno surgió la teoría gen por gen en el patosistema lino-roya en donde después de estudiar la herencia de la resistencia, se llegó a la conclusión de que por cada gen de resistencia en el hospedero existe un gen de virulencia en el patógeno y que el equilibrio entre ambos tipos de genes permite la relación permanente entre el



lino y el hongo causante de la roya (Flor, 1947).

Según Flor (1947) en este sistema se da la interacción de genes que condicionan resistencia en el huésped y sus correspondientes genes que regulan la patogenicidad en el patógeno. Interpretaciones más recientes de la teoría gen por gen la definen como una interacción específica de polimorfismos de una serie de genes de resistencia en el huésped y los correspondientes genes de avirulencia en el patógeno (Thompson & Burdon, 1992; Leonard, 1994).

Poblaciones de *C. lindemuthianum* agente causal de la antracnosis del frijol, también han sido objeto de estudios de virulencia y moleculares que respaldan la hipótesis de la coevolución. En 1993, Pastor-Corrales et al. (1993) caracterizaron 333 aislamientos colectados en países de la región Andina y Mesoamérica, encontrando mayor diversidad patogénica en poblaciones mesoamericanas; la mayoría de las razas presentes en una región geográfica no se encontraron en la otra, sugiriendo mayor adaptación de razas a cultivares.

De acuerdo a Grayer y Harborne (1994) los antifúngicos pertenecen a todas las principales clases de metabolitos secundarios: terpenoides, iridoideas, sesquiterpenos, saponinas, compuestos azufrados o nitrogenados (alcaloides, aminas, amidas), alifáticos (especialmente alcanos de cadena larga y ácidos grasos) y aromáticos (fenoles, flavonoides, estilbenos, bibenzilos, Verticillium, xantonas y benzoquinonas). Dentro de las fitoalexinas se encuentran lactosas sesquiterpénicas, pterocarpanos, cumarinas, indoles, bibenzilos, derivados del ácido antranílico, estilbenos, flavanonas, diterpenos, antocianidinas, chromonas, isoflavonas, isoflavonoides, alcaloides, fenoles, antroquinonas, fenilpropanoides y sesquiterpenos. Igual pasa en las leguminosas en donde hay chalconas, flavonas, difenilpropeno, isoflavonas y saponinas.

El uso de técnicas de biología y genética molecular ha generado gran cantidad de información sobre los mecanismos utilizados por las plantas para defenderse de los organismos fitopatógenos. Los nuevos conocimientos confirman que la activación de defensa en las plantas tiene una base compleja que depende de la manifestación



coordinada de un conjunto de mecanismos. La utilización de mecanismos de defensa en plantas, particularmente la expresión y regulación de la resistencia de amplio espectro, surge como una alternativa viable para diseñar estrategias para el control de patógenos.

En general son escasos estudios que describan la expresión temprana de genes, en respuesta de defensa en plantas completas de frijol frente al patógeno *C. Lindemuthianum*. En la mayoría de los casos se ha trabajado con modelos de estudio con células en suspensión estimuladas con derivados de pared celular del patógeno y de genes relacionados con la biosíntesis de fitoalexinas. En células de frijol en suspensión estimuladas con productos extracelulares de *C. lindemuthianum*, se produjo un incremento inmediato con un pico a los 30 min post-inoculación en la producción de moléculas reactivas de oxígeno, cambios en la síntesis de ciertas proteínas a las 3 h, y diferencias en el perfil de proteínas que se hizo más importante a las 6 h. Otros cambios que se observaron entre las 4-6horas fue la perturbación de las funciones de la membrana plasmática incluyendo peroxidación de lípidos, alteración en el flujo de protones, así como reducción de la actividad de las enzimas extracelulares peroxidasa y  $\alpha$ glucosidasa (Anderson y cols. 1991).

En otros modelos de estudio muy semejantes se observó la inducción de chalcona isomerasa a las 8horas(Dixon y cols. 1983) chalcona sintasa a las 4-6horas(Ryder y cols. 1984) y fenilalanina amonio-liasa a las 3horas(Edwards y cols. 1985). Recientemente se ha descrito también en células de frijol en suspensión, la activación de una PAL-cinasa en respuesta a un estimulador derivado de hongo. Esta proteincinasa tiene propiedades de autofosforilación, unión a calcio y fosforilación de sustrato. La activación se dió dentro de los 10 min y se mantuvo hasta las 4horasposteriores a la estimulación (Allwood y cols. 2002). La información de los estudios anteriores sugiere entonces una rápida inducción de los ARN mensajeros de genes.



En este contexto, el presente trabajo tuvo como objetivo general realizar un análisis de la expresión diferencial en la interacción PLANTA–PATOGENO (*Phaseolus vulgaris* – *Colletotrichum lindemuthianum*), en etapas tempranas de la interacción, utilizando el genotipo BAT 93 y las cepas patógenas 256 y 1088 del hongo *C. lindemuthianum*.

Se seleccionó este cultivar principalmente por las siguientes razones: la línea BAT 93 alberga varios genes que controlan las interacciones huésped-microorganismo incluyendo algunos genes R asociados con *C. lindemuthianum*, y se cuenta con su genoma completo secuenciado (Vlasova et al., 2016).

Para la identificación de los genes diferenciales en el frijol se evaluó un gran número de genes en 15 bibliotecas, producto de un experimento factorial sin réplicas. Los factores involucrados fueron el tiempo de exposición al hongo (5 niveles: 15, 30, 60, 120 min y una mezcla equimolar de RNA obtenida de los tiempos de 4, 8, 24, 48, 72 y 96 h) y las diferentes interacciones con el patógeno, B91 (no patogénica), B92 (patogénica) y B93 (control; solo asperjada con agua estéril).

Las secuencias identificadas se alinearon contra el genoma de BAT 93 y se realizó la anotación de los genes identificados comparándolos en diversas bases de datos, los resultados son presentado y discutidos.

En el presente estudio se muestra histológicamente el desarrollo de las etapas iniciales en la interacción entre *Phaseolus vulgaris*- *Colletotrichum lindemuthianum* para lo cual se realizó el seguimiento a nivel microscópico de las diferentes etapas del proceso de infección, realizando la transformación de las cepas de *C. lindemuthianum*, utilizando las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Y GV2260 conteniendo el plásmido con la proteína GFP, esto con el fin de que las cepas del hongo fuesen capaces de expresar fluorescencia y facilitase el seguimiento del desarrollo del patógeno dentro del tejido huésped, usando aislados de cepas 256 y 1088 del hongo patógeno.



## II. OBJETIVOS

### i. OBJETIVO GENERAL

Analizar a nivel del transcriptoma la expresión y función putativa de genes específicos asociados al proceso de infección en la interacción planta-patógeno (*P. vulgaris* – *C. lindemuthianum*) utilizando una cepa patógena y otra con una patogenicidad nula respecto a la variedad de frijol BAT 93.

### ii. OBJETIVOS PARTICULARES

- ④ Comparar el proceso de infección a nivel microscópico entre ambas cepas (patógena y no patógena).
- ④ Establecer patrones de expresión génica diferencial durante el proceso de infección de frijol por *C. lindemuthianum*.
- ④ Seleccionar genes de interés para la respuesta de defensa de la planta de acuerdo al análisis de expresión diferencial.



### III. REVISION DE LA LITERATURA

#### i. GENERALIDADES DEL FRIJOL *Phaseolus vulgaris*

La familia Leguminosae (Fabaceae) contiene cerca de 643 géneros, incluyendo 18.000 especies distribuidas en tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae, y Papilionoideae (o Faboideae) (Gepts et al., 2008). Como ya se menciona, taxonómicamente el frijol común corresponde a las especies del género *Phaseolus*, es miembro de la tribu Phaseoleae, subfamilia Papilionoideae, familia Leguminosae y al orden Rosales, su nombre completo es *Phaseolus vulgaris* L., asignada por Linneo en 1753.

*Phaseolus vulgaris* es un género diploide, la mayoría de las especies tienen un número  $2n=2x=22$  cromosomas. Identificándose tres áreas de diversidad para poblaciones naturales de frijol: el centro Mesoamericano, sur-andino y norte-andino. Los análisis genéticos basados en marcadores moleculares indican dos procesos de domesticación independientes dentro de los centros de diversidad Mesoamericano y Andino sur, desarrollando dos grupos distintos de frijoles cultivados, el grupo genético Mesoamericano y Andino respectivamente (Geffroy y cols. 1999; Shree 2001), donde el 60 % de la producción mundial de frijol común se deriva de cultivares de origen Mesoamericano (Beebe y cols. 2000).

El frijol es considerado como una de las leguminosas que poseen semillas comestibles de mayor importancia a nivel mundial. Representa la principal fuente de proteína en países subdesarrollados (Broughton et al., 2003).

Dependiendo del tipo de frijol, el contenido de proteínas varía del 14 hasta el 33%, es además rico en aminoácidos como la lisina (6.4 a 7.6 g/100 g de proteína), la fenilalanina y la tirosina (5.3 a 8.2 g/100 g de proteína), con deficiencias en los aminoácidos azufrados metionina y cisteína. De acuerdo a evaluaciones de tipo



biológico, la calidad de la proteína del frijol cocido puede alcanzar niveles de hasta el 70% comparada con una proteína de origen animal a la que se le asigna el 100%.

*Phaseolus vulgaris* se diversificó a partir de tres principales centros de origen, el Mesoamericano (México y Centroamérica), el Andino norte (Ecuador) y Andino sur (Argentina), Geffroy y cols. 1999; Shree 2001.

Existen varios factores que pueden afectar negativamente la producción de frijol, reduciendo el rendimiento y la calidad; estos factores se pueden clasificar en tres grupos:

- Biológico (enfermedades, plagas y malezas)
- Edáficos (pH, carencia o exceso de nutrientes)
- Climáticas (temperaturas extremas)

El total de la superficie sembrada no es cosechada por diversas causas, entre estas, por pérdidas debidas el ataque de plagas y enfermedades, entre las cuales, la antracnosis figura como una de las más importantes <http://www.sagar.gob.mx>).

## **ii. ASPECTOS SOCIOECONÓMICOS BÁSICOS DEL CULTIVO DE FRIJOL**

En el mundo son conocidas aproximadamente 150 especies de frijoles (*Phaseolus* sp.), en México se cultivan principalmente cuatro especies:

- Frijol común (*Phaseolus vulgaris*)
- Frijol comba (*P. lunatus*)
- Frijol ayocote (*P. coccineus*)
- Frijol tepari (*P. acutifolius*)

Formas cultivadas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) estuvieron presentes hace 7000- 8000 años en los valles de Tehuacán y Oaxaca, en México, en América Central, Perú, Ecuador, Argentina y Chile (Kaplan & Kaplan, 1988; Gepts & Debouck, 1991).



En algunos países los frijoles son la fuente principal de proteína en la dieta humana. La mitad de los granos de leguminosas consumidos en el mundo son frijol común, el cual es la fuente de la dieta proteica para más de quinientos millones de personas en África y América Latina.

De acuerdo a estudios de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el frijol es la leguminosa alimenticia más importante en el consumo humano en el mundo. Para el año 2009, a nivel global se cosechó un área de 25.563.866 ha con una producción de 20.698.984 t, el crecimiento de la producción mundial de frijol se ha mantenido a una tasa media de crecimiento anual de 2.8%. América Latina es el área donde se concentra el mayor porcentaje de producción, cerca del 45% del total mundial.

Considerando la producción acumulada de 2000-2010, los principales países productores de frijol en el mundo son: Brasil con 16%, seguido de la India con 15.9%, Myanmar con 10.5%, China con 8.9%, ocupando el quinto lugar se encuentra México con 5.8%, y en sexto lugar los Estados Unidos con 5.6%. Figura 1.

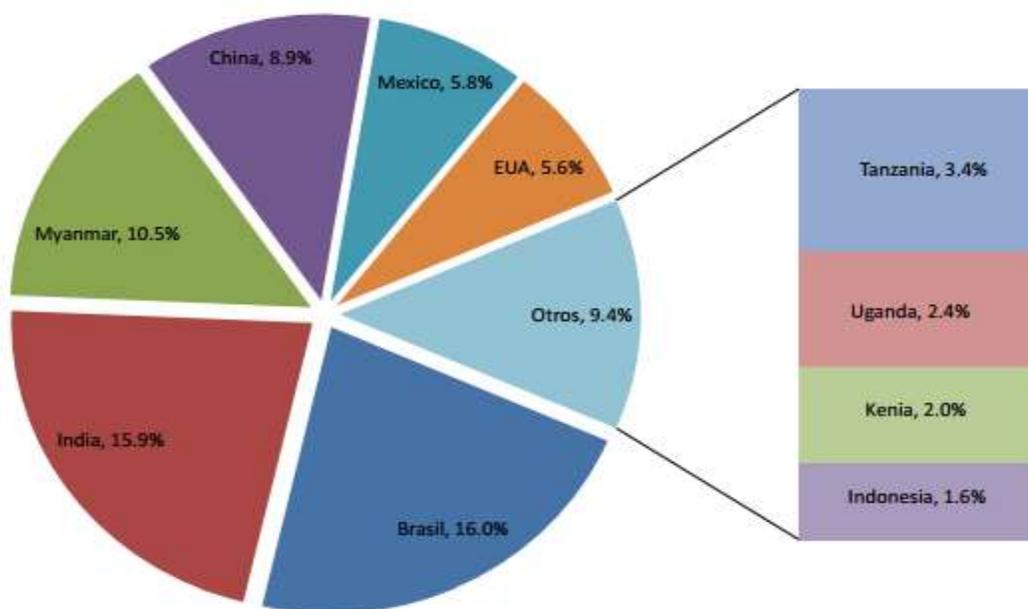


Figura 1. Principales productores de frijol en el mundo 2000-2010 % respecto a la producción mundial total. fuente: secretaria de economía, en base a datos de la fao.

El crecimiento del consumo mundial de frijol se ha mantenido a una tasa de 1.8% en promedio anual para el periodo de 2000-2007, es decir, en la misma magnitud que el crecimiento de la producción. Para el año de 2009, el consumo mundial de esta leguminosa se situó en 15.9 millones de toneladas, cifra superior en 3.8% con respecto al año anterior.

La lista de países la encabeza Brasil con el 19.7% del consumo acumulado de 2000-2007, seguido de la India con el 19.7%, en tercer lugar México con 7.7%, Estados Unidos con 6.6%, mientras que Tanzania consume el 2.7%, y Uganda con 2.7%.

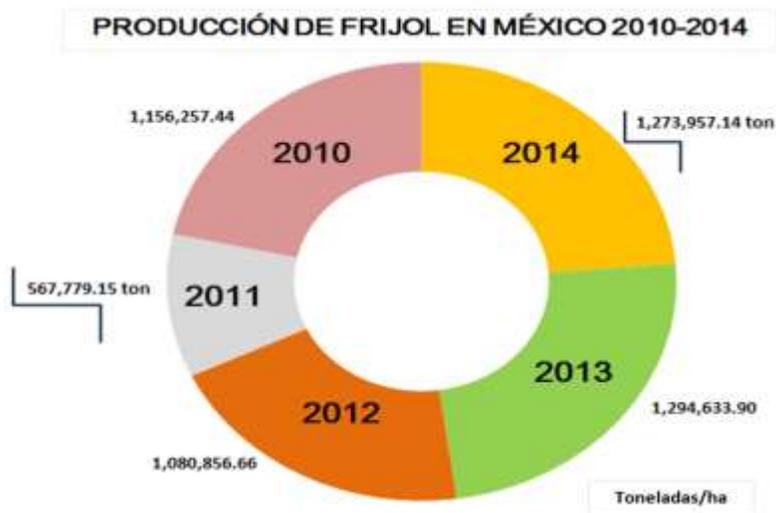
## **i. PRODUCCIÓN DE FRIJOL EN MÉXICO**

A nivel nacional el cultivo de frijol ocupa la segunda posición después del maíz, tanto en superficie cultivada como en productores agrícolas dedicados a ello. Dedicándose un 14 % de las unidades de producción en el país a esta especie (Ledesma-Mares y Ramírez-Miranda, 1994).

Para el periodo de 2000-2003, la superficie sembrada fue, en promedio, de 2.1 millones de hectáreas. A partir de 2004 y hasta 2010 la superficie sembrada ha disminuido hasta representar 1.8 millones de hectáreas. La superficie sembrada de frijol es predominantemente de temporal, con poco más de 86%. Dadas las modalidades de siembra del frijol y las regiones donde se cultiva, la superficie cosechada varía según la disponibilidad de agua pluvial.

Con una superficie sembrada para el año agrícola OT-IV 2014 de 1, 773,996.85 ha. Y una producción total de 1, 273, 957.14 de ton (SIAP, 2015) como se observa en la figura 2. El rendimiento promedio es de 630 kg./Ha (<http://www.sagar.gob.mx/>).





**Figura 2 Producción de frijol en México 2010-2014**  
 elaboración de observatorio de precios.com. mx, datos del siap, 2015

El consumo nacional aparente ha crecido a una tasa de 2.6% anual durante 2000-2011, cifra inferior al ritmo de la producción. Los periodos con mayor crecimiento del consumo nacional aparente fueron durante el periodo de 2000-2003 y en el año de 2006. En los últimos cinco años, la información disponible muestra un consumo nacional de frijol prácticamente estable en 1.16 millones de toneladas en promedio anual (Secretaría de economía).

### iii. ANTRACNOSIS (*Colletotrichum lindemuthianum*)

*C. lindemuthianum* es un hongo Deuteromycete haploide, uninucleado y hemi-biótrofo (Bryson et al., 1992). Los principales síntomas de la enfermedad son manchas color café oscuro en el envés de las hojas, cuando la infección es más fuerte afecta el tallo, donde las manchas son más hundidas. Causa lesiones en las vainas, generalmente con manchas circulares y profundas de color café, las cuales llegan a infectar al grano (Schwartz et al., 2005). En una variedad de frijol susceptible, la planta puede ser atacada desde la siembra hasta la cosecha.

Además de reducir drásticamente el rendimiento, las lesiones en las vainas y en los granos perjudican la calidad y por consiguiente su comercialización. Cuando la infección ocurre a partir de semilla infectada y en condiciones favorables para el patógeno, en conjunto con un control inadecuado la enfermedad ocasiona pérdidas entre un 45% y un 100% de la producción (Guzmán et al., 1979).

## **i. SIGNOS Y SÍNTOMAS**

Los primeros síntomas de la enfermedad se pueden observar en el envés de las hojas primarias, las nervaduras muestran lesiones de color café oscuro. Esta enfermedad puede afectar cualquier parte aérea de la planta menos la flor y puede atacar en cualquier etapa de desarrollo, (Orozco, 1974). En el hipocotilo los síntomas iniciales se presentan como manchas longitudinales y después se convierten en lesiones ovaladas y deprimidas. En el follaje los síntomas aparecen en el envés de las hojas como lesiones pequeñas de color púrpura a un tono rojo ladrillo, se localizan a lo largo de las nervaduras Figura 3.

Cuando la enfermedad es severa, se forman manchas necróticas en los tejidos adyacentes a las nervaduras, en el hipocotilo ocurren también chancros profundos que hacen que la planta se quiebre en el sitio de la lesión.

Bajo condiciones favorables para el patógeno, el hongo produce en el centro de la lesión abundante esporulación, que se puede identificar por su coloración característica rosado-amarillento. Después de un tiempo las masas de esporas se secan, apareciendo como gránulos de color café oscuro o negro. En una infección severa las vainas jóvenes se deforman por las lesiones y producen poca o nula semilla. La semilla infectada puede ser de menor tamaño y mostrar manchas generalmente pequeñas, redondas y oscuras. (Corrales, 1995). Esta enfermedad es transmisible por semilla y ocasiona severos daños en los cultivos de frijol, principalmente en climas medio y frío.



Debido a la severidad de la enfermedad, deben considerarse todos los medios de prevención posibles tales como variedades resistentes, uso de semillas libres de la enfermedad, rotación de cultivos y evitar labores en las plantas que están húmedas. (Orozco, 1974)



**Figura 3. SINTOMAS DE ANTRACNOSIS  
NECROSIS VISIBLE EN HOJAS (A), PLANTULA (B) Y VAINA (C)**

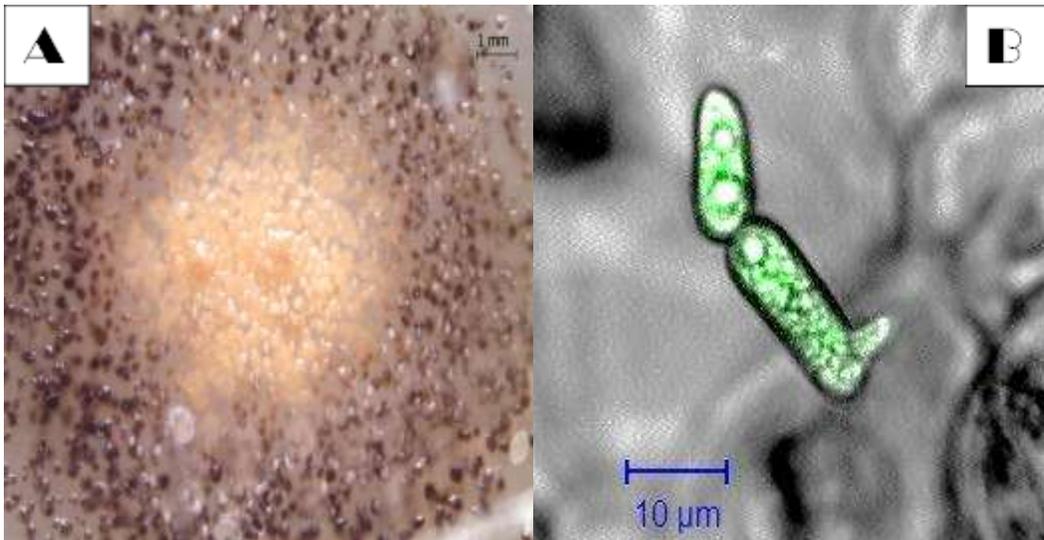
## ii. EPIDEMIOLOGIA

La antracnosis del frijol se presenta en elevaciones por encima de mil metros, en localidades con climas frescos a fríos y alta humedad relativa mayor de 92% - 100%. El desarrollo de la enfermedad es favorecido por temperatura entre 13 y 26°C, con una temperatura óptima alrededor de 17-18°C la cual favorece la esporulación y lluvias moderadas a intervalos frecuentes, las lluvias acompañadas de vientos son muy importantes para la diseminación de las esporas del patógeno a corta distancia. (Corrales, 1995).

## iii. CARACTERISTICAS DEL PATOGENO Y LA ENFERMEDAD

*C. lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Lams. –Scrib. (Telomorfo: *Glomerella cingulata* f.s. *phaseoli*, *G. lindemuthiana*) Figura 4, es un hongo Deuteromycete, haploide y uninucleado (Bryson et al., 1992). Mediante estudios de citometría de flujo y moleculares se determinó que el genoma de este hongo presenta gran plasticidad en tamaño y organización. El número de cromosomas es variable, entre 9 y 12 y es posible distinguir dos clases: un número variable de tamaño pequeño y polimórficos de aproximadamente 2.5 Mb y otra clase de más de 7 Mb.





**Figura 4** Hongo *Colletotrichum lindemuthianum*  
(A) Vista macroscópica, (B) observado al microscopio.

En la interacción con la planta, el proceso de infección inicial en interacciones compatible e incompatible es similar. El desarrollo de la enfermedad es correspondiente a una reacción de susceptibilidad, en este proceso se pueden identificar dos fases, la primera, biotrófica y la segunda, necrotrófica.

La fase biotrófica se define desde el contacto del patógeno con la pared celular, lo que desencadena la germinación de las conidias hasta que el patógeno logra penetrar en la célula vegetal y formar el micelio primario intracelular.

El proceso de infección Figura 5, inicia cuando las conidias del patógeno hacen contacto, se anclan y germinan en la superficie de la planta formando un apresorio rodeado de un mucílago extracelular, desarrollando posteriormente un poro germinativo rodeado por el apresorio. De esta estructura emerge un “clavo” de infección, el cual penetra a través de la pared de las células epidérmicas de la planta. La fuerza mecánica es un factor importante, además de la acción de enzimas cutinasas. Una vez dentro de la célula epidérmica se desarrolla una vesícula de infección, de la que emergen una o más hifas primarias. Las hifas primarias colonizan las células del huésped en forma intracelular. Las células invadidas sobreviven a la penetración hasta

48 horas aproximadamente, después de este tiempo la membrana plasmática pierde su integridad estructural y se manifiesta una desorganización citoplásmica gradual.

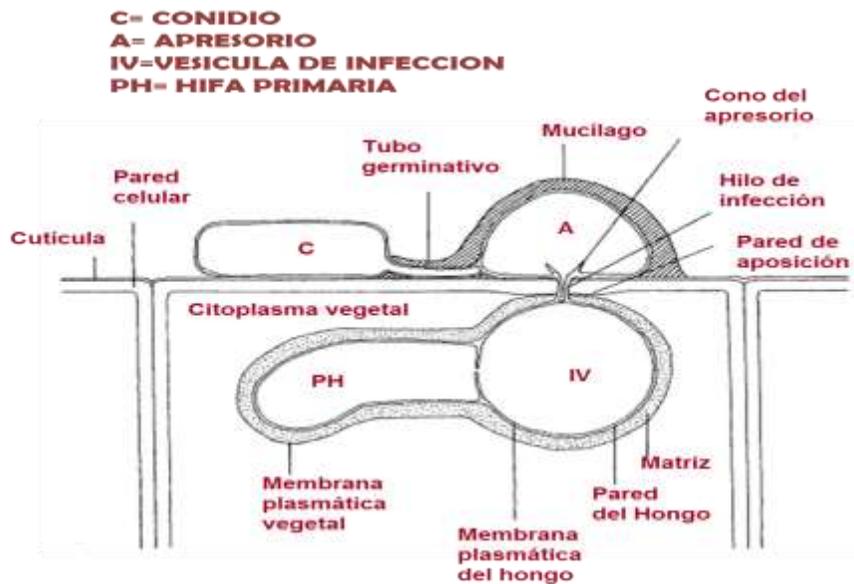


Figura 5 Proceso de la infección en interacciones compatibles *Colletotrichum lindemuthianum-Phaseolus vulgaris* (Modificado de <http://www.cell.com/trends/plant-science>)

Después de esta etapa se presenta la fase necrotrófica en la que emergen hifas llamadas secundarias, con forma de ramificaciones laterales, a través del tejido de la planta, desarrollándose tanto intra como intercelularmente. El desarrollo de estas hifas secundarias se relaciona con una rápida destrucción de la pared celular, haciéndose visibles las lesiones características de la antracnosis, lesiones ovaladas de color café que indican muerte celular en la planta. (O'Connell y Bailey, 1991; O'Connell y cols. 1985).

En el caso de una interacción incompatible entre la planta y el organismo patógeno, se puede observar que aproximadamente a las 72 horas de ocurrido el primer contacto, el citoplasma de las células epidérmicas debajo del apresorio, presentan una apariencia granular) el núcleo se mueve hacia el sitio de penetración y se desintegra formando gránulos en el citoplasma; se torna café y muere; provocando a su vez la muerte de la

hifa. Generalmente no aparecen hifas en estas células y el tejido tiene características normales.

#### iv. IDENTIFICACIÓN DE RAZAS DE *Colletotrichum lindemuthianum*

Existen muchas razas de *C. lindemuthianum*, las cuales difieren en su nivel de patogenicidad, es decir en la capacidad de desarrollar la enfermedad según un cultivar determinado, y en su grado de virulencia, es decir el grado de agresividad.

Se han efectuado numerosos reconocimientos para determinar la prevalencia y distribución de las razas (Balardin et al., 1997; Melotto et al., 2000; Riascos, 2001). Sin embargo los datos colectados usando huéspedes locales limitan el conocimiento de la variabilidad presente en *C. lindemuthianum* alrededor del mundo (Pastor-Corrales, 1988). Por tal motivo se realizó en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en 1988, el “Primer taller de antracnosis de frijol en América Latina” donde se estableció una serie diferencial de 12 cultivares de frijol de diferente origen, provenientes del acervo andino o mesoamericano correspondientes a los genotipos: Michelite, MDRK, Perry Marrow, Cornell 49242, Widusa, Kaboon, Mexico 222, PI 207262, TO, TU, AB136 y G2333; La clasificación de un patotipo se da por la suma de los valores numéricos (o número binario) de cada cultivar diferencial susceptible para ese patotipo, con esto se logró uniformizar la designación de las razas, y facilitar el intercambio de resultados y de germoplasma resistente.

La clasificación de una raza de *C. lindemuthianum* se realiza en base a la suma de los valores numéricos asignados a cada cultivar diferencial susceptible para esa raza (**Tabla 1**). Esta manera de categorizar las diferentes razas del hongo permite la comparación y compilación de datos de diferentes grupos y una completa caracterización de la alta variabilidad del hongo (Melotto et al., 2000; Kelly and Vallejo, 2004), identificándose más de 100 razas diferentes alrededor del mundo (González-Chavira et al., 2004).



Tabla 1. Caracterización de cultivares diferenciales  
Código binario, genes de resistencia y acervo genético de origen de los cultivares diferenciales empleados en la  
caracterización de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*.

<b>CULTIVARES DIFERENCIALES</b>	<b>LETRA CODIGO</b>	<b>VALOR BINARIO</b>	<b>GEN RESISTENCIA</b>	<b>DE ACERVO GENETICO</b>
Michelite	A	1	Co-11	MA
Michigan Dark Red Kidney	B	2	Co-1	A
Perry Marrow	C	4	Co-1 <sup>3</sup>	A
Cornell 49-242	D	8	Co-2	MA
Widusa	E	16	Co-1 <sup>5</sup>	A
Kaboon	F	32	Co-1 <sup>2</sup>	A
Mexico 222	G	64	Co-3	MA
PI 207262	H	128	Co-4 <sup>3</sup> Co-9	MA
TO	I	256	Co-4	MA
TU	J	512	Co-5	MA
AB 136	K	1024	Co-6	MA
G2333	L	2048	Co-4 <sup>2</sup> Co-5 <sup>2</sup> Co-7	MA

MA: MESOAMERICANO. A: ANDINO

## v. COEVOLUCIÓN DEL PATOSISTEMA

### *Phaseolus vulgaris* - *Colletotrichum lindemuthianum*.

En la naturaleza, tanto patógenos como huéspedes coexisten en un equilibrio dinámico por largos períodos. El principio básico para estudiar la coevolución en patosistemas está contemplado en la teoría gen por gen propuesta por Flor (1971), La información sobre coevolución del patosistema *P. vulgaris*- *C. lindemuthianum* es más reciente. Los primeros estudios sugiriendo coevolución en el patosistema de frijol



fueron publicados por Guzmán et al. (1995). Caracterizaron 62 aislamientos de *Phaeoisariopsis griseola*, agente causal de la mancha angular. Los resultados mostraron dos grupos de aislamientos: uno conteniendo patotipos que infectaban frijoles de tipo Andino y otro grupo que atacaba frijoles de tipo Mesoamericano, estos resultados fueron confirmados por Pastor-Corrales (1996).

En él estudió de la variación patogénica de *C. lindemuthianum*, causante de la antracnosis del frijol, se realizaron aislamientos de 13 países latinoamericanos, clasificándose en dos grupos mayoritarios, análogos a los bancos de germoplasma del huésped, a saber, Andino y Mesoamericano. Tanto la virulencia como la diversidad genética fue más amplia en aislamientos de América Central y México que de los países andinos. Se encontró que los aislamientos de la zona Andina fueron más virulentos sobre frijoles andinos y que aislamientos de Mesoamérica fueron más virulentos sobre frijoles de tipo mesoamericano.

## **vi. BIOLOGIA DE LA RESPUESTA DE DEFENSA DE LA PLANTA FRENTE AL ATAQUE DE ORGANISMOS PATOGENOS**

Las plantas se encuentran expuestas continuamente al ataque de patógenos, cada célula vegetal posee mecanismos de defensa activos y también inducibles (se activan cuando la planta entra en contacto con el patógeno. Se defienden de los patógenos ejerciendo mecanismos físicos y químicos que han adquirido durante el proceso evolutivo, reduciendo la posibilidad de infección o previniendo el acceso de patógenos al huésped.

Resistencia es entonces el atributo genéticamente regulado en la planta que le permite restringir el crecimiento y/o la reproducción del patógeno y consecuentemente, el desarrollo de la enfermedad.



Si la planta no reúne los requisitos del nicho del patógeno, o presenta suficientes barreras estructurales que impiden el avance del patógeno, contiene compuestos tóxicos preformados que inhiben al patógeno, o después del reconocimiento del patógeno, la planta enciende mecanismos activos de defensa, se dice que se establece una reacción de incompatibilidad. Si las defensas preformadas no son apropiadas, o el patógeno no es detectado por la planta, o si las respuestas de defensa activadas son ineficaces, entonces el patógeno logra invadir el tejido vegetal y desarrollar la enfermedad, lo que se conoce como reacción de compatibilidad. (Hammond –Kosack y Jones 1996)

## **i. RESISTENCIA A ENFERMEDADES**

Un patógeno puede ser muy virulento o poco virulento para un huésped dado. El grado de patogenicidad se define como virulencia. Dependiendo de su habilidad de causar enfermedad, un patógeno puede ser altamente virulento para un huésped y levemente virulento para otro. Estos conceptos han sido discutidos por Van der Plank (1968) quien propuso que el nivel de virulencia se determina con respecto a la resistencia del huésped.

En el proceso de desarrollar mecanismos de resistencia efectivos contra los patógenos, las plantas han sido capaces de coevolucionar con los patógenos, generando nuevos receptores para los AVR. Cuando una planta posee un gen R específico para cierto patógeno se produce una reacción incompatible. En una interacción incompatible, la planta activa los mecanismos de defensa efectivos, luego de reconocer al microorganismo, impidiendo su penetración, invasión o multiplicación, lo que se manifiesta como resistencia.

La resistencia activa obedece a una respuesta de la planta frente al patógeno y se basa en el modelo de la teoría del gen por gen descrito por Flor en el año 1971; (Figura 6).



Este se define por la expresión de un gen de resistencia (R) en la planta, el cual puede unir directa o indirectamente al producto del gen de avirulencia (Avr) del patógeno invasor.

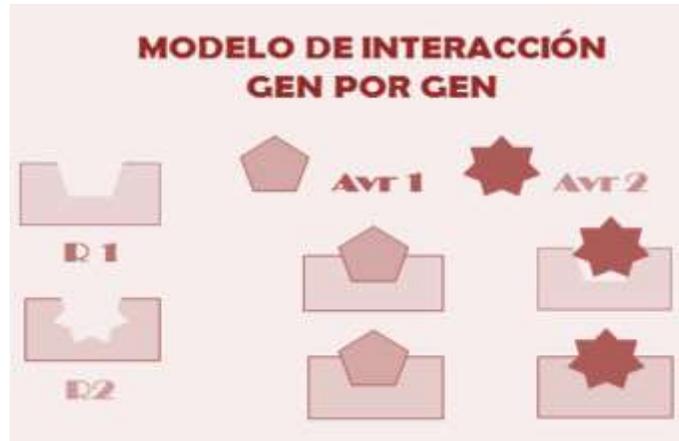


Figura 6. Modelo de Interacción Gen por Gen  
Descrito por Flor en el año 1971

Los genes *Co-1*, *Co-12* y *Co-13* han sido identificados en genotipos andinos y los restantes en genotipos del acervo mesoamericano (Young y Kelly, 1996; Singh y Schwartz, 2010).

Se ha sugerido que la resistencia a antracosis en frijol común sigue el modelo gen por gen (Flor, 1971; Melotto and Kelly, 2001), aunque la ausencia del ciclo sexual en el hongo no ha permitido la caracterización de genes de avirulencia (Creusot et al., 1999) que permitan confirmarlo.

## **ii. INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO**

La especificidad en las interacciones planta-patógeno depende del genotipo de la planta y del patógeno. Una relación compatible se refiere a una interacción entre una raza virulenta y un cultivar susceptible, mientras que una relación incompatible se establece cuando el huésped es resistente y el patógeno es avirulento

Las interacciones incompatibles (huésped resistente y patógeno avirulento) se caracterizan por estar mediadas por sistemas de reconocimiento que activan la expresión de mecanismos de defensa que frecuentemente están asociados a la manifestación de la reacción hipersensible (Heath 2000). Por el contrario, en las interacciones compatibles (huésped susceptible, patógeno virulento), el reconocimiento no se lleva a cabo, la respuesta de defensa no es activada y la enfermedad se establece (De Wit 1997).

## **iii. MECANISMOS DE DEFENSA**

El ataque por patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa en la planta blanco cuyo objetivo es detener o contrarrestar la infección. Las plantas pueden poseer mecanismos constitutivos de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se pueden dividir en mecanismos de defensa estructurales, como la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras; y mecanismos de defensa químicos constitutivos, como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales.

Los mecanismos constitutivos de resistencia en las plantas se basan en los rasgos distintivos de una especie o cultivar particular y generalmente no involucra una



respuesta activa del huésped ante la presencia del patógeno. Los mecanismos inducidos de defensa o resistencia inducida, se activan como una respuesta al ataque de un patógeno (Collinge et al. 1994). Los nuevos conocimientos confirman que la activación de defensa en las plantas tiene una base compleja que depende de la manifestación coordinada de un conjunto de mecanismos de defensa. Estos mecanismos responden a la expresión o represión de genes cuyos productos participan en las diferentes vías metabólicas que participan en la defensa. Pero, la respuesta de una planta a cualquier estímulo exógeno o endógeno nunca es el resultado de la activación de una única ruta de señalización hormonal, sino que es la consecuencia de una compleja red de interacciones entre distintas rutas de señalización. Para que ocurra la inducción de la defensa, es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los que la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutcheson 1998).

### **1. Mecanismos de señalamiento transduccional y activación de respuestas de defensa.**

La muerte de tejidos del huésped, causada por el ataque de patógenos o por una reacción de hipersensibilidad, libera componentes de la pared celular que inducen la activación de defensa en los tejidos adyacentes. De manera similar, la actividad de enzimas hidrolíticas, producidas por la célula vegetal como reacción de defensa, liberan componentes de la pared celular de ciertos hongos que provocan un efecto inductor de defensa en los tejidos vegetales.

La inducción de la reacción de defensa de una manera específica se observa en las interacciones del tipo raza-cultivar, donde el proceso de reconocimiento del patógeno por parte de la planta parece ser determinado por genes correspondientes y presentes en el patógeno y en la planta. La presencia o ausencia de genes de avirulencia en el patógeno le confieren la habilidad de causar o no la enfermedad en un cultivar determinado (De Wit 1997).



Se ha propuesto que los inductores específicos son proteínas codificadas por los genes Avr de avirulencia presentes en el patógeno, capaces de inducir las repuestas de defensa en cultivares que posean los correspondientes genes R de resistencia (Parker y Coleman 1997). El reconocimiento tiene lugar cuando ocurre una interacción entre las proteínas codificadas por los genes R y los correspondientes productos de los genes Avr del patógeno. Esta interacción origina una cascada de señales y vías de transducción de las mismas que finalmente llevan a la expresión de genes asociados a la defensa (Hammond-Kosack y Jones 1996).

## **2. Resistencia a nivel molecular**

La resistencia raza-cultivar específica depende de la expresión de genes de resistencia (R), con los cuales la planta reconoce el patógeno invasor que expresa un gen de avirulencia (avr). Los genes R codifican proteínas que pueden reconocer directa o indirectamente el ligando dependiente del gen Avr, y que las proteínas R deben ser expresadas a un nivel basal.

La caracterización molecular de varios genes R de diversas especies de plantas, con especificidad para una amplia variedad de patógenos, demuestra que estos comúnmente codifican proteínas de estructura similar aunque altamente polimórficos (Dangl y Jones, 2001). La mayoría codifica una región denominada sitio de unión a nucleótidos (NBS), unida a un repetido rico en leucinas (LRR) de longitud variable localizado hacia la región carboxilo-terminal.

Los elementos cis más comunes asociados a promotores de genes de defensa son las cajas GCC que funcionan como elementos de respuesta a etileno a través de las proteínas de unión a elementos de respuesta a etileno (EREbps). Las cajas W que son sitios de unión para la familia de proteínas WRKY que al igual que las EREbps han sido identificadas solamente en plantas, confieren capacidad de respuesta ante señales



como Ac. Salicílico, auxina, jasmonato y peróxido de hidrógeno (Rushton y col. 1998; Eulgem y cols. 2000)

De acuerdo a la secuencia de aminoácidos inferida a partir de los genes R, se han observado varios rasgos distintivos comunes a la mayoría de las proteínas R. Entre estas, se encuentran la presencia de repeticiones ricas en leucina o LRR (por sus siglas en inglés), de entre 20 y 30 aminoácidos. Estas LRR son comunes también en sistemas animales en donde también parecen ser mediadoras de las interacciones proteína-proteína (Takken y Joosten 2000). La variabilidad observada en la secuencia de amino ácidos de las LRR, confiere la especificidad del reconocimiento (Ellis et al. 2000).

Algunas de las proteínas R que poseen LRR pueden contener regiones o sitios de unión a nucleótidos o NBS (por sus siglas en inglés), las cuales pueden unirse a GTP y ATP y participar en la transducción de señales (Pan et al. 2000).

Los genes de resistencia Cf (genes Cf de tomate que confieren resistencia en contra del hongo fitopatógeno *Cladosporium fulvum* Cooke (Ellis et al., 2000) codifican proteínas transmembranarias con una LRR extra celular. Otros genes R codifican las proteínas que se localizan en el citoplasma que al parecer reconocen los productos Avr que llegan hasta el interior de la célula huésped.

La proteína Pto también tiene una localización citoplasmática y posee una región con actividad cinasa, por lo cual se le ha asignado una función clave en las vías de señales mediadas por cascadas de fosforilación, es la única proteína R que ha demostrado que interactúa directamente con la proteína de avirulencia AvrPto (Tang et al. 1996).

A la fecha se han caracterizado varios genes R y Avr de diferentes especies, los cuales indican que la activación de la defensa contra patógenos en plantas, al menos en los sistemas raza-cultivar, se encuentra mediada por la interacción de proteínas Avr y R siguiendo la hipótesis gen-por-gen (Flor 1971). Esta es la base del reconocimiento y da



como resultado la activación de una cascada de señales que, en última instancia, induce la defensa (Martin 1999). Los genes R no son responsables directos de la resistencia, pero tienen una función determinante de la especificidad del reconocimiento, actuando como iniciadores de la defensa (De Wit 1997).

#### **iv. MECANISMOS DE DEFENSA PASIVOS**

Una vez que el patógeno es reconocido se provoca la activación de una serie de mecanismos de defensa mediante cascadas de señales, las cuales aún no son completamente caracterizadas. Los mecanismos de defensa, inducidos como consecuencia del reconocimiento del patógeno son los responsables de la resistencia, actuando varias veces en conjunto para frenar el avance del patógeno. Estos mecanismos incluyen la muerte celular programada, acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, acumulación de enzimas hidrolíticas y deposición de sustancias de refuerzo para evitar el avance del patógeno, entre otros (Collinge et al. 1994)

Los mecanismos de defensa pasivos o preexistente incluyen las barreras estructurales o físicas que poseen las plantas, las cuales constituyen un obstáculo al ingreso del patógeno. Las barreras bioquímicas preformadas incluyen compuestos fenólicos, saponinas, lecitinas, etc. y las barreras estructurales o físicas de las plantas, comprenden la presencia de pelos, cera cuticular, grosor de la cutícula y de la pared celular, entre otros. Además se pueden adicionar las ceras que se encuentran sobre la cutícula, que por su carácter hidrofóbico actúan como un mecanismo indirecto de defensa contra el ataque de hongos, la cutícula misma que se localiza adherida a la capa pectinácea de la pared celular y cubre todas las partes aéreas de la planta, las cuales se componen esencialmente por cutina, que es un polímero de ácidos grasos



insolubles embebida en ceras solubles y finalmente la pared celular que consiste en aproximadamente un 90 % de polisacáridos como celulosa y hemicelulosa y 10 % de glicoproteínas como extensina, protein-arabinogalactanos y lectinas (Chet, 1987).

## **v. MECANISMOS DE DEFENSA ACTIVOS**

La resistencia activa obedece a una respuesta de la planta frente al patógeno, se basa en el modelo de la teoría del gen por gen descrito por Flor y se define por la expresión de un gen de resistencia (R) en la planta, cuyo producto puede unirse directa o indirectamente al producto del gen de avirulencia (Avr) del patógeno invasor. Una vez que la respuesta basal ha sido superada por el patógeno, la resistencia se da por el reconocimiento de un efector codificado por el patógeno, el cual es reconocido por un gen de resistencia (R) en la planta. Cuando la interacción se da el efector es considerado un factor de avirulencia. Esta respuesta se conoce como inmunidad activada por efectores (ETI) (Dangl and Jones, 2001).

Si la planta no posee el gen R específico para determinado patógeno avirulento se produce una reacción compatible donde las proteínas R actúan como receptores y las proteínas activadoras AVR como ligandos. En una interacción compatible, no se manifiesta una eficiente respuesta de defensa, lo que termina permitiendo la penetración, invasión y multiplicación del patógeno en sus tejidos, produciendo síntomas generalizados y característicos de cada patógeno.

## **vi. RESISTENCIA RAZA-CULTIVAR ESPECÍFICA**

Este tipo de resistencia raza-cultivar depende de la expresión de genes de resistencia (R), que la planta utiliza para el reconocimiento específico del patógeno



invasor que expresa un gen de avirulencia (Avr). Esto significa que los genes R codifican proteínas que pueden reconocer directa o indirectamente el ligando dependiente del gen Avr, y que las proteínas R deben ser expresadas a un nivel basal en plantas sanas.

Este evento inicial de reconocimiento del patógeno, provoca que se desencadene una amplia batería de respuestas de defensa, cuyo objetivo final es impedir la colonización y multiplicación del patógeno (Hammond-Kosack y Jones 1997; Nimchuk y cols. 2001). La resistencia inespecífica se observa en todas las especies de plantas que responden a patógenos potenciales, sin que esté presente una combinación de genes R/avr. (Somssich y Hahlbrock 1998).

## **1. Respuesta de Hipersensibilidad**

En las interacciones raza- cultivar del tipo incompatible, suele ocurrir una alteración en el metabolismo de la planta que se manifiesta con la aparición de lesiones locales necróticas en el sitio de la infección, estas lesiones son el resultado de una muerte celular programada o reacción hipersensible (HR).

Una característica de una reacción de hipersensibilidad es la rápida generación y acumulación de radicales libres, como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Después de la percepción de la señal del patógeno, se observa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en interacciones de incompatibilidad, la primera reacción de producción de especies reactivas del oxígeno no ha demostrado ser específica, produciéndose en cuestión de minutos o en horas y en respuesta a muy diversos factores como estimuladores, daño mecánico, patógenos virulentos y avirulentos; la segunda reacción se manifiesta después de algunas horas, siendo mucho más significativa y la cual se asocia fuertemente con una respuesta de hipersensibilidad.



El término hipersensibilidad originalmente aplicado por Stakman (1915) que ocurre únicamente en plantas resistentes, describe una rápida y localizada necrosis celular en la planta en el sitio de infección (Richael y Gilchist 1999), produciendo la muerte celular pocas horas después del contacto con el microorganismo patógeno.

Se asume que la RH (reacción de hipersensibilidad) no se debe a la acción de una toxina secretada por el patógeno sino a la participación activa del hospedero. Esta involucra la muerte rápida y localizada de las células que están directamente en contacto con el patógeno o próximas a él, activación de canales iónicos de membrana (influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  y eflujo de  $\text{K}^{+1}$ ), generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), fortificación de la pared celular (deposición de callosa, etc.), biosíntesis de moléculas señal tales como: Acido Salicilico, Oxido Nitrico, activación de MAP cinasas, inducción de un amplio rango de genes de defensa proteínas inducidas durante la HR: PRs (pathogenesis related proteins).

La RH juega un papel causal en la resistencia a la enfermedad, evitando el acceso del patógeno a una fuente continua de nutrientes; o debido a la liberación de sustancias preformadas tóxicas almacenadas en la vacuola. La RH puede provocar la inhibición del patógeno, o puede ocurrir como una consecuencia de la activación de otras respuestas de defensa (Hammond-Kosack y Jones 1996).

Otros datos obtenidos en plantas mutantes de *Arabidopsis* con características de RH espontánea, sugieren que este tipo de respuesta corresponde a una muerte celular programada genéticamente determinada por una señal ambiental, regulada negativamente, y que es parte de una respuesta multifacética, correlacionada con la aparición de otras respuestas típicas de defensa, como la expresión de genes de proteínas relacionadas con la patogénesis.

Un estimulador de RH requiere que la planta tenga un metabolismo activo, y la sobreproducción de un componente en la ruta de transducción de señales posterior a la activación de un gen de resistencia, induciendo una amplificación de la RH. Respecto a



la regulación de la RH, se observa que esta respuesta se correlaciona con la acumulación de moléculas de oxígeno reactivas y con la producción de óxido nítrico en proporciones determinadas (Greenberg 1997, Delledonne y cols. 1998; Delledonne y cols. 2001; Beers and McDowell 2001). La activación de la muerte celular asociada a RH está involucrada en la respuesta de resistencia, aunque su papel funcional aún no esté del todo claro.

## vii. GENES DE RESISTENCIA

La caracterización molecular de varios genes *R* de diversas especies de plantas, con especificidad a diversos patógenos, demuestra que estos comúnmente codifican proteínas de estructura similar, altamente polimórficos (Dangl y Jones, 2001). La mayoría de los genes que han sido clonados codifican proteínas que poseen una región denominada sitio de unión a nucleótidos (NBS), unida a un repetido rico en leucinas (LRR) de variable longitud localizado hacia la región carboxilo-terminal.

Un grupo de genes *R* codifica proteínas con una región denominada TIR, debido a su homología con un dominio que presenta la proteína Toll en *Drosophila melanogaster* y el receptor IL-1 en mamíferos. Las secuencias TIR se localizan hacia la región N-terminal del NBS. Un análisis filogenético indica que los dominios NBS de plantas pueden ser clasificados en dos grupos mayores, un grupo TIR y un grupo sin TIR, debido a que otros genes *R* no codifican un dominio TIR. Aunque el análisis de secuencias predice un motivo cierre de leucina en la región amino-terminal, la rama TIR consiste de secuencias exclusivas de especies de dicotiledóneas. (Hammond-Kosack y Jones 1997; Meyers y cols. 1999).

En el frijol, un estudio sobre la herencia de resistencia parcial contra *C. lindemuthianum* basada en QTLs ("quantitative trait locus"(locus para un carácter cuantitativo), indica una co-localización de secuencias que codifican NBSs y tres grupos de genes involucrados en resistencia específica contra el mismo patógeno, además de algunos genes de resistencia análogos (RGAs); todos sobre una región que



abarca 5 cM (Geffroy y cols. 2000). Otro estudio indica el agrupamiento de genes de resistencia a *C. lindemuthianum* identificando especificidades de origen andino (Co-y; Co-z) y mesoamericano (Co-9) a lo largo de un intervalo de 2.7 cM (Geffroy y cols. 1999).

Estudios iniciales sugieren una asociación entre las características estructurales de las proteínas R y las rutas de señalamiento transduccional. La mayoría de los genes R conocidos codifican proteínas con dominios característicos de auténticos receptores encontrados en mamíferos, en *Drosophila* y en levadura. Es probable que desarrollen una función tipo receptor. Basados en los antecedentes de que dominios LRR en sistemas animales participan mediando interacciones proteína-proteína, se propuso que en las plantas interactúan con los estimuladores derivados del patógeno, y que estos mismos dominios podrían estar determinando la especificidad en la resistencia a la enfermedad.

En el caso de proteínas R de localización citoplásmica, no está del todo claro si el dominio LRR es la región que confiere especificidad, se acepta que este es el dominio de reconocimiento. Otra función podría ser la dimerización o interacción con otros componentes río arriba o río abajo en la ruta de transducción de señales (Hammond-Kosack y Jones 1997; Meyers y cols. 1999; Gassman y cols. 1999). Dada la variabilidad en la organización del dominio TIR, éste también puede ser responsable de algunos aspectos del reconocimiento del patógeno (Meyers y cols. 1999).

En las secuencias NBS se demostró la presencia de al menos tres dominios de unión a ATP/GTP conocidos como dominios Kinasa-1a, Kinasa 2 y Kinasa-3a, los cuales unen ATP y presentan actividad ATPasa (Meyers y cols. 1999; Tameling y cols. 2002). Datos bioquímicos de proteínas relacionadas demuestran que el dominio NBS forma oligómeros (Srinivasula y cols. 1998). Se sugiere que el dominio TIR actúa en forma similar al dominio citoplásmico del receptor Toll en *Drosophila* e IL-1 en mamíferos, los cuales liberan y/o activan factores de transcripción. Un paralelismo entre las rutas controladas por genes de resistencia en plantas y los receptores Toll en *Drosophila* y receptor IL-1 en mamíferos es estimular la producción de oxígeno activado, además de



una modulación de las respuestas mediante la participación del ácido salicílico, en un nivel río abajo en la ruta de transducción de señales (Bent 1996).

## **viii. MECANISMOS DE SEÑALAMIENTO TRANSDUCCIONAL Y ACTIVACIÓN DE RESPUESTAS DE DEFENSA**

Los eventos celulares inmediatos que son detectados después del reconocimiento del patógeno, son la apertura de canales iónicos y la formación de ROS tales como el  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . Estas reacciones iniciales, son los pre-requisitos para los eventos posteriores de transducción de señales, resultando en la construcción de un sistema complejo de transducción de señales que dispara la respuesta general de defensa. (McDowell y Dangl 2000; Somssich y Hahlbrock 1998).

Estudios con inhibidores sugieren que la activación del receptor, está íntimamente ligada a la estimulación de canales iónicos y a la producción de ROS mediante mecanismos que involucran fosforilación de proteínas y proteínas de unión a GTP. Distintas isoformas de MAP cinasas que responden ante la presencia del patógeno se han identificado, y se ha observado que se translocan al núcleo después del ataque del patógeno, y que la activación y translocación ocurre independientemente o antes de la explosión oxidativa.

En algunos casos se activa una segunda MAP cinasa, antes de la explosión oxidativa, lo que sugiere un mecanismo de activación transcripcional inducido por el patógeno, pero independiente de las moléculas oxígeno-activas. (McDowell y Dangl 2000). Análogamente a lo que sucede con las ROS en células de mamífero donde se les ha relacionado con apoptosis, se ha determinado el mismo sentido en función de estas moléculas en la muerte celular en plantas durante la RH.



Las moléculas oxígeno-activas no son del todo suficientes para disparar la muerte celular y al parecer requieren de otro tipo de moléculas acompañantes, algunos datos recientes sugieren que estas moléculas son el ácido salicílico (AS) y el ON. El ON interactúa con moléculas oxígeno-activas particularmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducir RH y la expresión de genes de defensa, demostrando que la inducción endógena de ON es dependiente del ataque del patógeno, y que no ocurre en líneas de plantas susceptibles ó en células en suspensión, retadas con el patógeno que no expresa el gen *avr* apropiado (Delledonne y cols. 2001; McDowell y Dangl 2000)

La contribución del ON DEFINIR, el AS y las ROS parece ser de sinergia, indicando que estas moléculas interactúan directa y cooperativamente en un mecanismo de amplificación de señales. Moléculas oxígeno-activas y ON estimulan la biosíntesis del AS, y este refuerza las respuestas dependientes de ROS y ON.

La identificación del patógeno dispara un ciclo positivo de retroalimentación en la producción de ROS y ON, producción y acumulación de AS, el cual rápidamente amplifica la señal inicial y garantiza una activación de la defensa. Este ciclo que desemboca en la muerte celular programada, lo que a su vez puede liberar ROS, ON y AS hacia espacios intercelulares, e inhibir el crecimiento del patógeno o alertar a las células vecinas sobre la invasión. (McDowell y Dangl 2000)

El sistema de transducción de señales implica cambios importantes en la actividad metabólica incluyendo la polaridad de la membrana, cambios en las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> y H<sup>+</sup> y varias enzimas reguladas alostéricamente tales como NADPH-oxidasas, fosfolipasas y proteína cinasas. Estos cambios tienen efecto en varias rutas metabólicas; la inducción de fosfolipasas específicas hace que actúen sobre ácidos grasos insaturados dentro de las membranas liberando ácido linolénico, el cual sirve como sustrato para la síntesis de ácido jasmónico y metil jasmonato y otras moléculas relacionadas, las cuales actúan como moléculas señal.

Por otro lado, el estrés oxidativo impuesto sobre las células afectadas por las ROS es capaz de ocasionar la muerte celular tanto en la planta como en el patógeno; las



mismas ROS actúan como señales para la inducción de mecanismos de detoxificación, involucrando superóxido dismutasas y glutathion-S-transferasas al igual que la activación de otras reacciones de defensa en células vecinas.

El objetivo final de las diferentes rutas de transducción de señales es el núcleo, donde activan o reprimen genes observándose grandes diferencias en la activación transcripcional, implicando rutas bioquímicas tanto del metabolismo primario como secundario.

Los genes *R* pueden activar varias rutas de señalización simultáneamente actuando en forma aditiva o cooperativa, permitiendo la activación de varias respuestas de defensa. Varias de estas rutas, pueden estar conectadas río abajo de la cascada de señales, a una ruta de transducción de señales común como se ha demostrado para los genes *AtRAR1*, *NDR1* y *NPR1* que en el patosistema *Arabidopsis/Pseudomonas syringae* actúan como mediadores de la función de genes *R* sugiriendo que pueden operar en eventos de señalización lineal o en paralelo dependiendo del gen *R* correspondiente (Torneró y cols. 2002, Zhang y Shapiro 2002).

Varias de las cascadas de señalamiento río abajo son activadas por distintas subclases de proteínas *R*, las cuales convergen rápidamente y activan respuestas de defensa en común. Un grupo limitado de reguladores clave es usado en combinación para disparar respuestas transcripcionales definidas a lo largo de un grupo de genes descrito como un regulón, identificando una reprogramación transcripcional como respuesta ante la presencia de un factor biótico que impacta en el desarrollo de la planta. Resulta interesante conocer cuáles son los genes inmediatos que se activan en una reacción de incompatibilidad en un patosistema determinado, y como cada uno de ellos está involucrado en cierto grado, en disparar la respuesta de defensa subsiguiente de la planta.



**ix. GENES DE RESISTENCIA Y RESPUESTAS DE DEFENSA EN FRIJOL ANTE EL AGENTE CAUSAL DE LA ANTRACNOSIS.**

**i. GENES DE RESISTENCIA**

Los genes Co-3 y Co-4 son multialélicos (Melotto y Kelly 2001; Geffroy y cols. 1999). Algunos fragmentos correspondientes a marcadores moleculares RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico, conocida por el acrónimo inglés **RAPD** Random Amplification of Polymorphic DNA) muy ligados y cercanos a dichos genes de resistencia, contienen secuencias con alta homología a genes R, dado que poseen dominios de repetidos ricos en leucina (LRR) y sitios de unión a nucleótidos (NBS), (Geffroy y cols. 1995; Geffroy y cols. 1998).

A partir de una clona genómica aislada utilizando un marcador molecular RAPD ligado al locus Co-2 se ha logrado secuenciar dos ADNc, uno de estos con alta homología a genes R, el cual se ha sugerido como un candidato putativo del gen Co-2 (Creusot y cols. 1999). Con la ayuda de un marcador molecular fuertemente ligado al gen Co-4<sup>2</sup> que es un alelo del locus Co-4, se identificaron y clonaron varios fragmentos genómicos llegando a determinarse un marco de lectura abierto (ORF) de 1100 bp que se denominó COK-4.

La proteína deducida contiene un dominio de serina/treonina-cinasa muy similar a la proteína codificada por el gen Pto de tomate y se le ha considerado a este como un candidato a gen de resistencia Co-4 en frijol (Melotto 2001). Estos y otros datos de estudios de características cuantitativas (QTL) de resistencia ante antracnosis, revelan que los genes de resistencia o genes de defensa ante patógenos ya sea de resistencia parcial y/o específica, están co-localizados en ciertas regiones de los cromosomas (Geffroy y cols. 2000).

Estudios de biología molecular han demostrado que la especie *Phaseolus vulgaris* se diversificó a partir de tres principales centros de origen, el Mesoamericano



(México y Centroamérica) y el Andino norte (Ecuador) y Andino sur (Argentina), mediante análisis genéticos concluyendo que ocurrieron dos procesos de domesticación independientes dentro de los centros de diversidad Mesoamericano y Andino sur, lo que provocó el desarrollo de dos grupos distintos de frijoles cultivados llamados grupo genético Mesoamericano y Andino, respectivamente (Geffroy y cols. 1999; Shree 2001).

## ii. RESPUESTA DE DEFENSA TEMPRANA

Slusarenko y Longland (1986) utilizando un patosistema de frijol/*Pseudomonas syringae* observaron que en la reacción incompatible se manifestaron cambios en la actividad génica desde las 2 horas posteriores a la inoculación (hpi) y algunos ARN mensajeros mostraron un pico máximo de expresión a las 6 hpi, sin embargo sus secuencias nucleotídicas o las proteínas que codifican no fueron ni han sido posteriormente descritas. En otro estudio con un patosistema similar de frijol/*Pseudomonas syringae*, Meier y cols (1993) describieron que en las hojas primarias de la planta a través de una reacción incompatible, se presenta un incremento en la expresión de PAL (Fenilalanina Amonio Liasa) a las 3 hpi, en la misma zona de inoculación sobre el tejido foliar con un pico máximo de expresión a las 14-15 hpi. El gen CHS ( chalcona sintasa ) con una cinética parecida se incrementó desde las 3 hpi y obtuvo una mayor expresión a las 8-18 hpi. Las quitinasas también comenzaron a acumularse desde las 3-6 hpi con un máximo a las 10 hpi. Estas respuestas de defensa correlacionaron con respuestas de hipersensibilidad.

En células en suspensión de frijol estimuladas con productos extracelulares de *C. lindemuthianum*, se produjeron incrementos inmediatos con un pico a los 30 min post-inoculación en la producción de moléculas reactivas de oxígeno. Además se observaron cambios en la síntesis de ciertas proteínas a las 3 h. Otros cambios que se observaron entre las 4-6 horas fue la perturbación de las funciones de la membrana



plasmática incluyendo peroxidación de lípidos, alteración en el eflujo de protones y reducción de la actividad de las enzimas extracelulares peroxidasa y  $\beta$ -glucosidasa (Anderson y cols. 1991).

En otros modelos de estudio semejantes se observó la inducción de chalcona sintasa a las 4-6horas(Ryder y cols 1984), chalcona isomerasa a las 8horas(Dixon y cols. 1983) y fenilalanina amonia-liasa a las 3horas(Edwards y cols. 1985).

Se ha descrito también en células de frijol en suspensión, la activación de una PAL-cinasa en respuesta a un estimulador derivado de hongo, esta proteína cinasa tiene propiedades de autofosforilación, unión a calcio y fosforilación. La activación se dió dentro de los 10 min y se mantuvo hasta las 4horasposterior a la estimulación (Allwood y cols. 2002).

Estos datos sugieren entonces que la inducción rápida de los ARN mensajeros de genes involucrados en la biosíntesis de fitoalexinas (o la regulación de estos) en correlación con la actividad enzimática, son acontecimientos que ocurren en etapas tempranas en la interacción planta patógeno del patosistema *Phaseolus vulgaris-Colletotrichum lindemuthianum*, entre la unión del estimulador a la respectiva proteína receptora y la expresión de genes de defensa.

### **iii. CITOLOGÍA E INDUCCIÓN DE GENES EN INTERACCIONES COMPATIBLE E INCOMPATIBLE**

El proceso inicial de la infección en frijol ocasionada por el hongo patógeno *C. lindemuthianum* es similar en ambos tipos de interacciones, compatible e incompatible.



Una vez que la conidia germina, el apresorio se diferencia sobre la superficie del tejido vegetal, emergiendo un “clavo” de infección con el cual penetra a través de la planta, al interior de la célula epidérmica (O’Connell y cols. 1985). La rapidez con que la infección avanza, normalmente varía entre las diferentes razas del hongo.

La raza más virulenta suele desarrollarse en un menor tiempo, produciendo un mayor número de hifas secundarias y provocar síntomas más tempranos con una diferencia de variashoras, comparada con las otras razas. Las diferencias en el progreso de la infección correlacionan con diferencias en la inducción de transcritos de PAL, chalcona isomerasa (Chi), quitinasa (Cht) y glicoproteína rica en hidroxiprolina (HRGP). Se ha observado que las razas más virulentas inducen estos transcritos 32horasantes y por una longitud de tiempo más breve comparado con la inducción por las otras razas con un menor grado de virulencia (Mahé y cols. 1992).

En las interacciones incompatibles el hongo desarrolla apresorios y algunas hifas que luego aparecen inviables dentro de células muertas de la planta por HR (O’Connell y cols. 1985).

En ensayos comparativos de interacciones incompatibles, el desarrollo del hongo y el proceso de contención así como la respuesta de hipersensibilidad en la planta, presentan variaciones de acuerdo con el fondo genético de la planta y el hongo. Mahé y cols. (1993), describieron que en un caso el hongo es restringido en estado de hifa emergiendo a las 92 hpi. La respuesta de hipersensibilidad apareció a las 60 hpi con lesiones muy pequeñas; mientras que con la segunda raza avirulenta, nunca observaron estructuras intracelulares y al parecer el hongo fue contenido inmediatamente después de la penetración, los síntomas macroscópicos de muerte celular se hicieron visibles a las 44 hpi, ésto es 16 horas antes que con la otra raza del hongo. Además de que las lesiones fueron más oscuras y el área afectada ligeramente mayor; lo anterior indica que entre más rápidamente es contenido el patógeno, los síntomas de HR aparecen más pronto. Igualmente observaron notables diferencias en la inducción de los transcritos de PAL, Chi, Cht y HGRP. Los autores de estos trabajos



concluyen que múltiples señales específicas e inespecíficas regulan diferencialmente las respuestas de defensa en las interacciones *P. vulgaris* - *C. lindemuthianum*.

## IV. JUSTIFICACIÓN

La genómica, transcriptómica y proteómica permiten el estudio de los genes de un organismo en particular, logrando descubrimientos significativos de las interrelaciones entre algunas funciones metabólicas básicas de estos organismos. Este tipo de aproximaciones permiten identificar genes importantes de resistencia a enfermedades y de tolerancia a factores abióticos. Del mismo modo, son clave para la identificación de genes con potencial uso biotecnológico y la generación de marcadores moleculares para su uso en programas de mejoramiento genético asistido.

La determinación de la secuencia genómica de un organismo permite el descubrimiento de genes novedosos con sus secuencias de regulación, así como la detección de secuencias que pueden ser usados como marcadores moleculares. Una vez establecida la secuencia de un genoma se requiere un esfuerzo informático mayor para su ensamblado y la identificación o predicción de genes. Un punto importante para estos procesos es la identificación y secuenciación de fragmentos transcripcionalmente activos. BAT93 es una línea de mejoramiento de la poza genética Mesoamericana del cual se cuenta con la secuencia de su genoma. Para el desarrollo de estrategias de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares es necesario establecer una buena correlación entre los marcadores genéticos y el mapa físico. Idealmente debería contarse con la secuencia de los genomas del frijol de origen andino y del acervo mesoamericano.

Es posible obtener datos sobre el efecto del crecimiento bajo diferentes condiciones de estrés abiótico como baja disponibilidad de fósforo, y déficit hídrico, o de estrés biótico



como la respuesta al ataque de patógenos como *C. lindemuthianum* o *Pseudomonas syringae*, y un gran número de condiciones importantes en el desarrollo del frijol. Basados en el hecho de que los problemas principales del cultivo del frijol se relacionan con los estreses abióticos, en este proyecto nos centraremos en obtener información de genes cuya expresión se viese modificada en las etapas tempranas de la interacción *Phaseolus vulgaris*- *Colletotrichum lindemuthianum*.

Una vez obtenidas las secuencias, se puede analizar la diversidad del género de especies, variedades o cultivares de frijol con características agronómicas relevantes, y junto con la existencia de varios mapas genéticos, se pueden establecer marcadores moleculares que acelerarán de manera importante el mejoramiento genético tradicional, una acción apremiante para incrementar la producción de frijol en regiones de países en desarrollo cuya ingesta de proteína, minerales y carbohidratos, dependen importantemente de este cultivo.

## **V. MATERIALES Y METODOS**

### **a. MATERIAL VEGETAL**

Para el análisis de la expresión diferencial en la interacción entre el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y *Colletotrichum lindemuthianum*, se utilizó el cultivar de la línea BAT 93 para la obtención de las plántulas necesarias para la extracción de RNA y la



variedad VICTORIA un cultivar “susceptible universal” a todas las cepas de *C. lindemuthianum* probadas como cultivar control.

El cultivar BAT 93 es una línea altamente homocigota (McClean y Myers 1990), fue desarrollada en 1978 en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Colombia) a partir de las variedades Veranic 2 (G3709)/Tlalnepantla 64 (G1320)//Jamapa (G3645)/Tara (G5478) por un doble cruzamiento.

Esta variedad presenta un hábito de crecimiento tipo III y semilla de color crema, posee varios genes de resistencia que incluyen al virus del mosaico común o *BCMV* (gen I) (Rodríguez et al., 1994), *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (resistencia a la cepa 530 y resistencia en los grupos de ligamiento B2, B5, B7 y B9) (Faleiro et al., 2000), *Uromyces appendiculatus* (gen de resistencia Ur-13) (Mienie et al., 2005), y *Colletotrichum lindemuthianum*, que porta el gen de resistencia Co-9, (Johnson et al., 1997).

Las plántulas de ambas variedades de frijol se obtuvieron bajo condiciones controladas de temperatura y humedad; utilizando como sustrato una mezcla Sunshine–Vermiculita (2:1) previamente esterilizada por calor húmedo. Las semillas fueron seleccionadas previamente y escarificadas al momento de la siembra; una vez sembradas se mantuvieron en oscuridad total hasta la emergencia de la plántula y posteriormente se dejaron crecer por un periodo de 6 días en cámara de crecimiento a una temperatura de 22 ° C y condiciones de riego regular con agua destilada estéril.

Las plántulas obtenidas se utilizaron en cada caso para la inoculación del patógeno en plántula y en hipocotilo, cuyos detalles se muestran en páginas posteriores.

De la misma manera se realizó la siembra de semillas de las variedades de frijol común correspondientes a los doce diferenciales con el objetivo de evaluar y caracterizar la patogenicidad de las cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* utilizadas durante el análisis. El tiempo de desarrollo de los diferenciales fue diferente para cada cultivar por



lo que se tuvo que estandarizar el método para asegurar el nivel de madurez de cada plántula.

Así mismo con el fin de incrementar los lotes de semillas existentes, se realizó la siembra de todas las variedades de frijol bajo las condiciones antes mencionadas; después del proceso inicial de germinación y desarrollo las plántulas fueron mantenidas en invernadero y regadas con solución nutritiva, hasta alcanzar su maduración y poder recolectar las semillas.

## **b. CULTIVO DE CEPAS DE *Colletotrichum lindemuthianum* Y PREPARACIÓN DE INÓCULO**

Se utilizaron las cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* de la raza 1088, patógena para los cultivares de frijol BAT 93 y VICTORIA y la cepa correspondiente a la raza 256 no patogénica para la variedad de frijol BAT 93 y altamente patógena para el cultivar VICTORIA.

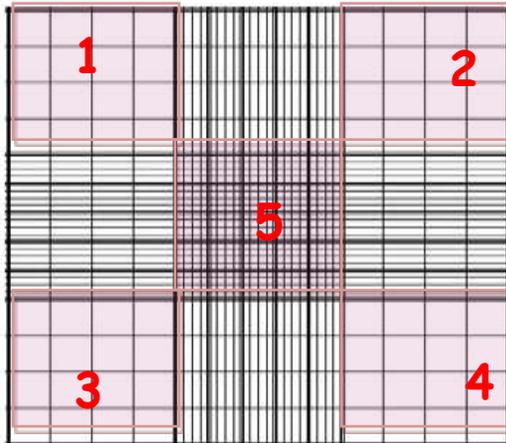
Las cepas fueron sembradas en medio M3S (utilizado para promover la producción de conidias) y se mantuvieron en incubación a una temperatura de 22 °C por un periodo de dos semanas. Las siembras se realizaron tanto en cajas Petri como en matraces Erlenmeyer de 150ml.

El inóculo utilizado para inocular a las plántulas de frijol se preparó a partir de una suspensión de conidias para ambas cepas del hongo patógeno; las conidias fueron suspendidas utilizando agua desionizada estéril (aproximadamente 15 mL por matraz).

Se contaron las conidias tomando 10 uL de la suspensión inicial a la cual llamaremos suspensión madre y se colocaron en una cámara de Neubauer para su observación al microscopio, el recuento de células se llevó a cabo en 5 campos de la cámara, como se



muestra en la , figura 7 y se calculó la concentración de conidias para cada suspensión. Ajustando finalmente la concentración del inóculo a un promedio de  $1.5 \times 10^6$  conidias /mL utilizando las formulas indicadas a continuación.



$$\sum 5 CP * 2000 = \text{número de cc}$$

$$C_2 = \text{número de cc}$$

$$V_1 C_1 = V_2 C_2 \quad V_2 = V_1 C_1 / C_2$$

$V_1$  = VOLUMEN INICIAL DE LA SUSPENSIÓN MADRE

$C_1$  = CONCENTRACION DEL INOCULO (SUSPENSIÓN FINAL)  $1.5 \times 10^6$  conidias /mL

$V_2$  = VOLUMEN NECESARIO PARA CONSEGUIR

$C_2$  = CONCENTRACION DE LA SUSPENSIÓN MADRE CALCULADA

Figura 7. Recuento de 5 campos de la cámara Neubauer

## c. INOCULACIÓN EN HIPOCOTILOS

Se siguió el protocolo descrito a continuación:

- Plantas en fase de crecimiento V2 aproximadamente una semana después de la emergencia de la semilla.
- Cortar los hipocotilos 2 cm arriba de la superficie del sustrato y 2 cm por debajo de los cotiledones.



- ▶ Sellar ambos extremos con parafina para evitar la deshidratación.
- ▶ Colocar los hipocotilos sobre bases metálicas. (De 4 a más hipocotilos por cepa).
- ▶ Introducir cada base dentro de una cámara humedad (acondicionada con papel y agua destilada estéril).
- ▶ Aplicar alícuotas de 7  $\mu$ L del inóculo sobre la superficie de cada hipocotilo, dejando un espacio aproximado de 1 cm entre cada gota colocada.
- ▶ Incubar por un periodo de tiempo de 7 a 10 días a una temperatura de 22°C, con un fotoperiodo de 12horas de luz por 12horas de oscuridad, el tiempo que permanecieran en incubación dependería de la intensidad de los síntomas observados.
- ▶ Se realizaron repeticiones de cada cepa para el cultivar BAT 93 y el control de la variedad VICTORIA.



**Figura 8. Técnica de inoculación en hipocotilos.**

En el transcurso del periodo de incubación se realizó la evaluación de síntomas tanto macroscópicamente a nivel de tejido en los hipocotilos como a nivel microscópico, con el objetivo de determinar si la reacción con el patógeno era compatible o incompatible y evaluar la severidad de la infección.

El análisis de la infección se determinó siguiendo la escala propuesta por Garrido en 1986, siguiente tabla, tabla 2. Esta se utilizó tanto para la evaluación de síntomas tanto

en hipocotilos como en plántulas. Del mismo modo se consideraron los siguientes parámetros para categorizar el tipo de reacción.

**Tabla 2. Escala para evaluación de antracnosis**

**Escala para la evaluación de la sintomatología ocasionada por la enfermedad Antracnosis. Garrido, 1986.**

---

<b>VALOR</b>	<b>SINTOMATOLOGIA</b>
<b>0</b>	SIN INFECCION. No hay presencia de síntomas visibles en el envés ni en el haz de la hoja. Las plantas son consideradas inmunes.
<b>1</b>	INFECCION LEVE. Se observan algunas lesiones pequeñas de color café rojizo sobre las principales nervaduras de la hoja, en su mayoría solo visibles en el envés
<b>2</b>	INFECCION MODERADA. Se observan manchas necróticas de color café en las nervaduras tanto principales como secundarias, rodeadas de áreas necróticas. Este síntoma se aprecia tanto por el haz como por el envés, no hay presencia de esporulación.
<b>3</b>	INFECCION SEVERA. Se observan decoloraciones de color café oscuro en todas las nervaduras de la hoja, tanto por el haz como por el envés. En ocasiones el tejido presenta necrosis, se puede identificar esporulación en las lesiones.
<b>4</b>	INFECCION MUY SEVERA. Decoloración completa de la nervadura y necrosis del tejido. Caída de hojas o rotura de tallo, abundante esporulación en las lesiones.

---



- Ⓢ **REACCION COMPATIBLE (+):** Se visualiza una lesión en el lugar del inóculo, el color de la lesión varia de café a negro, en algunas ocasiones es posible observar la presencia de conidias.
  
- Ⓢ **REACCION INCOMPATIBLE (-):** No se identifica ningún daño sobre el tejido, en algunos casos aún se puede observar el inóculo en otros se puede haber desaparecido.
  
- Ⓢ **REACCION HP:** Se observan pequeñas lesiones en el lugar donde se realizó el inóculo, sin provocar daños graves. Es considerada como una reacción incompatible.

#### **d. INOCULACIÓN EN PLÁNTULA.**

Las plántulas fueron inoculadas por aspersión, con la suspensión de inóculo indicada en páginas anteriores, a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  conidias/mL, adicionando previamente Tween ® 20 al 1 % previamente.

La aspersión se realizó en la parte aérea de la planta principalmente en tallos y envés de las hojas; una vez que las plántulas fueron totalmente asperjadas con la solución conidial, se incubaron en un sistema cerrado, para favorecer una humedad relativa del 90 % y se mantuvieron a temperatura ambiente y con un fotoperiodo de 12 horas de luz por 12 de oscuridad por un tiempo de 7 días, evaluando la sintomatología de las plántulas cada 24 horas, con el fin de estandarizar el tiempo de infección.

Una vez estandarizados los métodos de inoculación y del proceso de infección tanto en plántula como en hipocotilos, se procedió a inocular plántulas de ambas variedades de frijol (BAT 93 y VICTORIA) para la obtención de RNA durante diferentes etapas del proceso.



De acuerdo a los antecedentes teóricos sobre el desarrollo de la infección se determinó que los periodos de toma de muestra abarcaran tiempos a partir de los 15 minutos posteriores a la inoculación, 30 mpi, 1 hora posterior a la inoculación, 2hpi, 4hpi, 8hpi, 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi, y finalmente a las 96 hpi.

La inoculación se realizó por triplicado para la variedad de frijol BAT 93, por cada tiempo de muestreo y para cada una de las cepas de *C. lindemuthianum* (razas 1088 y 256); utilizando tres plantas de VICTORIA como control por cada cepa. Tres plántulas de ambas variedades de frijol, fueron inoculadas con agua destilada estéril sin la presencia del patógeno y almacenadas bajo los mismos criterios de incubación.

La recolección de muestras se realizó a los tiempos indicados anteriormente 15min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h; para ello se recolectó tejido de las plántulas infectadas (hojas y tallo) así como de las plantas que recibieron únicamente agua, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## **e. EXTRACCIÓN DE RNA**

Se realizó la extracción de RNA Total, y la síntesis de mRNA y cDNA para las muestras obtenidas, Se utilizaron distintos métodos y variaciones en los mismos con el objetivo de determinar los parámetros adecuados que nos permitieran conseguir los estándares de cantidad y calidad deseados.

Se utilizaron los siguientes métodos de extracción; siguiendo la metodología establecida por cada fabricante:

- **TRIZOL® Reagent**



- **Nucleo Spin® RNA Plant**
- **ZR RNA Micro Prep®**
- **Pure Link® Micro-to-Midi Total Rna Purification System**

Se compararon los índices de rendimiento, calidad y pureza entre cada método, eligiendo finalmente el método de extracción de Trizol más tratamiento en una columna del kit Nucleo Spin® RNA Plant, con el cual se obtuvieron los mejores resultados. Posteriormente se realizó la purificación del RNA total para la obtención del RNA mensajero siguiendo los siguientes protocolos.

## **f. EXTRACCION DE RNA T O T A L**

### **REACTIVOS**

Agua DEPC 0.1%

Trizol

Cloroformo

Isopropanol

Etanol 70 %

### **METODOLOGÍA**

- La muestra debe mantenerse congelada en nitrógeno líquido.
- Pulverizar la muestra con ayuda de un mortero con pistilo. Moliendo aproximadamente 1 g de tejido.
- Pesar un promedio de 0.1 g del tejido previamente molido, utilizando material libre de RNAsas. Depositar en un tubo eppendorf estéril.
- Adicionar 1 mL de Trizol, agitar en vortex hasta homogeneizar.



- Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
- Añadir 200  $\mu$ L de cloroformo, agitar por inversión.
- Incubar durante 3 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 15 min a 1200 rpm a una temperatura de 4°C.
- Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Adicionar 500  $\mu$ L de Isopropanol agitar por inversión.
- Mantener 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 10 min a 4°C y decantar.
- Lavar el sedimento obtenido dos veces con 1ml de etanol al 70 %; centrifugando por 2 min a 600 rpm, a temperatura ambiente. Resuspender en agua DEPC.

## g. EXTRACCIÓN DE RNA MENSAJERO

Se utilizó el siguiente protocolo:

- **Dyna Beads**® mRNA Direct Kit (Cat: No. 610.11/610.12, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway).
- Tomar 50 $\mu$ g de RNA total por cada muestra, la cual dependerá de la concentración de RNA Total calculada.
- Adicionar "Binding Buffer" (1:1) de acuerdo al volumen de RNA utilizado.
- Mezclar por inversión, incubar a 65 ° C durante 5 min.
- Colocar en hielo por espacio de 1 minuto
- Centrifugar 30 s. a 13000 rpm en temperatura ambiente.



- Utilizar 100  $\mu\text{L}$  de DYNABEADS por cada tubo que contenga muestra, colocarlas en un tubo limpio.
- Dejarlas durante 1 min en el magneto, y posteriormente extraer el buffer de almacenamiento.
- Lavar cada tubo conteniendo las Dynabeads con 100  $\mu\text{L}$  de Binding Buffer
- Mezclar en Vortex y poner en el magneto nuevamente durante otro minuto.
- Eliminar el Binding Buffer. Adicionar inmediatamente el RNA + Binding Buffer sobre las perlas.
- Homogeneizar rotando el tubo manualmente durante 10 min.
- Colocar en el magneto por espacio de 10 min.
  - Preparar una solución Buffer RT 5x. Dilución al 1x (100  $\mu\text{L}$  Buffer 5x + 400  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O DEPC).
- Extraer el sobrenadante y desecharlo.
- Posteriormente adicionar 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado A, poner en el magneto por un minuto y desechar el buffer.
- Repetir el lavado con el buffer A.
- Añadir 500  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado B, siguiendo el proceso anterior. Repetir nuevamente el lavado.
- Lavar con 500  $\mu\text{L}$  de buffer de la RT.
- Al quitar el último buffer de lavado, centrifugar utilizando la centrifuga de mesa, 1 pulso y extraer completamente el buffer utilizando 1 punta de 10  $\mu\text{L}$ .
- Adicionar 10  $\mu\text{L}$  de agua DEPC, resuspender y colocar en el Termobloc durante 5 min a 65°C.



- Poner en el magneto por espacio de 1 min, recuperar el RNAm en un tubo nuevo.
- Lavar las DYNABEADS con 10  $\mu$ L de agua DEPC y repetir los pasos anteriores.
- Una vez terminado, guardar las partículas en 500  $\mu$ L de Buffer de Almacenamiento.

## **h. PURIFICACIÓN DE mRNA.**

### **SÍNTESIS DE cDNA**

- Utilizar 50 ng de mRNA + Agua DEPC
- Adicionar 1  $\mu$ L de Oligo dt (100 ng/ $\mu$ L)
- Poner en Termociclador: Programa cDNA (65° C, 5 min).
- Una vez terminados el ciclo transferir a hielo.
- Agregar a cada tubo 4  $\mu$ L de Buffer RT + 2  $\mu$ L de dNTPs.
- Mezclar y colocar en el Termociclador a 42°C, 2 min.
- Agregar 1  $\mu$ L de Transcriptasa Reversa
- Mezclar y dejar en el Termociclador hasta concluir el programa.



## **i. EXTRACCIÓN DE DNA** *Colletotrichum lindemuthianum*

### **i. MÉTODO “DNeasy.Tissue.Kit” Qiagen, DNeasy Plant Mini Kit (50), 69104.**

- ▶ Se realizó la extracción de DNA de ambas cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* con el objetivo de enviar a secuenciar el DNA obtenido y analizar genoma correspondiente a estas cepas.
- ▶ Para ello se hizo un cultivo por separado de las razas 1088 y 256 en medio líquido M3S, en un matraz Erlenmeyer, manteniéndose en incubación en agitación constante por un periodo de dos semanas con las condiciones anteriormente indicadas para este cultivo.
- ▶ Una vez transcurrido el tiempo de incubación se filtro el micelio en embudos con una capa de Miracloth, exprimiendo hasta secar todo lo que fuese posible, congelar en nitrógeno líquido y moler utilizando un mortero con pistilo. Posteriormente se pesaron 100 mg del tejido y se transfirieron a un tubo de 1.5 ml, para realizar la extracción de DNA utilizando el siguiente protocolo.

### **ii. CONSIDERACIONES**

- ▶ Todos los componentes del kit pueden ser almacenados a temperatura ambiente (15 – 25 °C).
- ▶ El tampón AP3/E contiene clorhidrato de guanidina, que es altamente reactivo combinándose con cloro, si el líquido que contiene el buffer se derrama, limpiar con un detergente y agua.



- El buffer AP2 contiene ácido acético, es irritante.
- Buffer AP1 podría desarrollar un color amarillo durante el almacenamiento, si es así no afecta el procedimiento.
- Todos los pasos de centrifugación son llevados a cabo a temperatura ambiente (15-25°C) en una microcentrifuga.
- El buffer AP1 y el concentrado del tampón AP3/E pueden formar precipitados durante el almacenamiento. Si es necesario, calentar a 65°C para disolver los cristales (antes de agregar etanol a Buffer AP3/E). No caliente el buffer tampón AP3/E después de que el etanol se agregó.
- El tampón AW y el buffer AP3/E se suministran como concentrados. Antes del uso por primera vez debe añadir la cantidad apropiada de etanol grado biología molecular (96-100%), como se indica en la botella para obtener una solución de trabajo.
- Precalentar un baño de agua a 65°C o un termoblock.

### **iii. PROCEDIMIENTO.**

- En un tubo de 1.5 ml añadir 400 µl de Buffer AP1, a este tubo agregar el tejido molido y después agregar 4 µl de RNasa A de la solución madre (100 mg/ml) a un peso máximo de 100 mg (peso húmedo) o 20 mg (base seca), y agitar en vortex vigorosamente.
- **NOTA IMPORTANTE:** No mezclar el Buffer AP1 y la RNAasa antes de usarse.
- Incubar la mezcla durante 10 min a 65°C, mezclar de 2 a 3 veces durante la incubación por inversión del tubo.
- Agregar 130 µl de buffer AP2 al lisado, mezclar e incubar por 5 minutos en hielo.
- Recomendaciones: Centrifugar el lisado por 5 min a 14,000 rpm.
- Después de la centrifugación el sobrenadante o lisado se vierte a una columna mini spin MiniQIAshredder y se coloca sobre un tubo de colecta de 2 ml. Se centrifuga durante 2 min a 14.000 rpm.
- Se transfiere la fracción líquida obtenida en el paso anterior a un tubo nuevo sin tocar los sedimentos. Normalmente 450 µl de lisado se recuperan, pero en



algunas plantas es menos el lisado recuperado, en este caso se mide el volumen para el siguiente paso.

- ▶ Agregar 1.5 volúmenes de Buffer AP3/E para limpiar el lisado y mezclar con la pipeta. Por ejemplo a 450 µl agregar 675 µl de buffer.
- ▶ NOTA: Asegúrese de que el etanol se ha añadido al tampón AP3/E.
- ▶ NOTA: Es importante añadir el buffer AP3/E directamente al lisado y mezclar directamente e inmediatamente con la misma pipeta.
- ▶ Trasladar 650 µl de la mezcla del paso 8 incluyendo cualquier precipitado que se pueda haber formado, a la columna DNeasy mini (blanca). Centrifugar durante 1 min a 8000rpm y desechar el líquido que se queda en el tubo de colección. Reutilizar tubo de colecta en el siguiente paso.
- ▶ Repetir el paso anterior con el resto de la muestra y desechar el flujo que pasó a través del tubo de colecta.
- ▶ Colocar la DNeasy mini spin dentro de un nuevo tubo de colecta de 2 ml y agregar 500 µl de Buffer AW y centrifugar por 1 min a 8000 rpm. Desechar el líquido y reutilizar el tubo de colecta en el paso que sigue.
- ▶ NOTA: Asegúrese de que el etanol se añade al tampón AW.
- ▶ Agregar 500 µl de buffer AW a la columna DNeasy mini y centrifugar por 2 min a 14,000 rpm para secar la membrana. Desechar el flujo que pasa a través de la membrana.
- ▶ Transferir la columna DNeasy mini spin a un tubo de 1.5 o 2 ml y agregar 100 µL de Buffer AE directamente en la membrana Dneasy membrana. Incubar por 5 min a temperatura ambiente (15-25°C) y después centrifugar por 1 min  $\geq$  a 8,000 RPM para eluir.
- ▶ Repetir el paso una vez más. Un nuevo tubo de microcentrifuga puede ser usado para la segunda elución para evitar mezclas con el primer eluido (DNA disuelto).



## **j. TRANSFORMACIÓN DE *Colletotrichum lindemuthianum* UTILIZANDO *Agrobacterium tumefaciens***

Otro punto de la metodología realizada en este estudio fue el análisis microscópico de las diferentes etapas del proceso de infección entre *Phaseolus vulgaris*- *Colletotrichum lindemuthianum*, para lo cual se realizó la transformación de las cepas de *C. lindemuthianum* razas 1088 y 256, utilizando las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Y GV2260 conteniendo el plásmido con la proteína GFP ésto con el fin de que las cepas del hongo sean capaces de expresar fluorescencia y facilite el seguimiento del desarrollo del patógeno dentro del tejido huésped.

### **i. PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN**

- Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* se crecieron en 5ml de medio mínimo con kanamicina a una concentración de 50 µg/ml y con 50 µg/ml de rifampicina, durante dos días, a 28°C y en agitación a 250 rpm.
- Las células de *Agrobacterium* se diluyen a una OD600 de 0.15, utilizando medio de inducción con acetosiringona (As) y se incuba por 6 h a 28°C con agitación.
- Se toman 100 µl del cultivo de *Agrobacterium* y se mezclan con 100 µl de una suspensión de conidias de *Colletotrichum lindemuthianum* con una concentración de  $1 \times 10^6$  conidias/ml, utilizando como diluyente medio de inducción (sin As). Se mezcla por agitación.
- La mezcla se pone sobre una membrana de celofán sobre una placa de medio de inducción al cual se le ha adicionado (As) y se incuba a 22°C por



- dos días. Control negativo: co-cultivo de conidias de *C. lindemuthianum* y *Agrobacterium tumefaciens* en medio de inducción sin (As).
- Los círculos de celofán se transfieren a placas de medio M3S con 100 µg/µl de higromicina, como agente de selección y 200 µg/µl de cefotaxima, para eliminar las células de *Agrobacterium*. Incubar por 2 días a 22°C.
  - Las células transformadas se transfieren a placas de M3S con 100 µg/ml de Higromicina y 200 µg/µl de cefotaxima. Control negativo: Cultivar conidias sin tratamiento previo en placas con higromicina y cefotaxima a las mismas concentraciones, mantener en incubación.
  - La estabilidad mitótica de los hongos transformados se examina haciendo resiembras de las cepas en medio M3S con 100 µg/ml de higromicina y 200 µg/µl de cefotaxima.
  - Se realiza la observación de las conidias al microscopio para determinar la expresión de fluorescencia.

## **k. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO**

### **i. MÉTODO DE BIRNBOIM**

Para determinar la presencia del plásmido que contiene la proteína GFP en las cepas transformadas de *C. lindemuthianum* se realizó la extracción del DNA plásmidico del hongo, el cual fue crecido durante dos semanas en medio líquido M3S a 22°C. Posteriormente se realizó la extracción bajo el siguiente protocolo.

- Dividir el caldo de cultivo en tubos Eppendorf de 1.5 ml, centrifugar 3 min a 12000 rpm decantar el sobrenadante.
- Agrega 110 µl de solución salina P1 y 3 µl de RNAasa, resuspender el sedimento agitando con la mano.



- ▶ Adicionar 110 ml de solución P2, mezclar por inversión lentamente 4 veces.
- ▶ Adicionar 135 ml de solución P3 y agitar por inversión.
- ▶ Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
- ▶ Adicionar 200 ml de cloroformo a 4°C, agitar muy bien hasta formar un precipitado blanco.
- ▶ Centrifugar por 10 minutos a 12000 rpm.
- ▶ Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo.
- ▶ Adicionar 1 volumen de isopropanol a -20°C y mezclar por inversión.
- ▶ Centrifugar por 10 min a temperatura ambiente, decantar el sobrenadante.
- ▶ Adicionar 500 ml de etanol al 70% y agitar para despegar el sedimento formado.
- ▶ Centrifugar 5 min a 12000 rpm, decantar y dejar secar el sedimento.
- ▶ Resuspender el sedimento en agua desionizada estéril (de 30 a 100 µl).

## Solución P1

Disolver:

0.606 g de Tris base

0.372 g de Na.EDTA.2H<sub>2</sub>O

Disolver en 80 ml de H<sub>2</sub>O desionizada

Llevar el pH a 8 con HCL

Llevar el volumen a 100 ml con H<sub>2</sub>O desionizada

Esterilizar.



## Solución P2

Disolver 0.8 g de NaOH (en pastillas) en 95 ml de H<sub>2</sub>O doble destilada; agregar 5ml de SDS al 20 % en solución.

Esterilizar.

## Solución P3

Disolver 29.45 g de acetato de potasio en 50 ml de H<sub>2</sub>O desionizada

Llevar el pH a 5.5 con ácido acético glacial.

Llevar el volumen a 100 ml con H<sub>2</sub>O desionizada

Esterilizar.

# I. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LA INTERACCIÓN *Phaseolus vulgaris* - *Colletotrichum lindemuthianum*

El análisis microscópico se realizó considerando para la toma de muestra los intervalos de tiempo, mencionados en páginas anteriores; a lo largo de todo el desarrollo de la enfermedad, inoculando con las cepas transformadas y sus respectivos controles, todo esto siguiendo el protocolo de inoculación e incubación descrito previamente.

Una vez que las plántulas fueron inoculadas e incubadas se realizó la toma de muestra de cada planta infectada con las cepas transformantes y los controles correspondientes. El primer muestreo se realizó a los 15 min posteriores a la



inoculación. Para ello se procedió a cortar tejido (hojas y tallo), y se retiró la capa superficial de la epidermis con ayuda de pinzas de disección y bisturí.

El tejido se colocó sobre un portaobjetos y se observó en un microscopio confocal con los parámetros indicados a continuación:

Objetivo: EC Plan-Neofluar 40x/0.75 M27

Longitud de onda: 480 nm

Filtros: Ch3: BP 500-520 IR

Este proceso se repitió para cada muestra recolectada posteriormente a los 30 minutos posteriores a la inoculación, 1, 2, 4, 8, 24,48, 72 y 96horas después de inoculadas.

Cabe mencionar que la toma de muestras y la inoculación se realizó tanto en planta como en hipocotilo como control del proceso y desarrollo de la infección. Previamente se observaron al microscopio las cepas del hongo transformante y los controles de las cepas sin transformar.

### **m. SECUENCIACIÓN POR SÍNTESIS**

El RNA obtenido por extracción de las plántulas inoculadas se mandó secuenciar utilizando la plataforma de Secuenciación por Síntesis (SBS), con el sistema HiSeq2000 de Illumina, el cual tiene la capacidad para generar aproximadamente 33 Gb y 168 millones de lecturas por línea (lecturas no filtradas 1x100).

Fueron secuenciadas 5 muestras por cada condición de inoculación; las cuales se describen en la tabla 3, que identificar el tipo de interacción al que corresponde cada muestra, los intervalos de tiempo en los que fueron recolectadas y el ID con el que se nombraron.



Las muestras secuenciadas individualmente fueron las correspondientes a los tiempos de los 15 min a las 2 h en cada condición y a su vez un conglomerado de las muestras que incluyen los tiempos de 4 a 96 h respecto a la condición correspondiente (indicadas en color rosa).

Se prepararon 15 bibliotecas truSeq a partir de RNA de las cuales se corrieron en 2 Líneas de 1x100. Los datos de cada muestra se pueden observar en la tabla 3 sigue.



Tabla 3. Relación de muestras de RNA de BAT 93 en la interacción Planta-Patógeno secuenciadas.

En rosa se señala el conglomerado de muestras para cada condición.

<b>CONDICIONES DE INOCULACION</b>	<b>No.</b>	<b>INTERVALO DE TIEMPO</b>	<b>ID. MUESTRA</b>
<b>B9-1 INTERACCIÓN NO COMPATIBLE</b>	<b>1</b>	15 MINUTOS	<b>B9-1-15Min</b>
	<b>2</b>	30 MINUTOS	<b>B9-1-30Min</b>
	<b>3</b>	1 HORA	<b>B9-1-01H</b>
	<b>4</b>	2 HORAS	<b>B9-1-02H</b>
	<b>5</b>	4 HORAS	<b>B9-1-04H</b>
		8 HORAS	<b>B9-1-08H</b>
		24 HORAS	<b>B9-1-24H</b>
		48 HORAS	<b>B9-1-48H</b>
		72 HORAS	<b>B9-1-72H</b>
		96 HORAS	<b>B9-1-96H</b>
<b>B9-2 INTERACCIÓN COMPATIBLE</b>	<b>6</b>	15 MINUTOS	<b>B9-2-15Min</b>
	<b>7</b>	30 MINUTOS	<b>B9-2-30Min</b>
	<b>8</b>	1 HORA	<b>B9-2-01H</b>
	<b>9</b>	2 HORAS	<b>B9-2-02H</b>
	<b>10</b>	4 HORAS	<b>B9-2-04H</b>
		8 HORAS	<b>B9-2-08H</b>
		24 HORAS	<b>B9-2-24H</b>
		48 HORAS	<b>B9-2-48H</b>
		72 HORAS	<b>B9-2-72H</b>
		96 HORAS	<b>B9-2-96H</b>
<b>B9-3 SIN INOCULACIÓN</b>	<b>11</b>	15 MINUTOS	<b>B9-3-15Min</b>
	<b>12</b>	30 MINUTOS	<b>B9-3-30Min</b>
	<b>13</b>	1 HORA	<b>B9-3-01H</b>
	<b>14</b>	2 HORAS	<b>B9-3-02H</b>
	<b>15</b>	4 HORAS	<b>B9-3-04H</b>
		8 HORAS	<b>B9-3-08H</b>
		24 HORAS	<b>B9-3-24H</b>
		48 HORAS	<b>B9-3-48H</b>
		72 HORAS	<b>B9-3-72H</b>
		96 HORAS	<b>B9-3-96H</b>



## **n. ANALISIS BIOINFORMÁTICO**

### **Estrategia experimental**

Se llevó a cabo un análisis transcriptómico basado en una corrida de secuenciación de una mezcla de todas las condiciones posibles (tratamientos experimentales del patosistema *P. vulgaris* – *C. lindemuthianum*), esto permitió detectar secuencias de ADN transcripcionalmente. Esta tecnología genera lecturas del transcrito en diferentes regiones de manera aleatoria a lo largo de los genes, permitiendo la reconstrucción de genes completos, para el análisis de la expresión diferencial de los genes.

Los pasos básicos en el análisis bioinformático son: (1) la preparación de las lecturas, (2) el mapeo y ensamblaje, y (3) la identificación de genes diferencialmente expresados. Adicionalmente, se pueden identificar RNAs no codificantes

En una primera fase de la secuenciación se planteó la generación de bibliotecas truSeq a partir de RNA de *Phaseolus s*, considerando diferentes factores: Interacción con el hongo *C lindemuthianum*, (3 condiciones) interacción compatible, interacción incompatible y un control (utilizando agua destilada estéril), y 5 diferentes tiempos de exposición, considerando que la etapa temprana de la interacción es determinante en el desarrollo o resistencia a la enfermedad se consideraron los tiempos de la interacción de 15 min, 30 min, 60 min, 120 min y una mezcla de las muestras recolectadas a diferentes episodios de tiempo a partir de las 4 hpi hasta las 96 hpi, obteniendo un total de 15 tratamientos sin replicas, realizando una Secuenciación por síntesis con el sistema HiSeq2000 de Illumina en un formato de corrida: 1x100.

Una vez obtenidas las secuencias de este tipo, para facilitar el ensamblado de las secuencia, antes de iniciar los procesos de alineación y análisis, se utilizó el programa de Fast QC que es una herramienta que produce un informe de análisis de la calidad en los ficheros FASTQ, que nos sirve para realizar algunas comprobaciones iniciales sobre la calidad de los datos.



Las secuencias obtenidas fueron para procesadas a través de Trimmomatic, un programa para el filtrado de secuencias automático especializado en datos de NGS Illumina hacer el recorte de la calidad basado en las cualidades básicas de lectura individuales.

Trimmomatic incluye una variedad de pasos de procesamiento para el recorte y filtrado de lecturas, las principales innovaciones algorítmicas están relacionadas con la identificación de secuencias de adaptadores y el filtrado de la calidad. Trimmomatic ofrece dos alternativas principales de filtrado de calidad, ambos enfoques aprovechan de la puntuación de calidad Illumina de cada posición de base para determinar qué región de la lectura se debe cortar , lo que resulta en la retención de la porción 5' , mientras que la secuencia en 3' del punto de corte se desecha. Esto encaja bien con los datos típicos de Illumina que generalmente tienen peor calidad hacia el extremo 3' .

El ensamblado se realizó utilizando herramientas bioinformáticas que ya han demostrado ser exitosas para el análisis y ensamblado en genomas de tamaño y complejidad similares. Para generar un conjunto de referencia que se puede utilizar más adelante para el análisis de expresión diferencial, se utilizó la herramienta Trinity Assembly que nos permite combinar en primer lugar los conjuntos de datos de lectura para las diferentes condiciones de conjunto de novo de datos de RNA -Seq lo cual nos permite estudiar la expresión de genes a nivel del transcriptoma sin la necesidad de una secuencia del genoma, para identificar las transcripciones expresados diferencialmente entre las muestras , y las estrategias para identificar genes que codifican proteínas .

Una vez obtenidos, las secuencias finales se mapean contra el genoma de referencia de BAT 93. Para el mapeo de secuencias contra el genoma se utilizó la herramienta TopHat, que es un programa que trata de alinear secuencias cortas de RNA dentro de un genoma para identificar las uniones de empalme exon-exon. Se basa en la



alineación ultra rápida de lecturas cortas de Bowtie1 para su funcionamiento. TopHat corre únicamente en Linux y OS X.

TopHat fue diseñado para trabajar con lecturas producidas por Illumina Genome, lo que hace es mapear las secuencias cortas de RNA en el genoma; acto seguido, Tophat, identifica exones potenciales, ya que muchas secuencias cortas de RNA se alinean de manera continua en el genoma. Usando este mapeo inicial, TopHat construye una base de datos con todas las uniones posibles, y a continuación mapea cada una de las lecturas con su posible unión para confirmarlas.

Para la anotación de los genes, se utilizó una batería de herramientas (principalmente programas BLAST) para la comparación con genes en bases de datos de organismos relacionados y generales no redundantes (nr de NCBI). También se contempla anotar contra el genoma de acuerdo al esquema de clasificación funcional desarrollado por el Consorcio de Ontologías Génicas (Gene Ontology).

Se utilizó My SQL para el desarrollo de una base de datos que nos permitirá almacenar y organizar los datos generados en este proyecto. Todos los resultados obtenidos durante el análisis informático fueron almacenados en formatos compatibles con herramientas de uso común (tales como FASTA y GFF3) para facilitar la distribución de los datos.

## **o. IDENTIFICACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS**

La selección del programa dependerá, en gran medida, del número de réplicas biológicas disponibles en el ensayo, antes de poder identificar DEGs se deben "normalizar" los datos de las abundancias de los transcritos hipotéticos, por el cual se busca minimizar el ruido técnico introducido en los datos durante el proceso de



secuenciación con el fin de volverlos comparables entre sí. Existen numerosos métodos de normalización dentro de los cuales los más ampliamente utilizados son la normalización por tamaño de biblioteca y por longitud del fragmento o transcrito hipotético.

El método de normalización que emplea ambas correcciones mencionadas se conoce como FPKM por sus siglas en inglés (Fragments Per Kilobase Of Transcript Per Million Mapped Reads). Debido al gran número de genes presentes en cada ensayo de RNA-Seq se requiere una corrección para las múltiples comparaciones (una por cada gen entre dos tratamientos) con el fin de evitar falsos positivos; a medida que aumentan las comparaciones aumenta la probabilidad de encontrar diferencias por azar. Se utilizaron los programas paramétricos EdgeR (Robinson et al., 2010) y DESeq (Anders y Huber, 2010) que siguen asumiendo una distribución teórica de los datos y una estimación de la relación existente entre media y varianza; parámetros difíciles de estimar por separado con pocas réplicas biológicas. Por falta de réplicas biológicas se utilizó la estrategia de utilizar tiempos vecinos para ser analizados con pseudo replicas y analizados diversos contrastes entre los factores analizados.

La secuenciación de RNAs (RNA-Seq) brinda un panorama global del transcriptoma de un organismo bajo una condición específica, generando datos transcriptómicos cuantificables a escalas antes no logradas.

## **p. ANÁLISIS DEL SISTEMA FACTORIAL SIN REPLICAS**

El objetivo principal del experimento fue determinar los efectos del tiempo interacción con el patógeno en la expresión de genes de *Phaseolus*. Los datos obtenidos, consistentes en 15 bibliotecas producto de un experimento factorial sin replicas, fueron normalizados, (Transcritos por Millon TPM). Debido a la ausencia de



réplicas del tratamiento; si sólo los cambios de expresión entre las bibliotecas se tienen en cuenta, se tendría un error en la estimación de la varianza para evaluar los cambios significativos de los genes expresados. En ese caso, incluso se decidió realizar una prueba estadística para tener en cuenta cambios biológicamente relevantes.

La solución para el análisis de estos datos es considerar algunos de los tratamientos como replicas o más precisamente como pseudo- replicas. Decidimos utilizar tiempos de exposición vecinos como pseudo-replicas y definir todos los contrastes posibles entre los factores analizados. Además, en la interpretación de los resultados es importante a tener en cuenta que la variación dentro de las pseudo- réplicas tiene dos componentes: La (variación aleatoria), además de la variación debida a la diferencia en el tiempo de la exposición. Debido a este hecho fuimos estrictos cuando se declare un gen como "significativo" porque las diferencias de expresión entre un par de tiempos vecinos fueron consideradas como error.

Para realizar el análisis se utilizó la función exactTest del paquete edgeR. En nuestros casos los dos grupos siempre se formaron por dos pseudo-réplicas de los tiempos vecinos. Para implementar un error experimental de tipo I,  $\alpha = 0.05$ , se utilizó la corrección de Bonferroni que consiste en dividir el nivel deseado por el número de pruebas a realizar y utilizar el valor resultante como umbral de significancia en las pruebas individuales.

Dado que realizamos 21,325 pruebas (para el correspondiente número de genes), el error en pruebas individuales se estableció como  $\alpha = 0.05/21,325 = 2.35 \times 10^{-6}$ .



## VI. RESULTADOS

Para la asignación del patotipo y nivel de virulencia de las cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* a ser evaluadas, se emplearon plantulas de doce diferenciales de frijol. Estas plántulas fueron mantenidas en incubación por intervalos de tiempo distintos para cada variedad, dependiendo del ritmo de desarrollo de cada una en específico; los tiempos de incubación variaron desde los 5 hasta los 9 días, para los cultivares que mostraron un crecimiento más lento, una vez transcurrido este tiempo se determinó que las plántulas habían alcanzado el nivel de madurez óptimo para soportar las inoculaciones con el patógeno, asegurando que los síntomas fueran ocasionados por el desarrollo de la enfermedad y no por el envejecimiento prematuro de la plántula, esto se concluyó después de múltiples observaciones y pruebas a diferentes intervalos de tiempo (Figura 9).



Figura 9. Semillas y plántulas de las variedades BAT 93 y VICTORIA.

A) Semillas de frijol de la variedad BAT93. B) Emergencia de las plántulas de la variedad VICTORIA días después de realizar la siembra en sustrato. C) Plántulas de la variedad de frijol BAT 93, a los 4 días de incubación. D) Plántula con el tamaño y nivel de desarrollo adecuado para someter al proceso de infección.

En el caso de los cultivares correspondientes a los doce diferenciales también hubo discrepancias en los tiempos de desarrollo, los cuales fueron optimizados de acuerdo a los requerimientos particulares de cada uno, figura 10.



**Figura 10. Semillas y plántulas de las variedades BAT 93 y VICTORIA, en el estado fenológico propicio para la inoculación**

**A) Plántulas de la variedad VICTORIA a los 5 días de incubación en oscuridad total, es posible notar la elongación del hipocotilo. B) y C) Hipocotilos de la variedad BAT 93 y VICTORIA correspondientemente, inoculados con el patógeno**

Por otro lado, las cepas de *C. lindemuthianum* fueron crecidas en medio de cultivo M3S debido a que este medio mostro una mayor producción de conidias y un mejor desarrollo del hongo, comparado contra otros medios empleados con el mismo propósito descritos en el apartado de materiales y métodos.

Los hongos se mantuvieron en incubación a 22°C durante un periodo de dos semanas, en oscuridad, este fue el periodo en el que se observó la mayor producción de conidias y la viabilidad de estas en el proceso de infección, en la siguiente figura se pueden observar dos cepas de *Colletotrichum* a diferentes tiempos de incubación (Figura 11).



Figura 11. Cepas de *Colletotrichum lindemuthianum*

A) Cepa de *Colletotrichum lindemuthianum* después de dos semanas de incubación, sembrada en matraz Erlenmeyer en medio M3S, se puede observar una producción abundante de conidias. B) Cepa de *Colletotrichum lindemuthianum* de una semana de crecimiento, la presencia de conidias es menor en este periodo de tiempo.

Para llevar a cabo los ensayos de infección, se utilizó una suspensión de conidias, de cada una de las cepas de *C. lindemuthianum* previamente crecidas en medio M3S, siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos. De acuerdo a los datos obtenidos se pudo determinar el tiempo óptimo para la recolección de conidias a las dos semanas de desarrollo del hongo, tiempo que coincidió con el observado en cuanto a crecimiento y producción de conidias (Figura 12).



**Figura 12** Cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* y recolección de conidias.

A) Cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* creciendo en matraz Erlenmeyer, en medio M3S. B) Suspensión de conidias de distintas cepas de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Se realizó una observación microscópica y conteo de conidias de cada una de las cepas de *C.* analizadas, con la finalidad de determinar la concentración y viabilidad de las conidias de cada patotipo, estas observaciones fueron realizadas de igual modo, 1, 2 y 3 semanas posteriores a la fecha de siembra en medio M3S, de acuerdo a lo observado en una semana de desarrollo la producción de conidias era baja o nula para algunas cepas; a las 3 semanas de desarrollo del hongo había una importante presencia de conidias; sin embargo, muchas de estas mostraban alteraciones en su estructura lo que fue considerado como una repercusión en la viabilidad de las conidias para propiciar la infección (Figura 13).

Las cepas de dos semanas de desarrollo mostraron un mayor rendimiento en cuanto a número y viabilidad de las conidias, lo cual permite considerar que dos semanas de incubación es el tiempo de desarrollo adecuado para el hongo donde este alcanza la madurez, viabilidad y cantidad optima en las conidias, que permita el desarrollo de la interacción planta-patógeno satisfactoriamente.

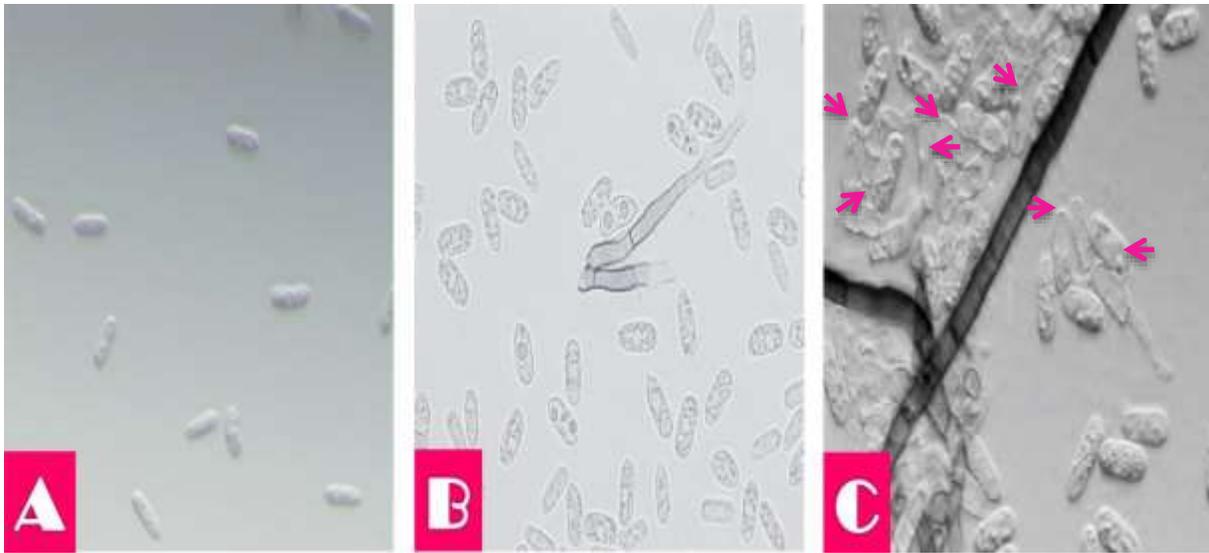


Figura 13. Observación microscópica de la cepa 1088 de *C. lindemuthianum* a diferentes intervalos de tiempo.

A) Imagen correspondiente a una semana de crecimiento del hongo, se puede observar un número reducido de conidias presentes en la muestra. B) Observación microscópica a dos semanas de desarrollo del hongo, se puede diferenciar un número abundante de conidias perfectamente desarrolladas y sin alteraciones. C) Tres semanas posteriores a la fecha de incubación, se observa de igual forma un número elevado de conidias, sin embargo estas presentan alteraciones en su estructura, como si estuvieran vacías (señaladas por flechas).

Las cepas de *C. lindemuthianum* fueron caracterizadas por su patotipo y nivel de virulencia utilizando para esto hipocotilos de plántulas de frijol en fase de crecimiento V2 correspondientes a las variedades descritas como los doce diferenciales.

En total se analizaron 7 cepas de *C. lindemuthianum* correspondientes a las razas 448, 1088, 256, 384, 292, 2 y 1280, se evaluaron los síntomas de la interacción de cada una de estas cepas con los 12 cultivares de frijol, una semana después de haber sido inoculadas, los resultados se muestran en la tabla X.

La aparición de los síntomas propios del desarrollo de la enfermedad en los hipocotilos fue de manera gradual, presentándose los primeros, tres días posteriores a la inoculación con el patógeno, siendo estos, pequeñas lesiones de color marrón sobre la superficie del tejido inoculado en el caso de interacciones compatibles. Una semana posterior a la inoculación el daño causado sobre los hipocotilos infectados iba de moderado con presencia de lesiones de mayor tamaño a severo con grandes lesiones

de color marrón oscuro, presencia de chancros y lesiones sobre el tejido, manchas necróticas, y descomposición del tejido del hipocotilo.

En el caso de las interacciones incompatibles solo fueron observados en algunas variedades, pequeñas lesiones en el tejido inoculado ocasionadas por reacciones de hipersensibilidad de la planta, en la mayoría de los hipocotilos resistentes no hubo alteraciones en el tejido ni cambios notables.



Tabla 4. Resultados de la evaluación de síntomas en la interacción Planta-Patógeno

Entre los doce diferenciales de frijol y las cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* analizadas, se describe la variedad de frijol, la cepa del patógeno con la que fue confrontada, el resultado de esta interacción y el nivel de reacción en el caso de ser compatible.

CULTIVARES	CEPA	INTERACCIÓN	GRADO DE REACCIÓN
MICHELITE	1088, 448, 256 384, 292, 2, 1280	INCOMPATIBLE PARA TODAS LAS CEPAS	0
M.D.R.K	1088, 448, 256 384, 292, 2, 1280	COMPATIBLE PARA 2	2 - 4
PERRY MARROW	1088, 448, 256 384, 292, 2, 1280	COMPATIBLE PARA 292, 256	292 - 3 256 - 1
CORNELL	1088, 448, 256 384, 292, 2, 1280	INCOMPATIBLE PARA TODAS LAS CEPAS	0
WIDUSA	1088, 448, 256 384, 292, 2, 1280	INCOMPATIBLE PARA TODAS LAS CEPAS	0
KABOON	1088, 448, 256 384, 292, 2, 1280	INCOMPATIBLE PARA TODAS LAS CEPAS	0
MEX 222	1088, 448, 256 384, 292, 2, 1280	COMPATIBLE PARA 448, 1088	448 - 3 1088 - 4
PI 207262	1088, 448, 256 384, 292, 2, 1280	COMPATIBLE PARA 448, 384	448 - 3 384 - 4
TO	1088, 448, 256 384, 292, 2, 1280	COMPATIBLE PARA 256, 292, 1280	256 - 4 292 - 4 1280 - 4
TU	1088, 448, 256 384, 292, 2, 1280	INCOMPATIBLE PARA TODAS LAS CEPAS	0
AB 136	1088, 448, 256 384, 292, 2, 1280	COMPATIBLE PARA 1280	1280 - 4
G 2333	1088, 448, 256 384, 292, 2, 1280	INCOMPATIBLE PARA TODAS LAS CEPAS	0



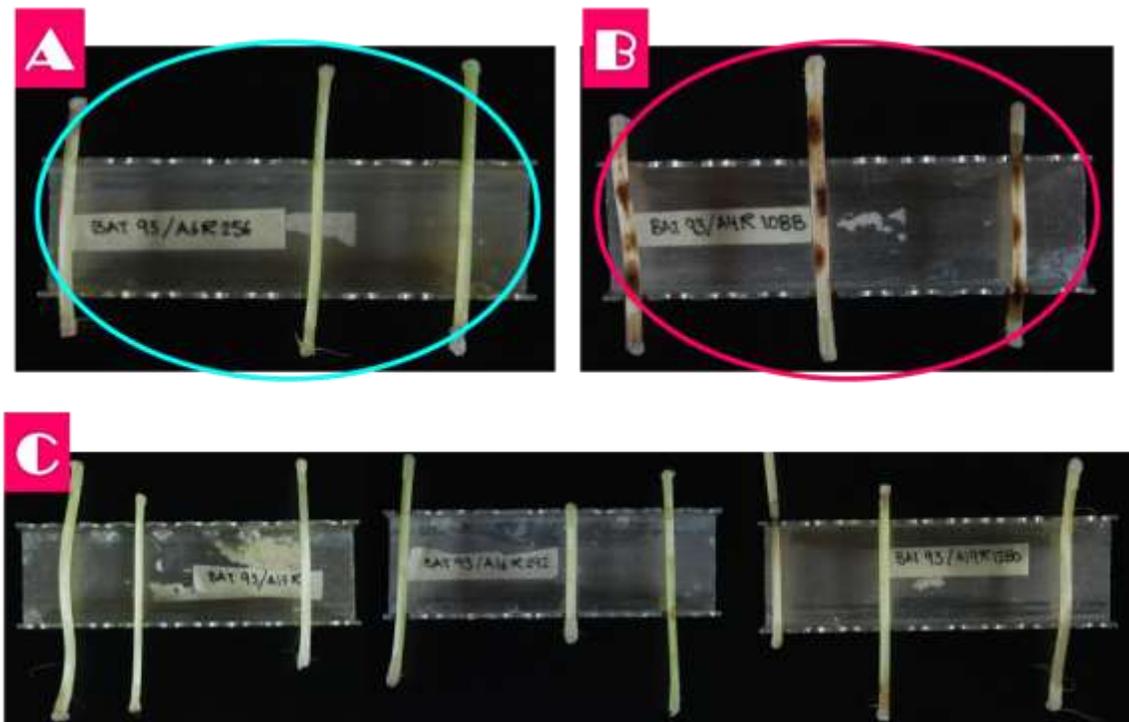
Los resultados de las evaluaciones permitieron corroborar el patotipo de cada una de las cepas evaluadas así como su capacidad de infección y el nivel de virulencia de estas con respecto a las variedades de frijol utilizadas.

El análisis a nivel transcriptoma de la interacción Planta – Patógeno entre frijol y *C. lindemuthianum* fue realizado utilizando como modelo de estudio la variedad de frijol BAT93 y como control susceptible a la infección el cultivar VICTORIA. Se analizó el comportamiento de la interacción de cinco razas de *Colletotrichum* con estos cultivares, estas fueron seleccionadas en base a los resultados obtenidos respecto al grado de virulencia, viabilidad de las conidias, capacidad de adaptación y desarrollo del hongo; las cepas seleccionadas fueron las correspondientes a las razas 256, 1088, 292, 2, 384, 1280.

En el caso del cultivar BAT93 con la cepa de *Colletotrichum* 1088 se desarrolló una interacción compatible, observándose los primeros síntomas 3 días posteriores a la inoculación, una semana después al final del periodo de análisis se pudieron observar claramente las lesiones y síntomas correspondientes a una infección severa con una calificación de 4 en la escala utilizada para la evaluación de antracnosis.

Contrastantemente en las interacciones con las cepas 2, 292 y 1280 únicamente se observaron pequeñas lesiones causadas por reacciones de hipersensibilidad de la planta para algunos hipocotilos y una respuesta nula para los hipocotilos restantes En el caso de la cepa correspondiente a la raza 256 la interacción se determinó como no compatible con una calificación de cero en la escala antes mencionada, debido a que no se observó respuesta alguna de la planta frente a la presencia del patógeno y a lo largo del periodo de evaluación no se manifestaron los síntomas característicos de la enfermedad (Figura 14), estos resultados fueron consistentes con lo esperado.





**Figura 14** Evaluación de la interacción entre el cultivar de frijol BAT 93 y las cepas patógenas de *Colletotrichum* pertenecientes a diversas razas una semana posterior a la inoculación.

A. La interacción con la cepa 256 no fue compatible dando como resultado la nula presencia de síntomas sobre la superficie de los hipocotilos inoculados, por lo que se determina a la cepa del patógeno como avirulento para la variedad de frijol BAT93. B. La interacción en el caso de la raza 1088 presenta resultados positivos en el desarrollo de la infección con una calificación de 4 que en la escala de evaluación de antracnosis se considera una interacción compatible y una cepa altamente patógena con relación al cultivar analizado. Las cepas 2, 292 y 1280 arrojaron resultados únicamente de hipersensibilidad de la planta por lo que no se consideran relevantes en la evaluación.

Durante el tiempo de evaluación de la interacción entre BAT 93 y las distintas cepas de *Colletotrichum* se realizó la observación a nivel microscópico del desarrollo del hongo con la finalidad de corroborar lo observado a nivel macroscópico. Los resultados obtenidos en el análisis microscópico fueron consistentes con los datos de la evaluación macroscópica; en el caso de la interacción con la cepa 1088, a los cinco días posteriores a la inoculación, fue posible visualizar una gran cantidad de hifas en todo el tejido de la planta así como la presencia de abundantes conidias viables, de acuerdo a lo observado al microscopio y con el tiempo de incubación previamente estandarizado, y el tejido necrotizado de la plántula. Para el caso de la interacción entre el cultivar con la cepa del hongo 256 cinco días después de la infección se observó una escasa presencia de conidias, no hubo formación de estructuras de

penetración, ni fue posible distinguir la existencia de hifas secundarias. Por lo cual se confirman los resultados para el tipo de interacción correspondiente a las cepas 1088 y 256 con la variedad de frijol BAT93 (Figura 15).

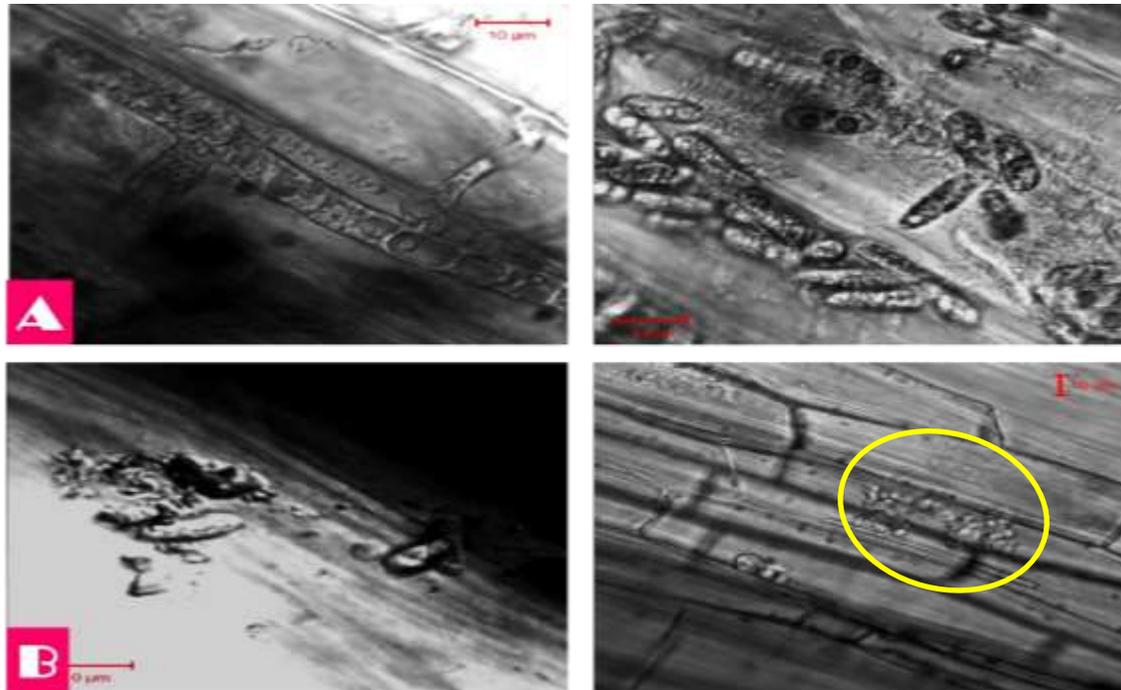
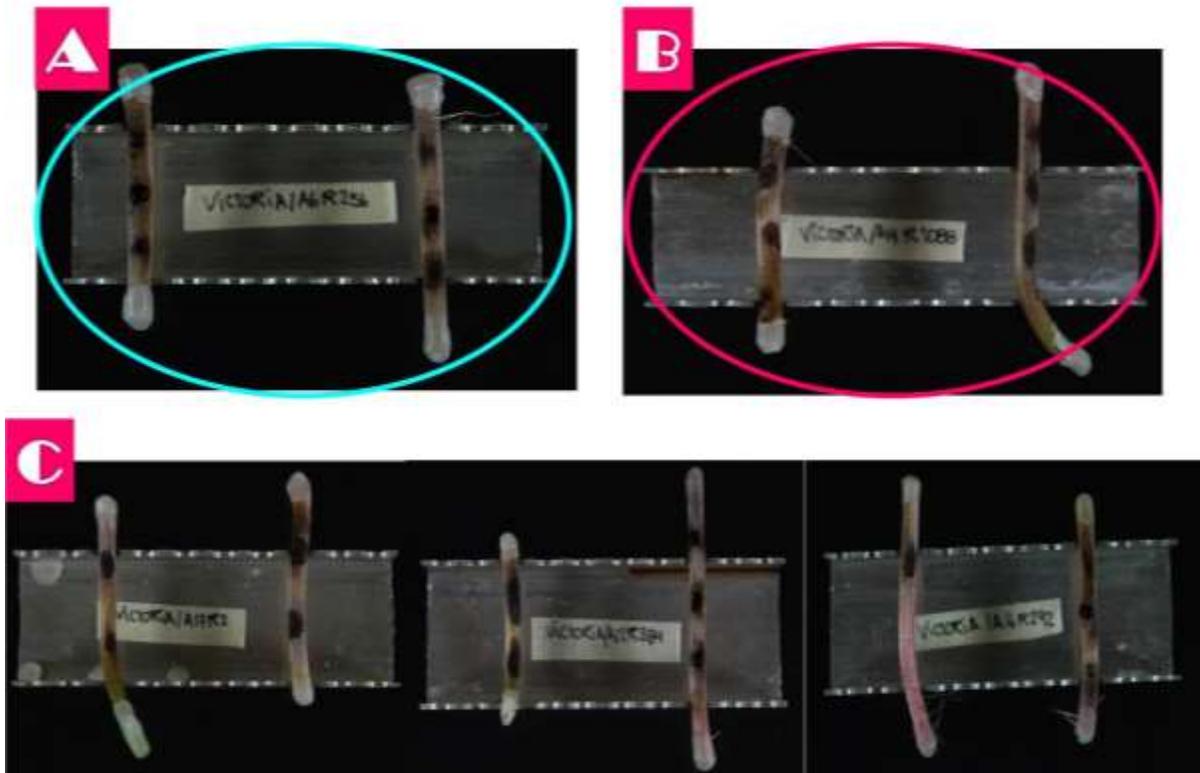


Figura 15. Análisis microscópico de la interacción entre la variedad de frijol BAT 93 y las cepas patógenas de *Colletotrichum* 256 y 1088

Cinco días posteriores a la inoculación, A. observación correspondiente a la cepa 1088, se puede distinguir la presencia de hifas secundarias, el tejido necrotizado de la plántula y una gran cantidad de conidias sobre el tejido. B. En la interacción con la cepa 256 solo se puede observar una escasa presencia de conidias, algunas de las cuales parecen estar degradándose (circulo amarillo).

Del mismo modo fue evaluada la interacción del cultivar VICTORIA con cada una de las cepas antes mencionadas, los resultados arrojados en este caso fueron interacciones compatibles para todas las cepas, siendo más consistentes en el caso de la raza 1088 con una nivel de 4 en todos los casos es decir una infección severa y un nivel de virulencia elevado para el patógeno y una calificación que osciló entre tres y cuatro para la cepa correspondiente a la raza 256 (Figura 16).



**Figura 16.** Evaluación de la interacción entre el cultivar de frijol VICTORIA y las cepas patógenas de *Colletotrichum* pertenecientes a diversas razas

**A.** Observación de los síntomas en la interacción compatible con la cepa 256, a nivel macroscópico se pueden observar las lesiones y síntomas característicos de la enfermedad. **B.** En el caso de la inoculación con la cepa 1088 la interacción fue compatible y la infección altamente severa para todos los hipocotilos analizados, de la misma manera se pueden observar las lesiones características de la antracnosis. **C.** Para el análisis con las cepas pertenecientes a las razas 2, 384 y 292 las interacciones fueron compatibles sin embargo los resultados no fueron consistentes para todos los hipocotilos inoculados.

En los resultados del análisis microscópico de la interacción con el cultivar VICTORIA mostraron de igual manera interacciones compatibles para todas las cepas evaluadas, la observación al microscopio se realizó a lo largo de los siete días posteriores a la inoculación, de la misma forma que los resultados previamente expuestos, estos corresponden a los cinco días posteriores a la inoculación, donde se observó para la cepa 1088 y 256 presencia de hifas primarias y secundarias, estructuras de penetración, una gran cantidad de conidias y presencia de tejido necrótico de la plántula. De acuerdo a los resultados obtenidos se consideran ambas cepas 256 y 1088 patógenas para la variedad de frijol VICTORIA (Figura 17).

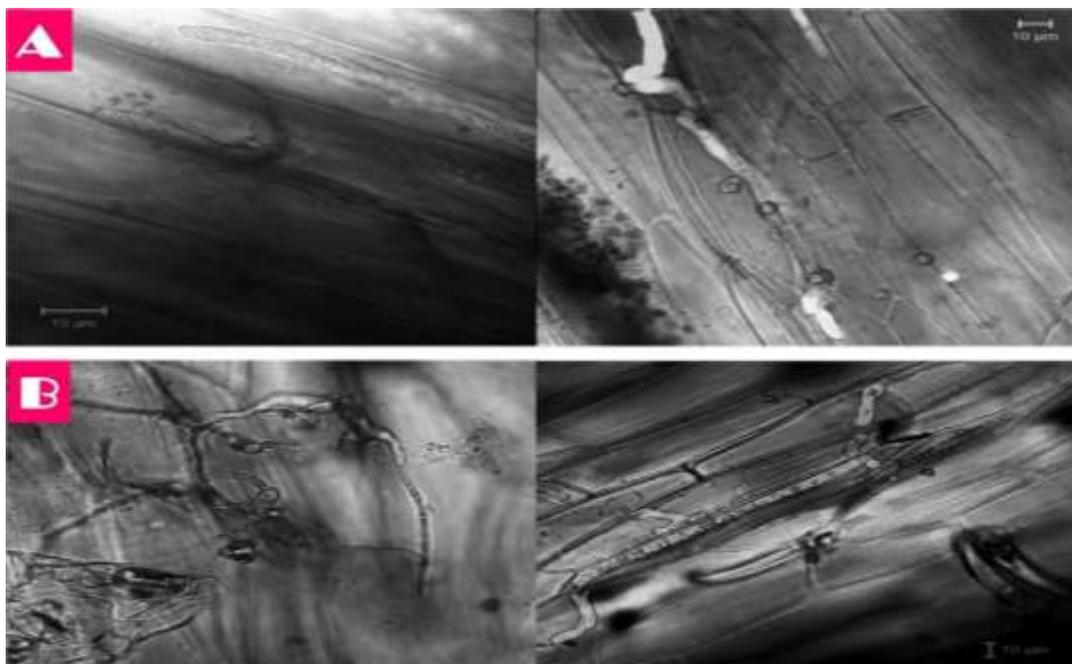


Figura 17. Observación microscópica de la interacción entre el cultivar VICTORIA y las cepas patógenas de *Colletotrichum* de las razas 256 y 1088, 5 días posteriores a la inoculación.

A. Micrografías correspondientes a la interacción con la cepa 1088. Se puede distinguir la presencia de hifas y estructuras de penetración así como el tejido necrótico de la planta. B. Imágenes de la reacción con la cepa 256 donde se puede observar el desarrollo de hifas y la presencia de necrosis del tejido vegetal.

Con base en los resultados obtenidos en las interacciones de los cultivares BAT93 y VICTORIA con las distintas cepas analizadas se determinó que las cepas correspondientes a las razas 1088 y 256 muestran la mayor consistencia en cuanto a los síntomas observados y al nivel de virulencia con respecto a los cultivares analizados, por lo cual se seleccionaron para llevar a cabo el análisis de la interacción temprana planta-patógeno a nivel de transcriptoma. La cepa 1088 es considerada patógena para el cultivar BAT93 y VICTORIA. A su vez la cepa 256 se clasificó como no patógena para BAT93 y patogénica para la variedad VICTORIA.

Para corroborar estos datos se realizó la inoculación por triplicado de hipocotilos de los cultivares BAT93 y VICTORIA con las cepas 1088 y 256 respectivamente. A los siete días se realizó la evaluación de los síntomas, los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de las interacciones en hipocotilo entre BAT 93 y VICTORIA con las cepas 1088 y 256

Siete días posteriores a la inoculación, el nivel de infección fue de 4 para todos los casos compatibles y cero para la interacción incompatible.

CULTIVAR	CEPA	REACCIÓN	NIVEL DE INFECCIÓN
BAT 93	1088	COMPATIBLE	4
VICTORIA		COMPATIBLE	4
BAT 93	256	INCOMPATIBLE	0
VICTORIA		COMPATIBLE	4

En la figura 18 se muestran los resultados de las interacciones compatibles e incompatibles para los cultivares con ambas cepas. Se puede observar la presencia de lesiones en los casos donde la interacción fue compatible y la nula presencia de síntomas en el cultivar resistente a la cepa 256.

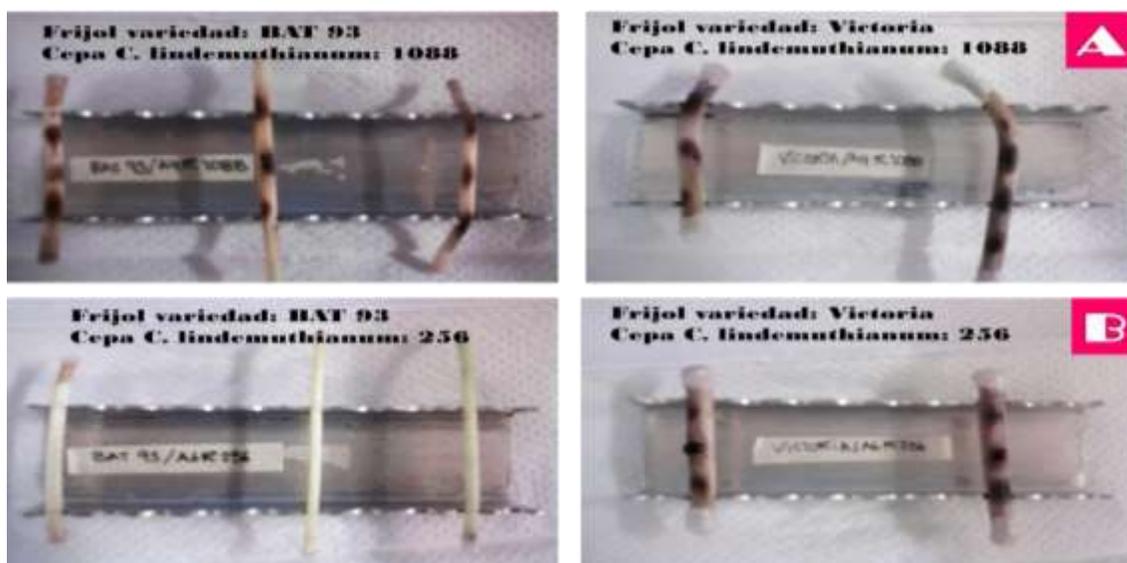


Figura 18. Observación macroscópica de hipocotilos de los cultivares de frijol BAT 93 y VICTORIA una semana posterior a la inoculación con las cepas patógenas.

A. Se puede observar los síntomas y lesiones causadas por el patógeno sobre el tejido de frijol al desarrollarse una interacción compatible con la cepa 1088. B. En la interacción entre BAT 93 y la cepa 256 esta resulta incompatible, por lo que no hay presencia de lesiones en el tejido del hipocotilo, para el caso del cultivar VICTORIA se trata de una interacción compatible con el hongo, observándose las lesiones características de la enfermedad.

Se realizó la inoculación de plántulas pertenecientes a los doce diferenciales de frijol con las cepas de *C. lindemuthianum* de las razas 448, 1088, 256, 384, 292, 2 y 1280 con la finalidad de caracterizar y dar seguimiento al desarrollo y comportamiento de las cepas previamente caracterizadas en hipocotilo y reafirmar su grado de virulencia y nivel de infección en la plántula completa.

Las plántulas se asperjaron principalmente por el envés de las hojas y sobre los tallos superiores y fueron incubadas manteniendo una humedad relativa cercana al 90% y un fotoperiodo que consistía en doce horas de luz por doce horas de oscuridad, a lo largo de una semana, al final de la cual se evaluaron los resultados de la interacción analizando los síntomas presentados y la severidad de estos.

El nivel de infección provocado por el patógeno fue evaluado basándose en la escala para la evaluación de antracnosis empleada por Garrido, 1986; basándose en la observación de la sintomatología mostrada por la plántula, cuyos resultados oscilaron de 3 a 4 para las interacciones compatibles y fueron cero para todos los casos de incompatibilidad, con algunas respuestas de hipersensibilidad mostradas por la plántula. En la Tabla 6 se muestran las interacciones entre cada cultivar y la cepa correspondiente, indicando los casos que resultaron como compatibles con un cambio de coloración de la celda y dejando sin colorear las interacciones que resultaron incompatibles.



Tabla 6. Resultados del análisis de la interacción de las cepas de *Colletotrichum lindemuthianum* razas 2, 256, 292, 384, 448, 1088 y 1280 con los cultivares de frijol pertenecientes a los doce diferenciales. Las celdas coloreadas indican las interacciones que resultaron compatibles para la variedad de frijol y la cepa correspondiente. La coloración no indica nada en específico, solo es utilizado para indicar cada cepa,

CEPA \ CULTIVAR	2	256	292	384	448	1088	1280
MICHELITE							
MDRK	Color 1						
PERRY MARROW			Color 2				
CORNELL							
WIDUSA							
KABOON			Color 2				
MEX 222					Color 3	Color 4	
PI 207262				Color 5	Color 3		
TO		Color 6	Color 2	Color 5	Color 3		Color 7
TU							
AB 136						Color 4	Color 7
G2333							

Los resultados de las interacciones con los doce diferenciales confirmaron el patotipo esperado para las cepas del patógeno, su viabilidad y su grado de virulencia. El análisis permitió realizar el seguimiento del hongo al interactuar con la plántula completa, así como estandarizar las condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad y confirmar que al ser inoculado sobre hipocotilo o sobre la plántula completa el nivel de patogenicidad del hongo no presenta variaciones importantes por lo que el grado de



reacción en la interacción con la plántula no muestra cambios significativos respecto a las evaluaciones realizadas en hipocotilo. Figura 19.



Figura 19. Plántulas de frijol de diversas variedades inoculadas con la cepa de *C. lindemuthianum* raza 292.

Una semana posterior a la inoculación, se puede observar que para el caso de Michelite la interacción fue incompatible y para los tres cultivares restantes el resultado fue compatible dando un nivel de infección de 3 para Perry Marrow y un nivel de 4 para Kaboon y To.

En la imagen anterior se muestra el caso de la interacción entre cuatro diferenciales de frijol y la cepa correspondiente a la raza 292, donde se pueden observar las interacciones compatibles e incompatibles y los niveles de infección presentados por las plántulas respecto a esta cepa.

Los resultados obtenidos en las interacciones fueron consistentes con lo esperado en base al patotipo que presentan las cepas seleccionadas y el sistema de identificación utilizando los doce diferenciales de frijol corroborando que se trata de la raza predicha.

Con base en los resultados obtenidos en la evaluación del patotipo de distintas cepas de *C. lindemuthianum*, su nivel de patogenicidad y su comportamiento en las interacciones con las doce variedades de frijol y los cultivares BAT93 y VICTORIA tanto en plántula como en hipocotilo, se decidió utilizar la cepa correspondiente a la raza

1088 en el caso de la interacción compatible con los cultivares BAT93 y VICTORIA y la cepa 256 para la interacción incompatible con BAT93 y compatible para el cultivar VICTORIA el cual como se ha mencionado fue utilizado como control para la patogenicidad de las cepas empleadas.

Se realizó la inoculación por triplicado de plántulas de dichos cultivares de una semana de crecimiento en las condiciones ya descritas Las plántulas inoculadas se mantuvieron aisladas por espacio de siete días antes de evaluar los síntomas ocasionados al desarrollar la enfermedad, utilizando la escala de Garrido, obteniendo interacciones compatibles para BAT 93 y VICTORIA con la cepa 1088 y un nivel de infección de 4 para ambas plántulas y una interacción incompatible en el caso del cultivar BAT 93 y la raza 256 con un nivel de cero y de 4 en relación a la variedad VICTORIA para la cual la cepa resulta patógena (**Tabla 7**).

**Tabla 7. Resultados de las evaluaciones de la interacción**

Realizadas en plántula entre los cultivares BAT 93 y VICTORIA con las cepas 1088 y 256 utilizando la escala de Garrido 1986.

<b>CULTIVAR</b>	<b>CEPA</b>	<b>REACCIÓN</b>	<b>NIVEL DE INFECCIÓN</b>
<b>BAT 93</b>	<b>1088</b>	<b>COMPATIBLE</b>	<b>4</b>
<b>BAT 93</b>	<b>256</b>	<b>INCOMPATIBLE</b>	<b>0</b>
<b>VICTORIA</b>	<b>1088</b>	<b>COMPATIBLE</b>	<b>4</b>
<b>VICTORIA</b>	<b>256</b>	<b>COMPATIBLE</b>	<b>4</b>

La siguiente imagen muestra las lesiones características provocadas por la antracnosis resultado de una interacción compatible entre los cultivares BAT 93 y VICTORIA y la cepa de la raza 1088 (Figura 20).



Figura 20. Plántulas de frijol siete días posteriores a la inoculación con la cepa 1088.

A. Cultivar de frijol BAT 93 mostrando los síntomas característicos de una interacción compatible con la cepa del patógeno, presentando un nivel de infección de 4. B. Se muestra a la variedad de frijol VICTORIA utilizado como control positivo de la cepa 1088 presentando las lesiones características con un nivel 4 en la interacción.

En el caso de la raza utilizada como avirulenta para la variedad BAT93 se muestra la ausencia de lesiones en la plántula, comprobando que se trata de una cepa patógena al utilizar a VICTORIA como control susceptible, en cuyo caso se pueden ver los síntomas ocasionados por el desarrollo de la enfermedad (Figura21).



Figura 21. Interacciones entre *P. vulgaris* y *C.lindemuthianum*

A. Interacción incompatible entre BAT 93 y la cepa 256, 7 días después de la inoculación con el patógeno no hay presencia de síntomas en la planta. B. Control positivo (VICTORIA) de la interacción con la raza 256, se observan las lesiones típicas de antracnosis, nivel de la infección de 4.

**b. EXPRESION DE PROTEINA GFP EN *Colletotrichum lindemuthianum* MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens***

Se realizó la transformación de ambas cepas de *Colletotrichum* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* conteniendo la proteína GFP con el objetivo poder seguir a las células del patógeno y que esto permitiese realizar el seguimiento del desarrollo del hongo en el tejido de la planta a lo largo del proceso de infección, desde los primeros cambios morfológicos en las conidias, hasta la formación de estructuras de penetración y proliferación de hifas primarias y secundarias tanto inter como intracelularmente.

Se transformaron cepas de las razas 1088 y 256 de dos semanas de crecimiento las cuales fueron crecidas bajo las condiciones indicadas para el cultivo de cepas de *C. lindemuthianum* descritas en dicho apartado utilizando las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 y GV2260 que contienen el plásmido con la proteína GFP, siguiendo el procedimiento descrito en materiales y métodos (Figura 22).



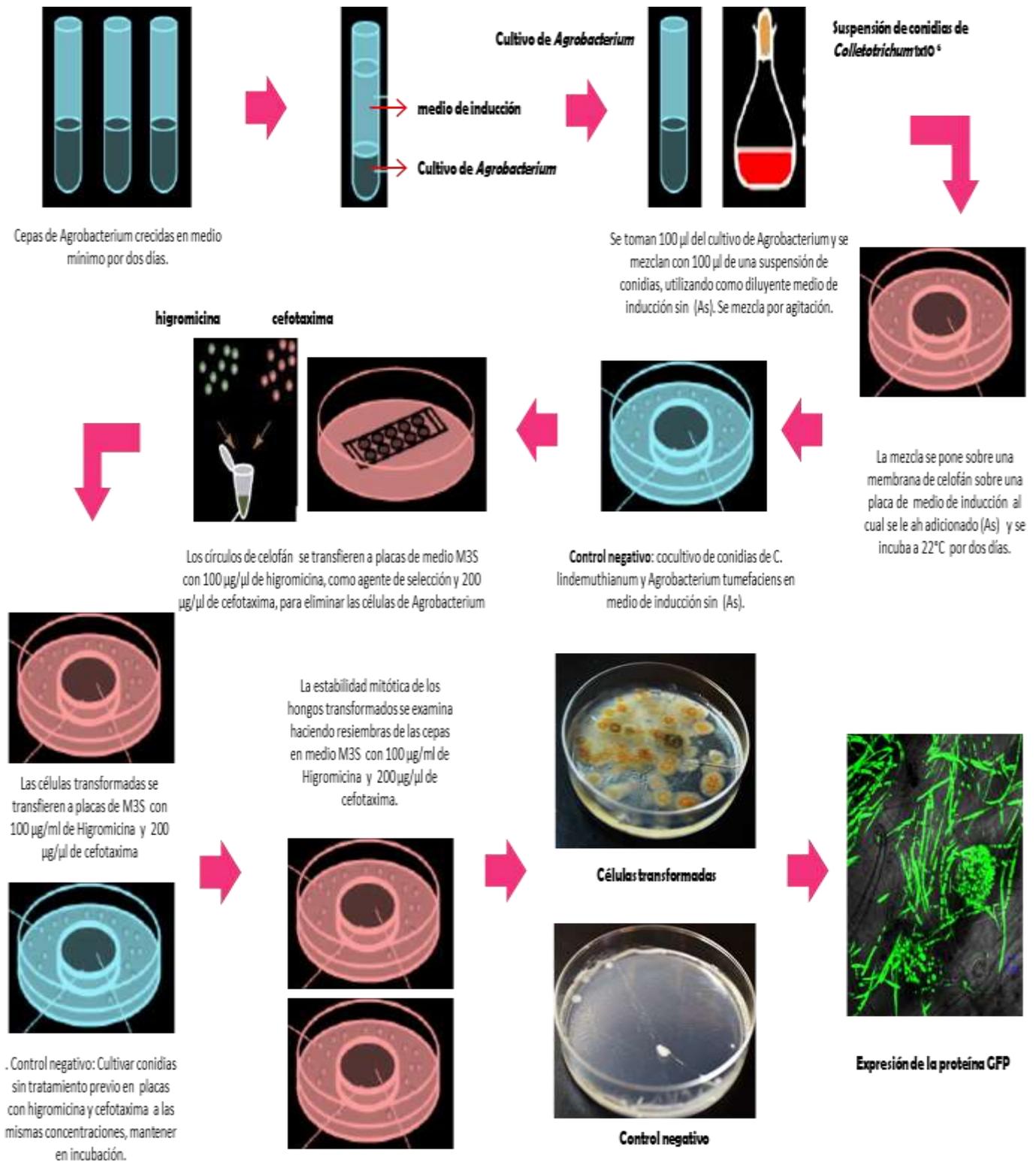


Figura 22. Diagrama del procedimiento seguido para la transformación de cepas de *Colletotrichum lindemuthianum*

Una vez concluido el procedimiento para la transformación de *Colletotrichum* y después de realizar varias resiembras en medio M3S conteniendo antibióticos (100 µg/ml de higromicina y 200 µg/µl de cefotaxima ), variando el tiempo de incubación de acuerdo al desarrollo del hongo, se obtuvo que con la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 la transformación fue exitosa para las dos cepas de *Colletotrichum* no siendo así con la cepa de *Agrobacterium* GV2260 en cuyo caso después de resembrar las células de *Colletotrichum* aparentemente transformadas en el medio conteniendo antibiótico estas murieron y en otros casos ni siquiera hubo desarrollo del hongo después de poner en contacto con las células de *Agrobacterium* (ver Figura 23).

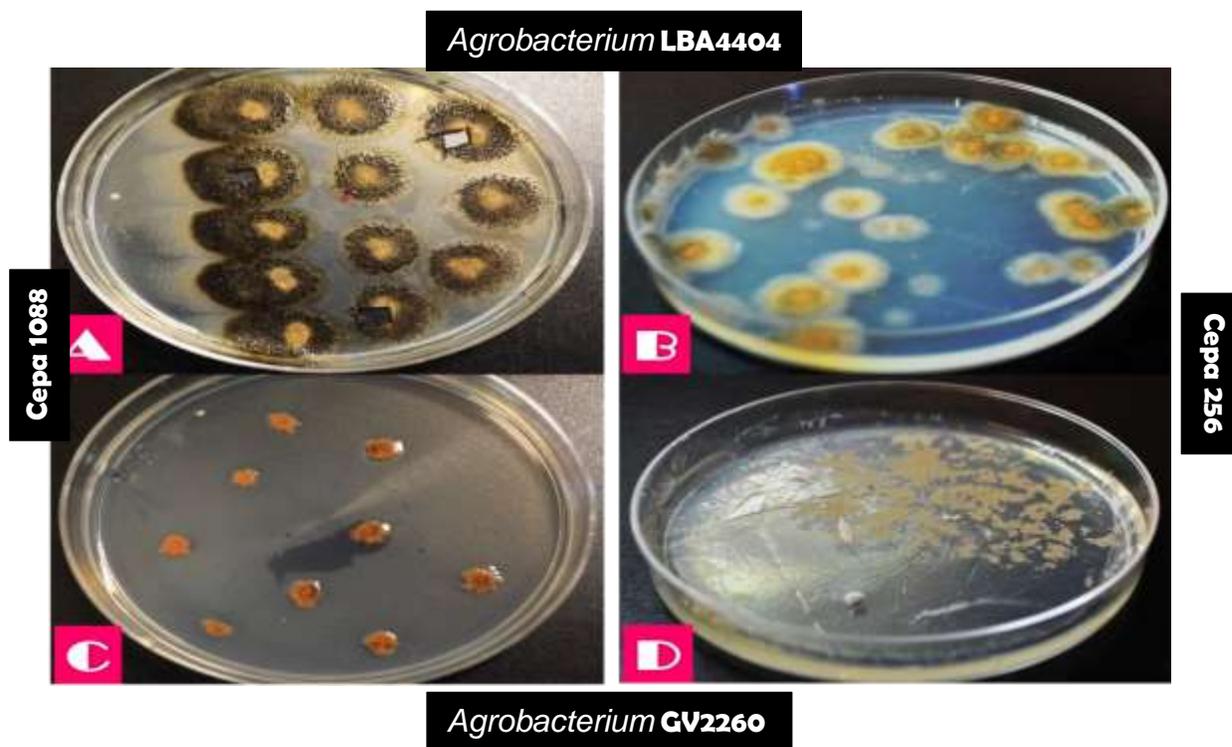


Figura 23. Transformación de cepas de *Colletotrichum* mediada por *Agrobacterium*,

Se muestran placas con resiembras de las cepas en medio M3S con 100 µg/ml de higromicina y 200 µg/µl de cefotaxima. A. Cepa 1088 transformada con la cepa LBA4404, mostrando resistencia a los antibióticos en el medio. B. Cepa 256 transformada con la cepa LBA4404 creciendo en medio con antibiótico. C. La transformación de la cepa 1088 con la cepa de *Agrobacterium* GV2260 no fue exitosa, se puede observar que las células no son resistentes al antibiótico. D. La transformación de la cepa 256 con la cepa GV2260 no fue posible, las células del hongo no mostraron desarrollo en el momento de transferirlas al medio conteniendo antibióticos.

d

Las células transformadas para ambas cepas de *Colletotrichum* se crecieron en medio M3S conteniendo los antibióticos antes mencionados por espacio de dos semanas en



oscuridad total a 22 °C, se utilizó como control negativo durante el proceso de transformación un co-cultivo de conidias de *C. lindemuthianum* y *Agrobacterium tumefaciens* en medio de inducción sin acetosiringona (Figura 24).

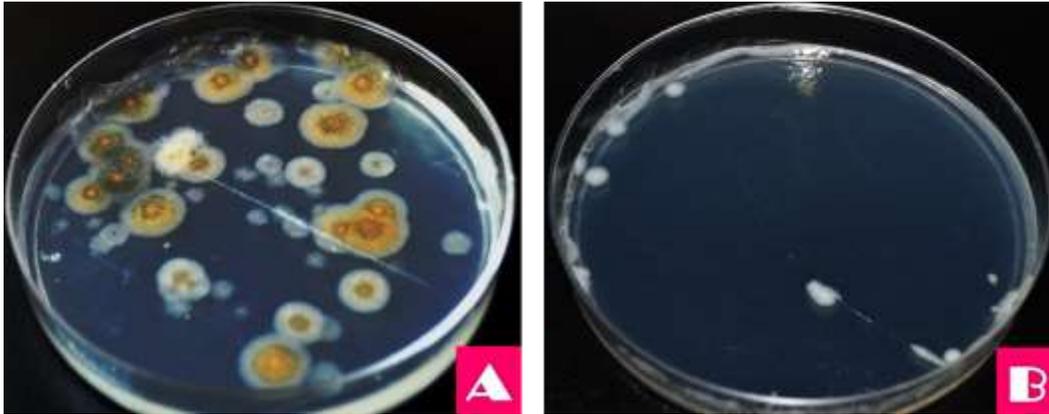


Figura 24. Células de *Colletotrichum lindemuthianum* transformadas por *Agrobacterium tumefaciens* positivo y control

A. Células de *Colletotrichum lindemuthianum* transformadas por *Agrobacterium tumefaciens*. B. Control Negativo: Co-cultivo de conidias de *C. lindemuthianum* y *Agrobacterium tumefaciens* en medio de inducción sin acetosiringona.

Después del tiempo de incubación las cepas transformadas se analizaron utilizando una lámpara de luz UV para poder observar la expresión de fluorescencia en las células del hongo, dando positivo para todas las colonias observadas. Posteriormente se realizó una observación al microscopio de ambas cepas de *C. lindemuthianum*. Los resultados se muestran en las figuras 25 y 26.

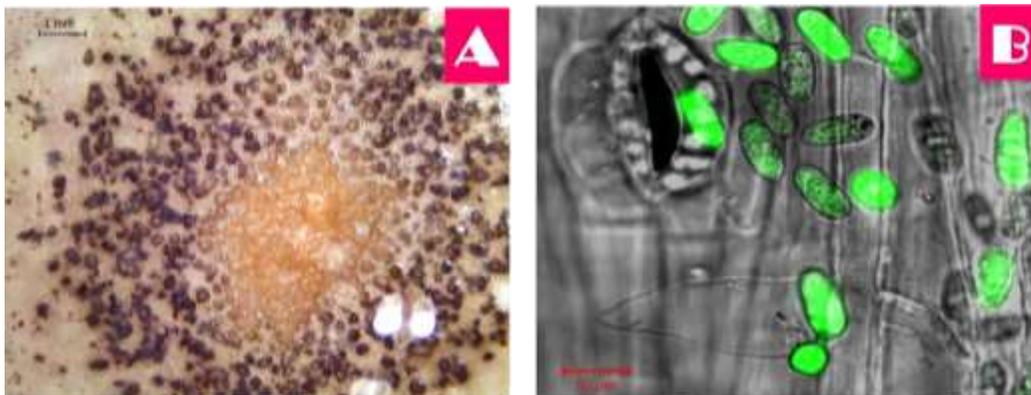


Figura 25. Cepa 1088 de *C. lindemuthianum* transformada con *Agrobacterium*.

A. Observación al estereomicroscopio de una colonia transformada. B. Observación microscópica de las células transformadas. Se puede observar la expresión de fluorescencia en las conidias del patógeno.

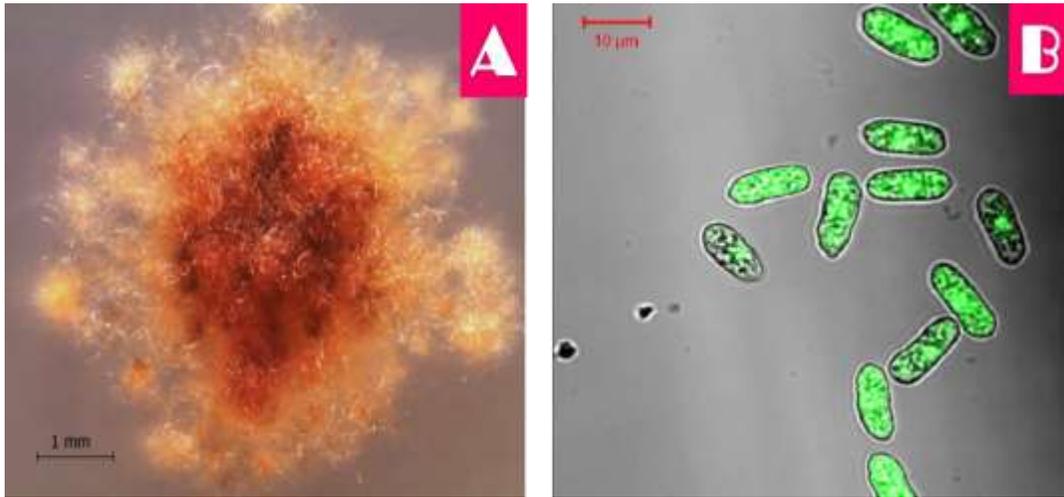


Figura 26. Cepa 256 de *C. lindemuthianum* transformada con *Agrobacterium*.

A. Observación al estereomicroscopio de una colonia transformada. B. Observación microscópica de las células transformadas, se puede visualizar la expresión de fluorescencia en las conidias del patógeno.

## c. ANÁLISIS MICROSCOPICO DEL PROCESO DE INFECCIÓN

### *Phaseolus vulgaris* - *Colletotrichum lindemuthianum*

Se realizó el seguimiento del desarrollo del hongo a través de distintas etapas en la interacción planta–patógeno a nivel microscópico. La primera observación se realizó 15 min posteriormente a la inoculación para ambas cepas patógenas (1088 y 256) tanto en el cultivar de interés BAT 93 como en el cultivar utilizado como control. En esta etapa no se observaron cambios morfológicos importantes en las conidias del hongo para ninguna de las cepas inoculadas como se muestra en la figura 27. Posteriormente se hizo una segunda observación a los 30 minutos posteriores a la inoculación pudiendo distinguirse algunas conidias con indicios de germinación las cuales se pueden identificar por un alargamiento de las células (indicadas con flechas). Estos cambios se observaron para ambas cepas en las interacciones compatibles (ver figura 27).

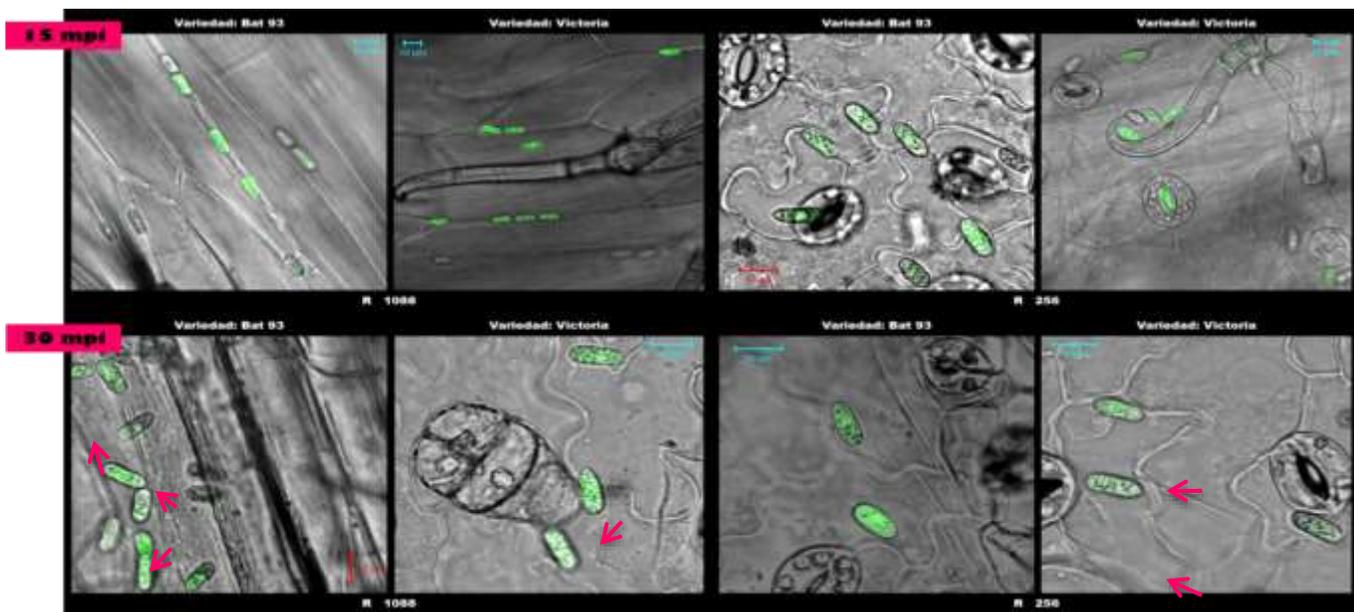


Figura 27. Observación microscópica de BAT 93 y VICTORIA a los 15 y 30 minutos posteriores a la inoculación

En la interacción entre los cultivares BAT 93 y VICTORIA y las cepas patógenas 1088 y 256. En las interacciones compatibles se observaron cambios morfológicos en las conidias del hongo 30 minutos posteriores a la inoculación (flechas magenta).

Una hora después de la inoculación una gran cantidad de conidias de ambas cepas usadas en las interacciones de la raza 1088 con ambos cultivares y para la raza 256 en el caso de la interacción con VICTORIA mostraban alargamiento, lo cual es considerado como un indicio de germinación y antecede a la formación de estructuras de penetración por parte del patógeno. En el caso de la interacción incompatible entre la cepa 256 y BAT93 no se observó ningún cambio en las células del hongo. Doshoras después de realizar la inoculación se observaron las primeras estructuras de penetración formadas por las células del hongo en las interacciones positivas., Nuevamente en el caso de la interacción incompatible no se observaron cambios en la estructura de las conidias del hongo (ver figura 28).

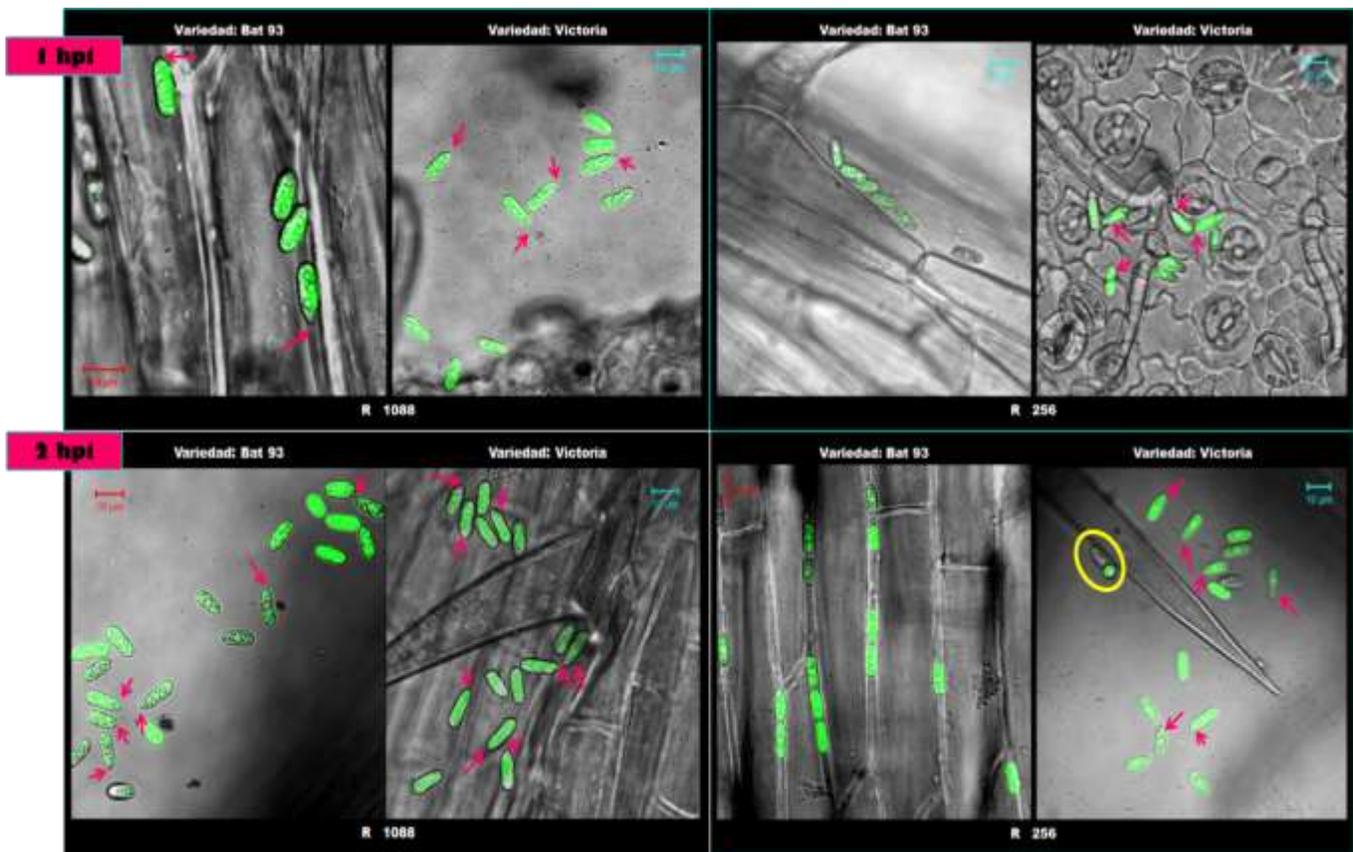


Figura 28. Observación al microscopio, interacciones entre las razas de *Colletotrichum* 256 y 1088 y los cultivares BAT 93 y VICTORIA 1, 2horas posteriores a la inoculación.

Se puede observar, señaladas con flechas, las conidias que muestran indicio de germinación y para el caso del cultivar VICTORIA con la cepa 256 (circulo amarillo) la presencia de un apresorio, estructura de penetración del hongo patógeno.

La presencia de estructuras de penetración en el caso de las interacciones entre la cepa 1088 y ambos cultivares aumento conforme transcurrió el tiempo, siendo mayor 8 h después de que las plántulas fueran inoculadas. En el caso de la cepa 256 y el cultivar VICTORIA igualmente se observó la existencia de estas estructuras aunque en menor cantidad, como se muestra en la figura 29. En la interacción con BAT 93 las conidias continuaron sin mostrar cambios en su estructura (figura 29).

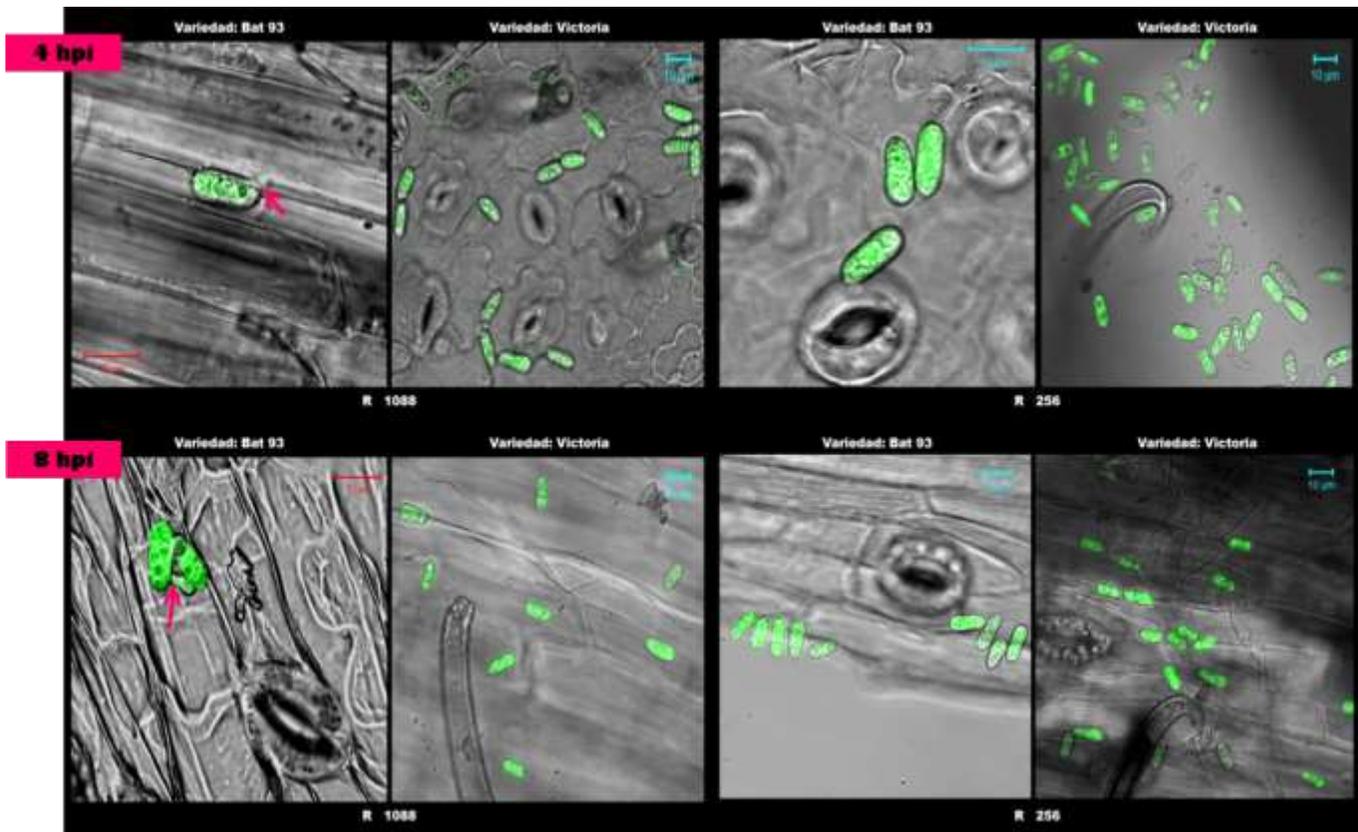


Figura 29. Observación microscópica de las interacciones entre las cepas 256 y 1088 con los cultivares BAT 93 y VICTORIA a las 4 y 8 horas posteriores a la inoculación

Se pudo observar la presencia de estructuras de penetración en el caso de las interacciones compatibles, indicando con flechas la presencia de apresorios para la interacción entre BAT 93 y la raza patógena 1088. En la interacción incompatible de este cultivar y la cepa 256 no hubo cambios estructurales importantes.

Se observó que al pasar 24 h en las interacciones compatibles prácticamente la totalidad de las conidias desarrollaron apresorios los cuales se pueden observar en la Figura 30. Contrastantemente en la interacción incompatible entre la cepa 256 y el cultivar resistente BAT93 no hubo mayores cambios en las células del hongo, no se

observó la presencia de estructuras de penetración, sino solamente la formación de tubos germinativos en unas cuantas conidias (Figura 30).

Cuando hubieron transcurrido 48 h después de la inoculación, en las interacciones compatibles, las conidias habían formado vesículas de infección, así como también hifas primarias, las cuales se pudieron observar intracelularmente. Para el caso de la variedad resistente se observaron hifas desarrollándose sobre el tejido de la planta sin penetrar en las células y la mayoría de conidias no mostró cambio alguno, continuando sin la presencia de estructuras de penetración (verfigura 31).

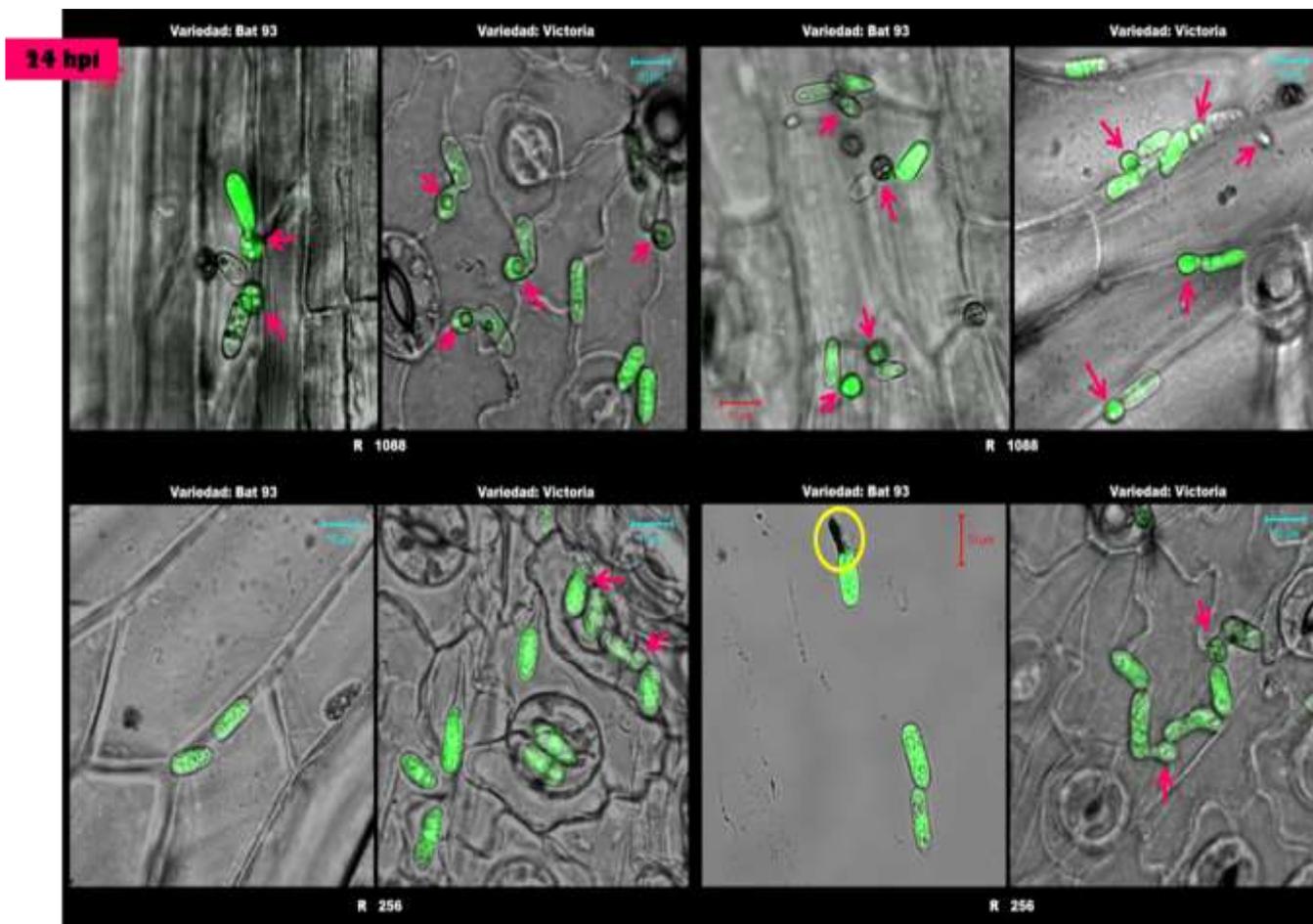


Figura 30. Observación microscópica de las interacciones entre las cepas 256 y 1088 con los cultivares BAT 93 y VICTORIA 24 horas posteriores a la inoculación.

Se puede observar la presencia de apresorios en la mayoría de las conidias en las interacciones entre las cepas 1088 y 256 con los cultivares susceptibles, indicados en la figura utilizando flechas. Para el caso de la interacción incompatible entre la cepa 256 y el cultivar VICTORIA se muestra dentro del círculo amarillo el desarrollo de un tubo germinativo en una de las conidias, para este caso no se observaron estructuras de penetración ni cambios importantes en las células del hongo.

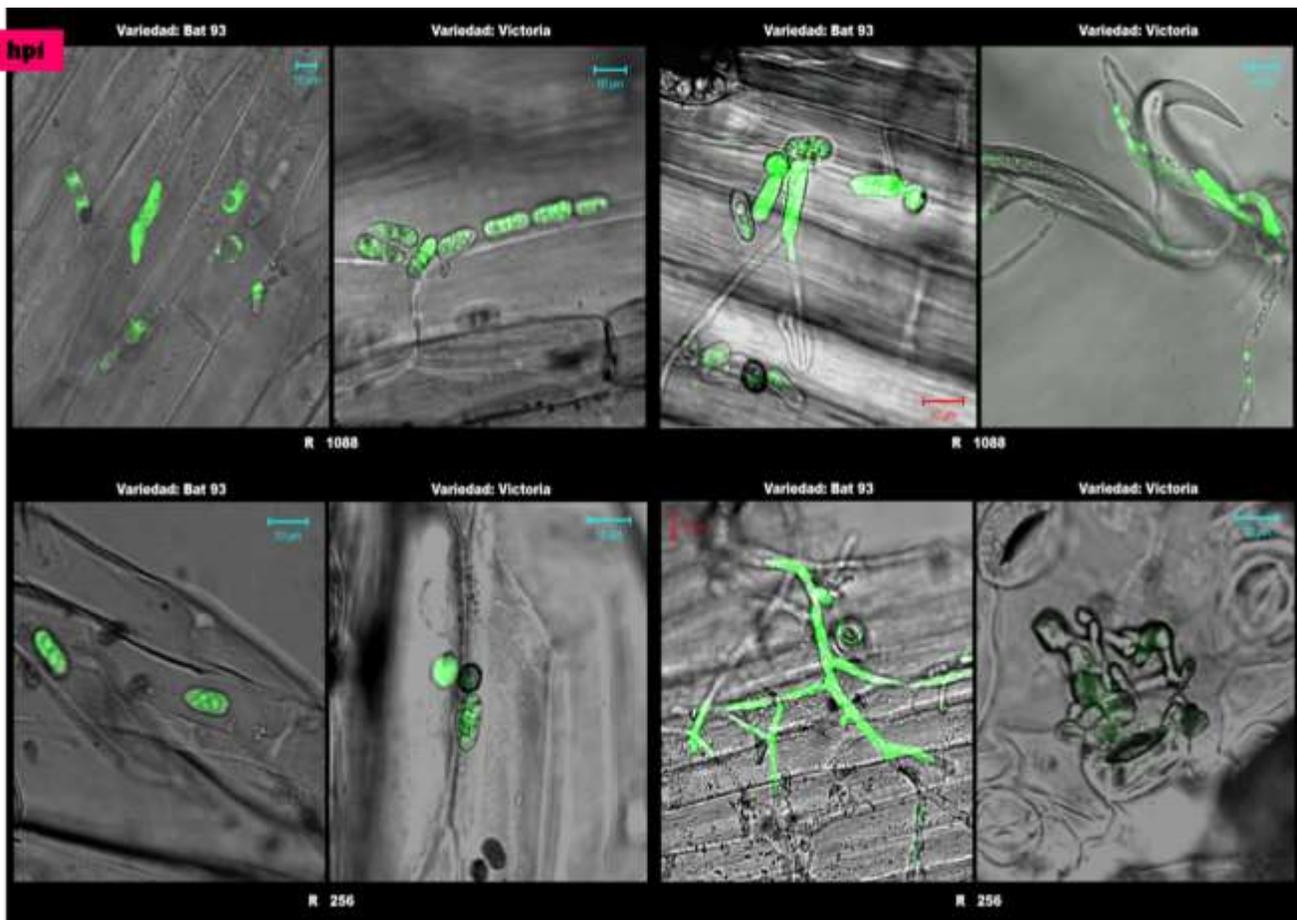


Figura 31. Observación microscópica de las interacciones entre las cepas 256 y 1088 con los cultivares BAT 93 y VICTORIA 48 h posteriores a la inoculación.

A las 48 horas posteriores a la inoculación en las interacciones compatibles se observó el desarrollo de vesículas de infección e hifas primarias penetrando a través de las células de la planta huésped. En la interacción incompatible con BAT 93 se observaron hifas creciendo sobre el tejido de la planta sin penetrar en las células aunque la mayoría de las conidias siguió sin mostrar cambios ni presencia de estructuras de penetración.

Transcurridas 72 h después de la inoculación se pudo observar en el caso de las interacciones compatibles una proliferación de hifas primarias y secundarias tanto inter como intra-celularmente, así como una abundante presencia de vesículas de infección y demás estructuras de penetración típicas del patógeno. Del mismo modo fue posible observar necrosis en el tejido infectado tanto en el caso del cultivar BAT93 como VICTORIA. En la interacción incompatible entre BAT93 y la cepa 256 se identificó la formación de unos pocos apresorios. Sin embargo no se observó la penetración en las

células vegetales por parte de estas estructuras, incluso se observaron deformaciones y pérdida de fluorescencia en múltiples conidias de esta cepa, lo que podría ser indicio de la muerte y degradación de estas células ( ver figura 32).

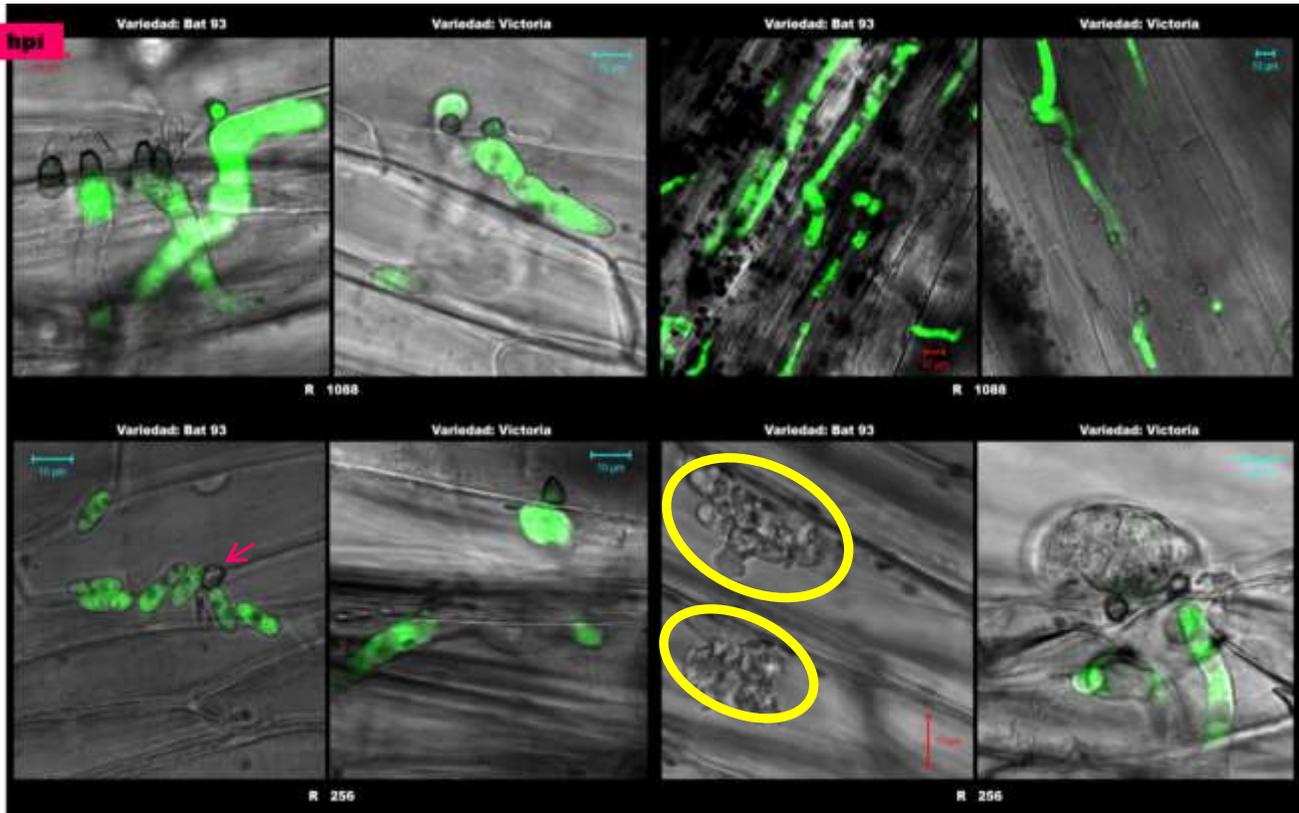


Figura 32. Observación microscópica de las interacciones a las 72horas posteriores a la inoculación.

Se puede observar para el caso de los cultivares BAT 93 y VICTORIA inoculados en la cepa 1088 la presencia de estructuras de penetración (cuadrante superior izquierdo; en el cuadrante superior derecho podemos ver una gran proliferación de hifas tanto inter como intra-celularmente así como tejido necrotizado de la planta. Para las interacciones con la cepa 256 en el caso de VICTORIA se observa igualmente la presencia de hifas y estructuras de penetración aunque en menor abundancia que en el caso de la cepa 1088. Para el cultivar BAT 93 indicado por una flecha se distingue un apesorio, y dentro de los círculos amarillos se muestran las conidias no viables con nula expresión de fluorescencia y deformación de su estructura.

En la observación microscópica de las interacciones de 96 h después de realizada la inoculación se pudo distinguir una gran cantidad de hifas invadiendo prácticamente la totalidad del tejido de la planta huésped, esto en las interacciones con los cultivares susceptibles, en cuyo caso se observó una necrosis generalizada del tejido pudiéndose distinguir incluso la formación de acérvulos (estructura reproductiva asexual) por parte

del patógeno. El desarrollo y proliferación de la cepa 256 en el cultivar VICTORIA fue de menor magnitud y agresividad que en el caso de la cepa 1088, pudiendo distinguirse una menor cantidad de hifas y un daño menos severo en la planta; aunque macroscópicamente en esta etapa de la infección ya es posible distinguir los síntomas de la enfermedad en las plántulas inoculadas de igual manera con ambas cepas (Figura 33).

En el caso específico del cultivar BAT93 y la cepa 256 se observa en la misma figura la presencia de células necróticas, lo que indica la muerte de células vegetales, con el objetivo de aprisionar el hongo patógeno dentro de la célula e impedir su diseminación por el tejido sano, estas lesiones corresponden a respuestas de hipersensibilidad de la planta

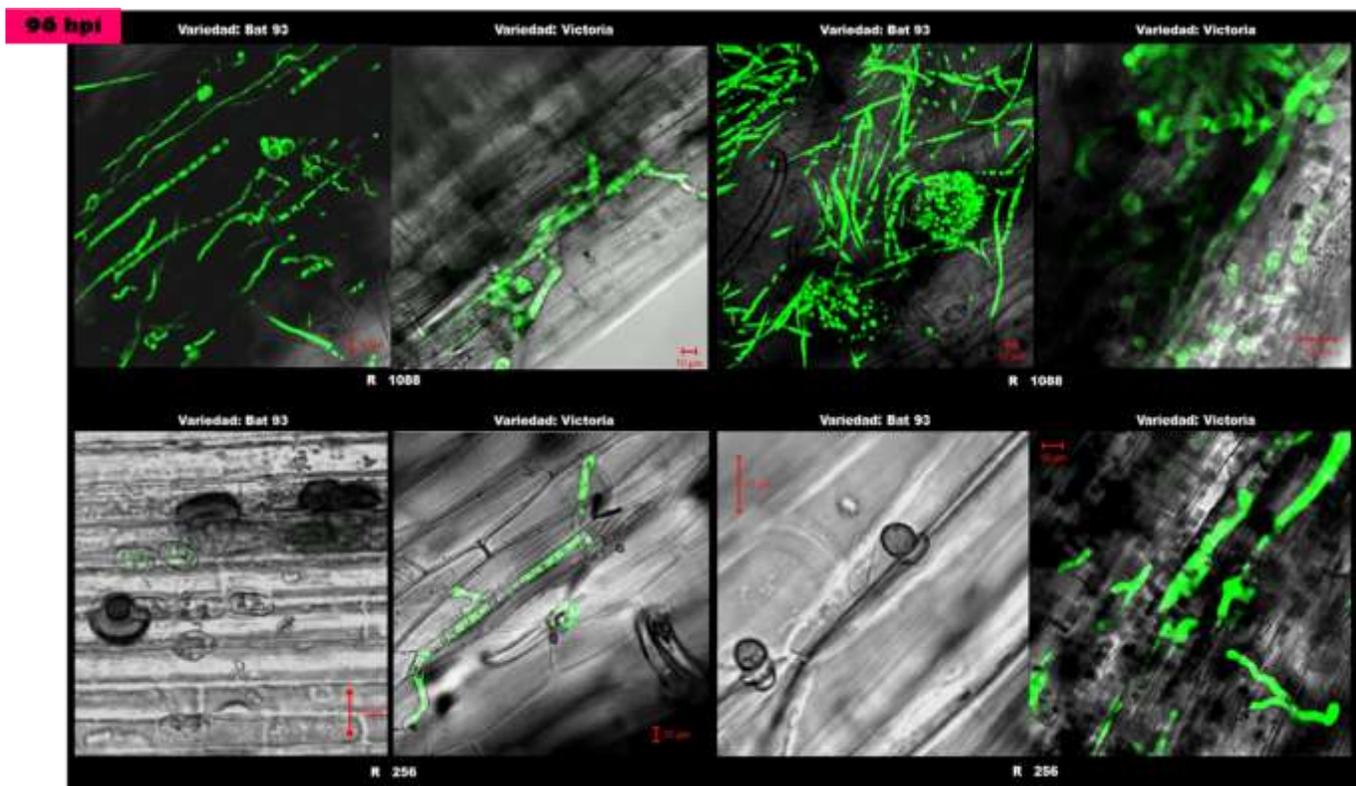


Figura 33. Seguimiento a nivel microscópico a las 96 h posteriores a la inoculación.

En las interacciones compatibles se observa el tejido de la planta necrotizado e invadido por hifas, en la interacción entre BAT 93 y la cepa 256 se observan lesiones causadas por respuestas de hipersensibilidad de la planta y la pérdida de viabilidad de las conidias y las estructuras de penetración formadas por el patógeno.

La última observación se realizó a los 7 días después de que las plántulas fueron inoculadas con el patógeno, identificándose en las interacciones compatibles una gran cantidad de hifas en prácticamente todo el tejido vegetal, estructuras de reproducción, la presencia de conidias jóvenes y la formación de estructuras de penetración por parte de estas conidias. En la imagen se pueden distinguir una gran cantidad de conidias y los apresorios desarrollados por estas, igualmente se observa el tejido de la planta en completo estado necrótico (ver figura 34).

La interacción incompatible resultante de la relación entre la cepa 256 y BAT93 muestra lesiones causadas por la respuesta de defensa de la planta como una reacción de hipersensibilidad en las células que están en contacto directo con el patógeno provocando la muerte de las células del hongo y la muerte controlada de las células de la planta expuestas al ataque.

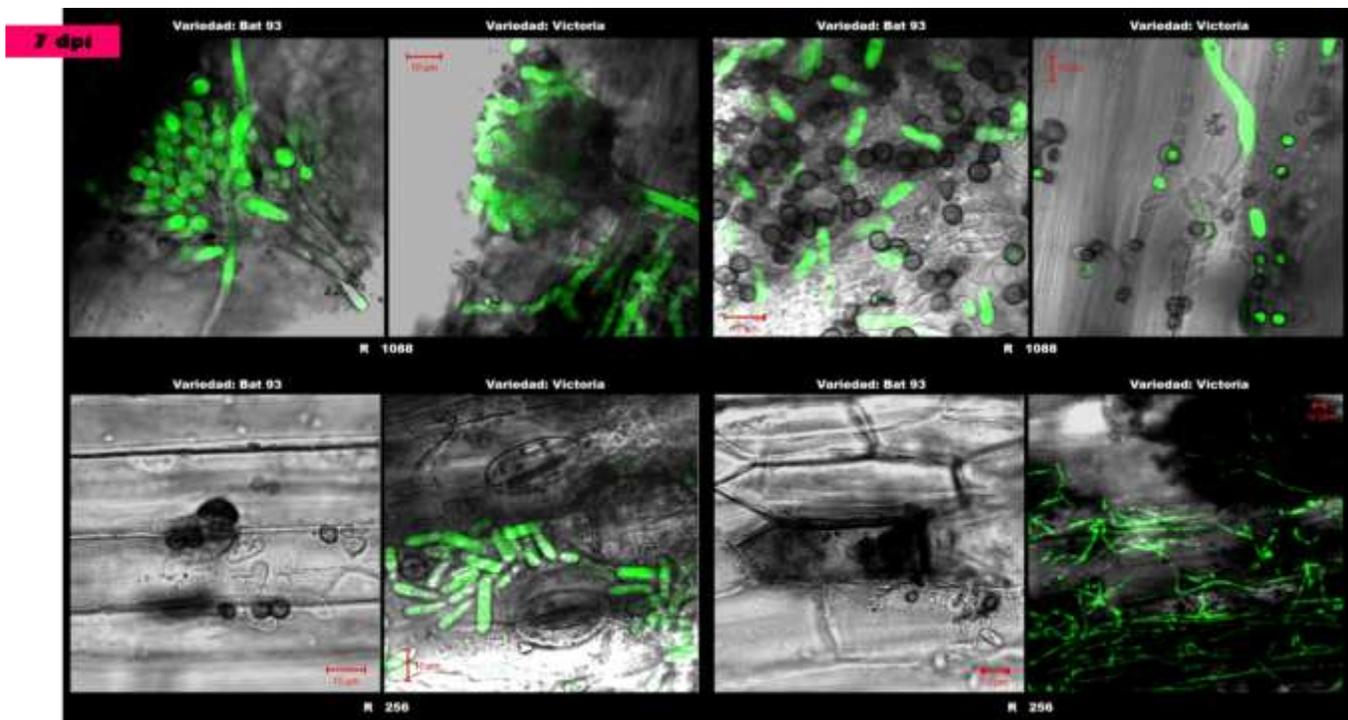


Figura 34. Análisis microscópico a los 7 días posteriores a la inoculación de las plántulas.

En el cuadrante superior izquierdo se observan en las interacciones compatibles para ambos cultivares con la cepa 1088 la formación de estructuras reproductivas (acervulos), del lado derecho para la misma cepa se observa una gran cantidad de conidias y apresorios desarrollados. En las interacciones con la cepa 256 se observa para el cultivar VICTORIA hifas y la presencia de conidias jóvenes sobre el tejido necrótico de la planta, y para el cultivar BAT 93 se identifican reacciones de hipersensibilidad ocasionada por la respuesta de defensa de la planta con la muerte localizada de las células en contacto con el patógeno.

Una vez analizada cuidadosamente la interacción *P. vulgaris*-*C. lindemuthianum* con los cultivares BAT93 y Victoria, se procedió a hacer un análisis a nivel transcriptoma en diferentes etapas durante el desarrollo de la infección, para lograr este objetivo se inocularon por triplicado plántulas de los cultivares BAT93 con las razas de *C. lindemuthianum* 1088 y 256. De igual manera se inocularon plántulas de la variedad VICTORIA como control susceptible de ambas cepas patógenas y se asperjaron con agua estéril (sin presencia del patógeno) plántulas de ambos cultivares como control negativo de la infección, todas las plántulas se mantuvieron en iguales condiciones de aislamiento en incubación durante distintos intervalos de tiempo, esto se muestra en la figura 35.



Figura 35. Inoculación de las plántulas del cultivar BAT 93 con las cepas patógenas 256 y 1088.

A. Se inocularon por triplicado plántulas del cultivar BAT 93 con ambas cepas de *C lindemuthianum*. B . Inoculación por aspersión de la suspensión de conidias de la cepa 1088 y 256 respectivamente; asperjadas en las zonas aéreas de la plántula y en el envés de las hojas. C. Aspersión de las plántulas con agua estéril (control negativo de la interacción). D. Una vez que las plantas han sido inoculadas se mantienen en incubación en un sistema cerrado

Para comparar los cambios en la transcripción en las interacciones compatibles y las incompatibles entre *P. vulgaris* y *C. lindemuthianum* en distintas etapas del desarrollo de la enfermedad se tomaron muestras de las plántulas de BAT93 infectadas

a partir de los 15 minutos posteriores a la inoculación, partiendo de la hipótesis de que la etapa temprana en la interacción es decisiva y que es en esta donde se dan los principales cambios a nivel transcriptoma y que estos serán decisivos en la resistencia o susceptibilidad de la planta al patógeno, lo anterior basándonos en datos bibliográficos así como en los resultados del análisis microscópico donde los primeros cambios son observados poco tiempo después de haber realizado la inoculación. En la siguiente tabla se muestran las condiciones y los intervalos de tiempo en que fue realizada la toma de muestras para la posterior extracción de RNA.

**Tabla 8. Muestreo de Plantulas de BAT 93 inoculadas.**

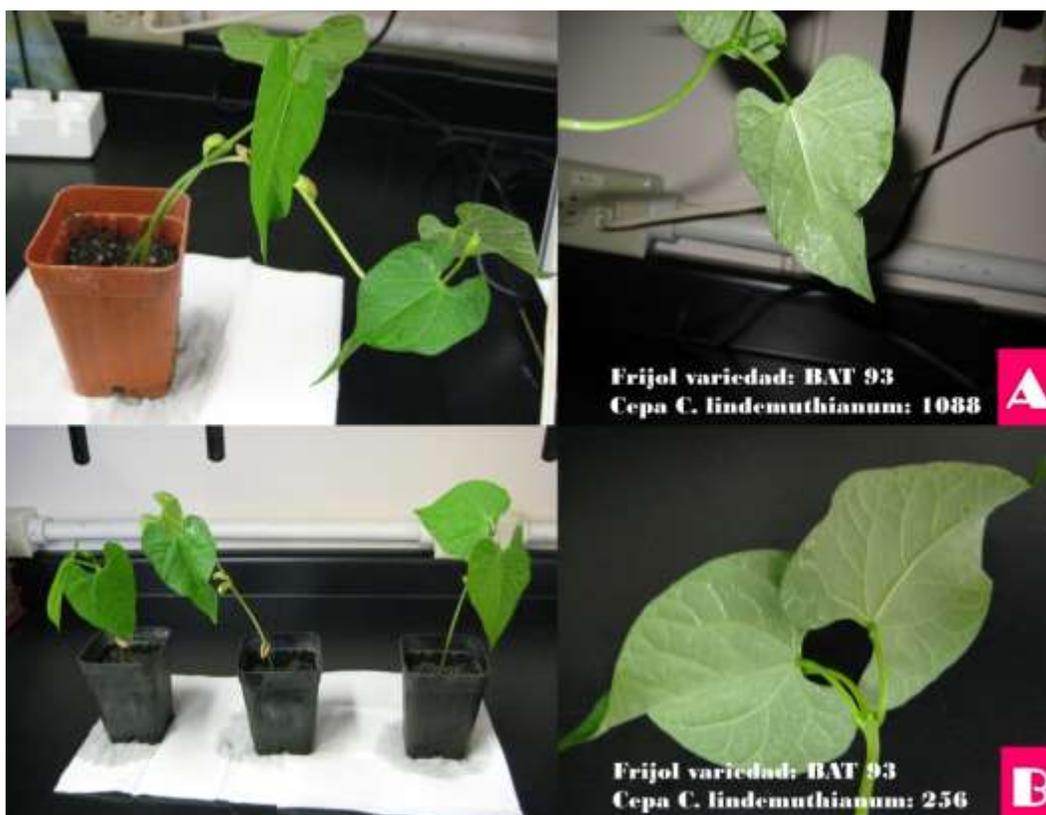
Se consideraron 10 intervalos de tiempo para la toma de muestras de las plántulas de BAT 93 inoculadas con la cepa 256, 1088 o con agua estéril, las cuales se consideraron como 3 condiciones distintas: 1- Interacción no compatible, 2- Interacción compatible y 3- Control negativo. Se recolectaron muestras a los 15, 30 min, 1, 2, 4,8, 24, 48, 72 y 96 h posteriores a la inoculación, FACTOR BIOTICO 9 (ANTRACNOSIS).

<b>INTERACCIÓN NO COMPATIBLE CEPA 256</b>	<b>INTERACCIÓN COMPATIBLE CEPA 1088</b>	<b>CONTROL NEGATIVO SIN INOCULAR</b>
<b>B9_1 – 15 mpi</b>	<b>B9_2 – 15 mpi</b>	<b>B9_3 – 15 mpi</b>
<b>B9_1 – 30 mpi</b>	<b>B9_2 – 30 mpi</b>	<b>B9_3 – 30 mpi</b>
<b>B9_1 – 01 hpi</b>	<b>B9_2 – 01 hpi</b>	<b>B9_3 – 01 hpi</b>
<b>B9_1 – 02 hpi</b>	<b>B9_2 – 02 hpi</b>	<b>B9_3 – 02 hpi</b>
<b>B9_1 – 04 hpi</b>	<b>B9_2 – 04 hpi</b>	<b>B9_3 – 04 hpi</b>
<b>B9_1 – 08 hpi</b>	<b>B9_2 – 08 hpi</b>	<b>B9_3 – 08 hpi</b>
<b>B9_1 – 24 hpi</b>	<b>B9_2 – 24 hpi</b>	<b>B9_3 – 24 hpi</b>
<b>B9_1 – 48 hpi</b>	<b>B9_2 – 48 hpi</b>	<b>B9_3 – 48 hpi</b>
<b>B9_1 – 72 hpi</b>	<b>B9_2 – 72 hpi</b>	<b>B9_3 – 72 hpi</b>
<b>B9_1 – 96 hpi</b>	<b>B9_2 – 96 hpi</b>	<b>B9_3 – 96 hpi</b>

La toma de muestras se realizó recolectando parte del tejido aéreo de la planta (tejido infectado) hojas y tallos con ayuda de un bisturí estéril. Posteriormente el tejido se congelo en nitrógeno líquido y se mantuvo en congelación a -70°C para la posterior extracción de mRNA y secuenciación de las muestras.



Se realizaron observaciones periódicas de las plántulas infectadas tanto a nivel macroscópico como a nivel microscópico. A continuación se muestran los resultados de las observaciones macroscópicas realizadas 48 h posteriores a la inoculación de las interacciones entre BAT 93 y las cepas 1088 y 256., Se omiten las imágenes previas debido a que macroscópicamente no es posible observar cambios en la estructura de la planta hasta después de transcurridas las primeras 48 horas de la interacción (Figura 36).

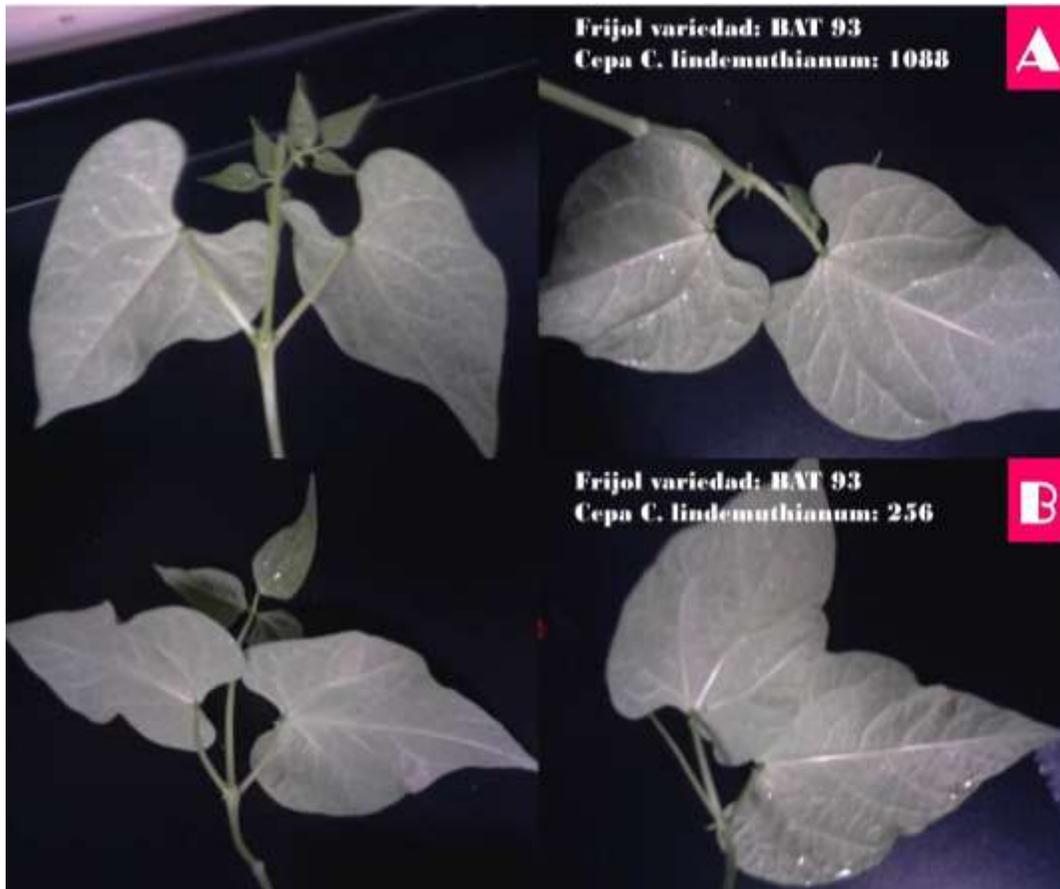


**Figura 36** Observación de los síntomas mostrados en la plántula de la variedad BAT 93, 48 horas posteriores a la inoculación.

**A.** Interacción compatible con la cepa 1088, transcurridas 48 horas después de inoculada con el patógeno. Aún no se observan signos típicos de la enfermedad en el tejido de la planta. **B.** La interacción no compatible con la cepa 256 no muestra síntomas de infección.

La observación de las plántulas 72 h posteriores a la inoculación mostró algunos síntomas visibles en el caso de la interacción compatible con la cepa 1088. Estas

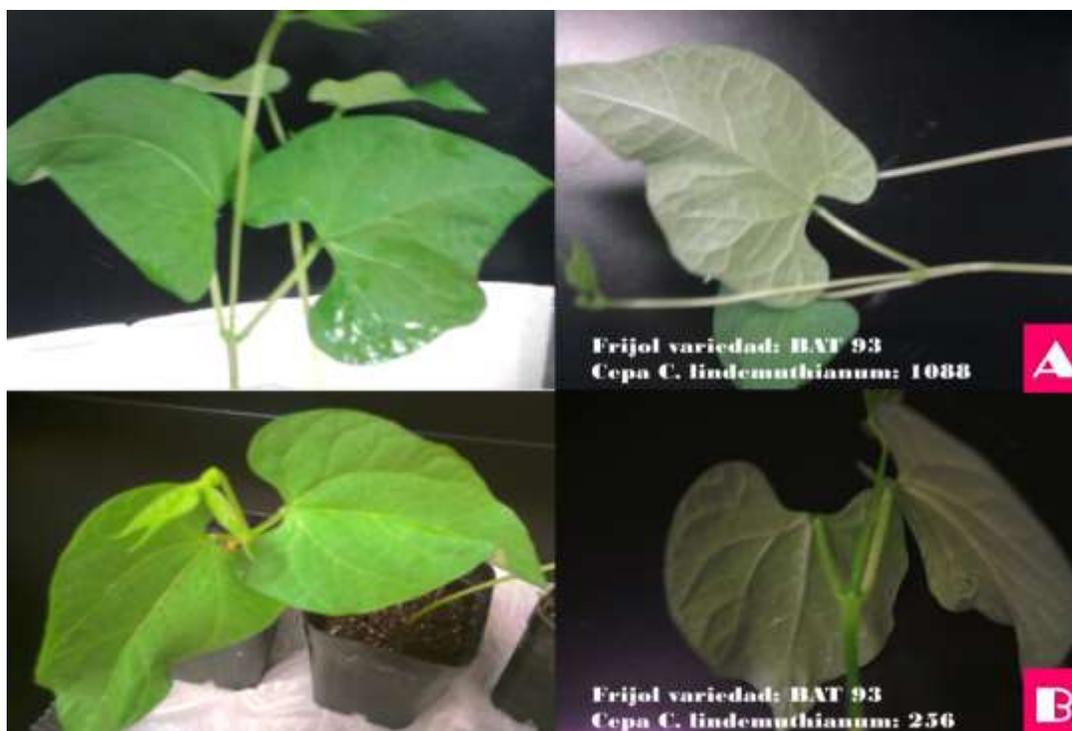
fueron pequeñas lesiones en las nervaduras de las hojas infectadas; en el caso de la interacción incompatible continuó sin presentar signos de la enfermedad. (Figura 37).



**Figura 37** Observación macroscópica de las interacciones entre BAT 93 y las cepas 1088 y 256, a las 72 horas posteriores a la inoculación.

**A.** En la interacción con la cepa 1088 se observan pequeñas lesiones sobre las nervaduras de las hojas inoculadas. **B.** La plántula inoculada con la cepa 256 no muestra cambios visibles ni presencia de lesiones.

Los síntomas observados a las 96 h posteriores a la inoculación continuaron siendo poco notorios sin presencia de lesiones necróticas o chancros típicos de la enfermedad. Sin embargo, fueron claramente visibles las diferencias entre ambas interacciones. La siguiente figura 38 muestra las diferencias en cada caso (Figura 38).



**Figura 38** Observación 96 h posteriores a la inoculación de BAT 93.

A. En la interacción con la cepa 1088 se presentan lesiones minúsculas en las nervaduras de las hojas corroborando el desarrollo de la infección por *C. lindemuthianum*. B. En la interacción no compatible no se observa ningún síntoma de enfermedad lo que corrobora la resistencia de la planta al patógeno.

La última toma de muestras para el análisis del transcriptoma se realizó a las 96 h posteriores a la inoculación considerando este periodo como el tiempo máximo en el cual se podrían presentar cambios a nivel transcriptómico. En esta etapa de la interacción la enfermedad ya se ha desarrollado y tanto la resistencia como la susceptibilidad de la planta frente al patógeno se ha manifestado con las correspondientes señales de respuesta de ambos organismos. Aunque cabe señalar que a nivel macroscópico los síntomas de la infección no son severos, el desarrollo de la enfermedad se corroboró por los análisis microscópicos realizados de manera conjunta a la toma de muestras. Para las plántulas asperjadas con agua, estas no mostraron alteraciones ni cambios visibles en su estructura.

Con el fin de confirmar el desarrollo de la infección en el cultivar BAT93 en su interacción con la cepa 1088 (Figura 39) y la resistencia frente a la cepa 256 (Figura

40) que da como resultado una interacción incompatible, se realizó el seguimiento de ambas reacciones una semana después de la inoculación. A continuación se muestran en las figuras 39 y 40 los resultados tanto para el cultivar BAT 93, como para la variedad VICTORIA usada como control susceptible a las dos cepas utilizadas.



**Figura 39** Interacción compatible entre los cultivares BAT 93 Y VICTORIA con la cepa 1088, una semana posterior a la inoculación.

**A.** En la interacción con BAT 93, se observan las lesiones típicas de la enfermedad tanto en el tallo como en el envés de las hojas, siendo el grado de la infección severo. **B.** En el caso del cultivar VICTORIA que igualmente se trata de una interacción compatible, se puede observar la presencia de lesiones características del desarrollo de la enfermedad.

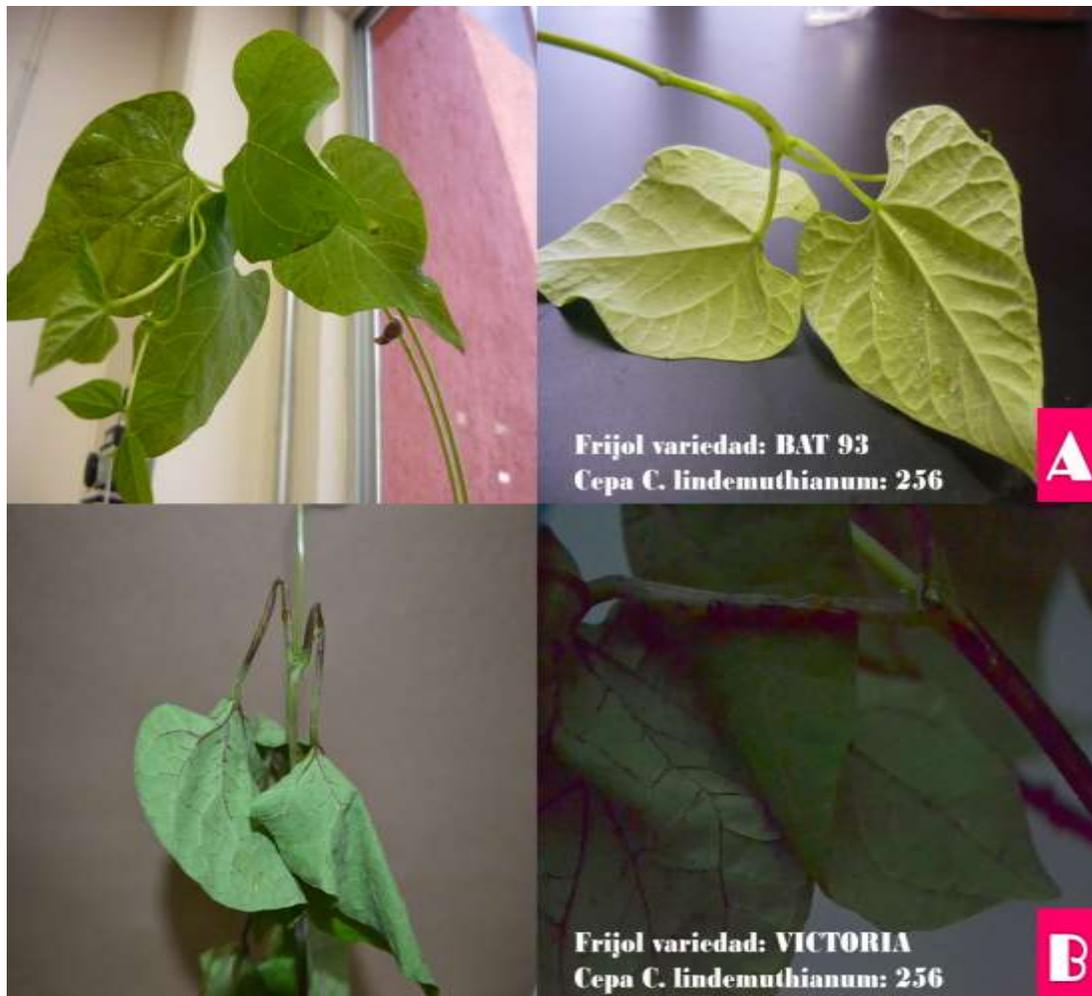


Figura 40 Interacción de los cultivares BAT 93 y VICTORIA con la cepa 256, una semana posterior a la inoculación.

A. La interacción entre BAT 93 y la cepa 256 no presenta ningún tipo de síntoma característico de antracnosis, por lo que se considera una reacción incompatible. B. En la interacción del cultivar VICTORIA con la cepa 256 el resultado es una reacción compatible, observándose los síntomas producto de una infección severa.

Se realizó la extracción de RNA total de las muestras obtenidas a los diferentes periodos de tiempo analizados. Se consideraron tres condiciones distintas para la toma de muestras: 1 - Interacción no compatible con la cepa 256, 2 - Interacción compatible utilizando la cepa 1088 y 3 - Control negativo usando agua estéril como inóculo, procesando finalmente 10 muestras por cada condición analizada. Las muestras correspondientes a tres plántulas inoculadas se mantuvieron en incubación bajo las condiciones indicadas en protocolos.

Se utilizaron tres métodos distintos para la obtención de RNA de las muestras procesadas, siguiendo en cada caso la metodología indicada por el fabricante, los métodos utilizados fueron los que se listan a continuación:

**TRIZOL® Reagent** (Cat: No. 15596-018, Invitrogen, California, USA).

**ZR RNA Micro Prep®** (Cat: No. R1060, Zymo Research, USA).

**CTR (Nucleo Spin® RNA Plant)** (Cat: No. 740949.10, Macherey- Nagel, Germany).

Finalmente se comparó rendimiento, calidad y pureza del RNA extraído con cada uno de los métodos utilizados, con la finalidad de seleccionar el método que permitiese obtener los mejores resultados. Estos resultados se muestran en la tabla 9.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación por espectrofotometría de la cantidad y calidad del RNA extraído con cada uno de los métodos anteriores se eligió el método CTR (NucleoSpin® RNA Plant) por mostrar una mayor pureza del RNA obtenido indicado por la relación 260/280. Este método se empleó en todas las extracciones realizadas para el análisis del transcriptoma en la interacción *P vulgaris* - *C lindemuthianum*.



Tabla 9 Cuantificación de RNA extraído por tres distintos métodos, usando el espectrofotómetro modelo ND-1000 (NanoDrop®, USA).

En color verde se indican los mejores valores para la relación 260/280 obtenidos utilizando el método CTR (NucleoSpin ®

METODO	ID. MUESTRA	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
TRIZOL	B9_1 – 96 hpi	1565.82	39.145	21.3	1.84	2.28
TRIZOL	B9_2 – 96 hpi	1989.13	49.728	28.063	1.77	2.34
TRIZOL	B9_3 – 96 hpi	2124.72	53.118	29.922	1.78	2.36
ZR RNA	B9_1 – 96 hpi	1942.29	48.557	22.792	2.13	2.23
ZR RNA	B9_2 – 96 hpi	1783.32	44.583	20.822	2.14	2.05
ZR RNA	B9_3 – 96 hpi	4609.34	115.234	103.521	1.11	1.28
CTR	B9_1 – 96 hpi	461.94	11.548	5.427	2.13	2.32
CTR	B9_2 – 96 hpi	659.02	16.476	7.492	2.2	2.21
CTR	B9_3 – 96 hpi	580.31	14.508	6.746	2.15	2.2

RNA Plant)

El RNA extraído con los tres distintos métodos se analizó en un gel de agarosa para verificar su calidad. Los resultados confirman los datos obtenidos en la cuantificación por espectrofotometría corroborando la elección del método CTR (NucleoSpin ® RNA Plant) con el que se obtuvieron mejores resultados (Figura 41). Adicionalmente, la calidad del RNA obtenido fue verificada mediante una prueba de síntesis de cDNA.

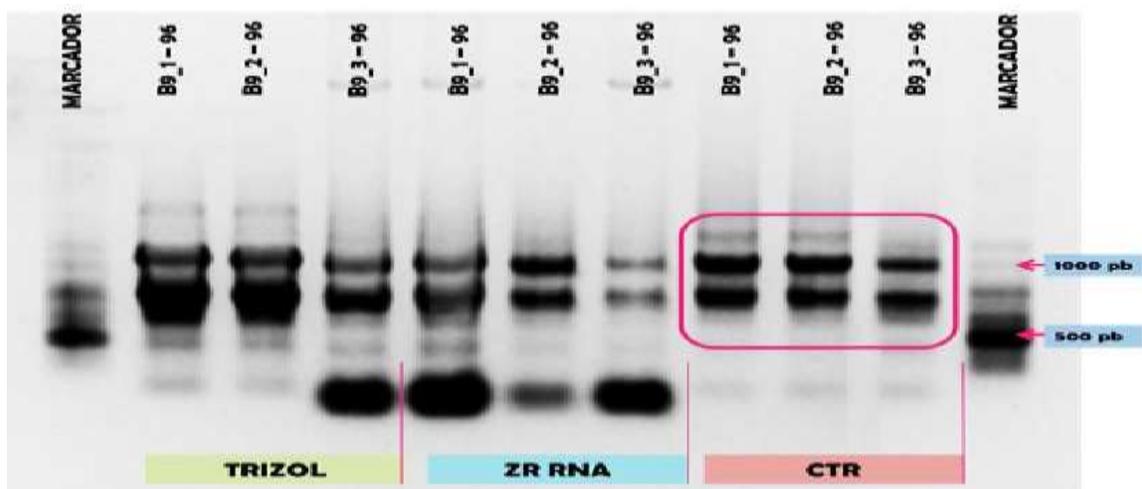


Figura 41 Gel de agarosa de las muestras de RNA

Extraídas con tres distintos métodos de extracción los cuales se indican en la imagen, las muestras corresponden a las 3 condiciones de muestreo 96 h posteriores a la inoculación.

Las muestras fueron secuenciadas en el sistema HiSeq2000 de Illumina en un formato de corrida: 1x100, se prepararon 15 bibliotecas truSeq a partir del RNA extraído a continuación se muestran las tablas con los resultados de la secuenciación y el número de lecturas obtenidas. Se secuenciaron en total 15 muestras, 5 por cada condición, las muestras secuenciadas fueron las correspondientes a los tiempos tempranos de la interacción que comprenden desde los primeros 15 minutos hasta las dos horas posteriores a la inoculación; las muestras pertenecientes a los tiempos tardíos de la interacción, que comprenden de las 4 hasta las 96 horas después de que las plántulas fueron inoculadas, se combinaron en una sola muestra para cada condición analizada las cuales se denominaron como B9-1-MIX, B9-2-MIX y B9-3-MIX correspondientemente.

Los datos obtenidos en la secuenciación, consistieron en un total de 21,325 genes de *Phaseolus vulgaris* en 15 bibliotecas producto de un experimento factorial sin replicas Tabla 12. Los factores implicados fueron el tiempo de la exposición al hongo (5 niveles: 15 , 30, 60 , 120 minutos , más una mezcla equimolar de RNA obtenida de los periodos de tiempo comprendidos de 4, 8 , 24, 48 , 72 y 96 horas) y el tipo de interacción con la cepa del hongo en los niveles de B91 (no patógena ) , B92 ( patógena ) y B93 (control; sólo agua destilada ).

El número total de EST por biblioteca varió desde un mínimo de 6.271.000 hasta un máximo de 21.280.000 con una media de 15.050.000, una mediana de 15.470.000 y una desviación de 4.542.141. El total de ESTs para las 15 bibliotecas fue de 225.714.814.



Tabla 10 Resultados de la corrida de secuenciación, formato de corrida: 1x100

CONDICIÓN DE MUESTREO	ID MUESTRA	ID	READS	TOTAL DE READS	Gb
INTERACCIÓN NO COMPATIBLE CEPA 256	B9-1-15M	ah1ta3ss57 .05	33192887	230,040,125	23
	B9-1-30M	ah1ta3ss58 .06	17997712		
	B9-1-01H	ah1ta3ss59 .12	23569435		
	B9-1-02H	ah1ta3ss60 .19	31022890		
	B9-1-MIX	ah1ta3ss69 .19	68634904		
INTERACCIÓN COMPATIBLE CEPA 1088	B9-2-15M	ah1ta3ss61 .02	30262460		
	B9-2-30M	ah1ta3ss62 .04	32000000		
	B9-2-01H	ah1ta3ss63 .07	28907063		
	B9-2-02H	ah1ta3ss64 .16	33087678		
	B9-2-MIX	ah1ta3ss70 .04	34510194		
CONTROL NEGATIVO SIN INOCULAR	B9-3-15M	ah1ta3ss65 .05	40019130	195,579,782	19.56
	B9-3-30M	ah1ta3ss66 .06	32603263		
	B9-3-01H	ah1ta3ss67 .12	28756807		
	B9-3-02H	ah1ta3ss68 .19	43056852		
	B9-3-MIX	ah1ta3ss71 .07	15635587		

#### d. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN LAS ETAPAS TEMPRANAS DE LA INTERACCIÓN PLANTA – PATOGENO

Una vez obtenidas las secuencias realizado un control de calidad de las mismas en cuanto a dos parámetros: calidad de las bases asignadas y longitud de las secuencias. Para ello se ha utilizado el software FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Posteriormente, los datos fueron procesados mediante el programa Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>) se eliminó por un lado, los adaptadores propios de la tecnología Illumina que se usan en el proceso de

secuenciación y por otro aquellas secuencias que no alcanzan los mínimos establecidos respecto a la calidad, siendo 20 la calidad mínima de las bases y 31pb la longitud mínima de las secuencias. Tabla\_. Finalmente, se comprobó de nuevo la calidad de las secuencias con el FastQC.

Tabla 11. Resultados de las secuencias obtenidas procesadas mediante el programa Trimmomatic

CONDICIONES	MUESTRA	RESULTADO SECUENCIACIÓN		FASTqc TRIMMED
		ID	READS	Total SECUENCIAS
<b>MUESTRA: B9-1</b> <b>RAZA 256</b> <b>NO PATOGENICA</b>	<b>B9-1-15min</b>	<b>ah1ta3ss57 .05</b>	<b>33192887</b>	<b>32785848</b>
	<b>B9-1-30min</b>	<b>ah1ta3ss58 .06</b>	<b>17997712</b>	<b>17751245</b>
	<b>B9-1-01hra</b>	<b>ah1ta3ss59 .12</b>	<b>23569435</b>	<b>23191479</b>
	<b>B9-1-02hras</b>	<b>ah1ta3ss60 .19</b>	<b>31022890</b>	<b>30575242</b>
	<b>B9-1-MIX</b>	<b>ah1ta3ss69 .19</b>	<b>68634904</b>	<b>65040194</b>
<b>MUESTRA: B9-2</b> <b>RAZA 1088</b> <b>PATOGENICA</b>	<b>B9-2-15min</b>	<b>ah1ta3ss61 .02</b>	<b>30262460</b>	<b>29827725</b>
	<b>B9-2-30min</b>	<b>ah1ta3ss62 .04</b>	<b>37577858</b>	<b>37047851</b>
	<b>B9-2-01hra</b>	<b>ah1ta3ss63 .07</b>	<b>28907063</b>	<b>28505783</b>
	<b>B9-2-02hras</b>	<b>ah1ta3ss64 .16</b>	<b>33087678</b>	<b>32576770</b>
	<b>B9-2-MIX</b>	<b>ah1ta3ss70 .04</b>	<b>34510194</b>	<b>34116883</b>
<b>MUESTRA: B9-3</b> <b>NO INOCULADA</b>	<b>B9-3-15min</b>	<b>ah1ta3ss65 .05</b>	<b>40019130</b>	<b>39598768</b>
	<b>B9-3-30min</b>	<b>ah1ta3ss66 .06</b>	<b>32603263</b>	<b>32239613</b>
	<b>B9-3-01hra</b>	<b>ah1ta3ss67 .12</b>	<b>28756807</b>	<b>28454029</b>
	<b>B9-3-02hras</b>	<b>ah1ta3ss68 .19</b>	<b>43056852</b>	<b>42538168</b>
	<b>B9-3-MIX</b>	<b>ah1ta3ss71 .07</b>	<b>15635587</b>	<b>15489375</b>
<b>MIX: cluster de muestras correspondientes a los tiempos de 4, 8, 24,48, 72 y 96 horas</b>				

Se realizó un mapeo de las secuencias contra el genoma de referencia de *P. vulgaris* BAT93, mediante el programa de Top Hat (<https://ccb.jhu.edu/software/tophat/manual.shtml>) diseñado para el mapeo de lecturas cortas contra largas secuencias de referencia, identificando exones potenciales, ya que muchas secuencias cortas de RNA se alinearán de manera continua en el genoma.



La anotación de los genes, se realizó utilizando programas BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para la comparación con genes en bases de datos de organismos relacionados y de acuerdo al esquema de clasificación funcional desarrollado por el Consorcio de Ontologías Génicas (Gene Ontology).

Paralelamente se desarrolló una base de datos utilizando My SQL. Todos los resultados obtenidos durante el análisis informático fueron almacenados en formatos compatibles con herramientas de uso común (tales como FASTA y GFF3) para facilitar la distribución de los datos.

La expresión diferencial se estimó con el software edge R (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>). Cuantificamos los niveles de expresión génica en términos de TPM (Transcritos por millón) para las 15 librerías secuenciadas Figura 45, y se ajustó del nivel de significancia, utilizando la Corrección de Bonferroni  $\alpha = 0.05 / 21; 325 \approx 2.35 \times 10^{-06}$  para definir que las secuencias fueron significativamente expresados diferencialmente.



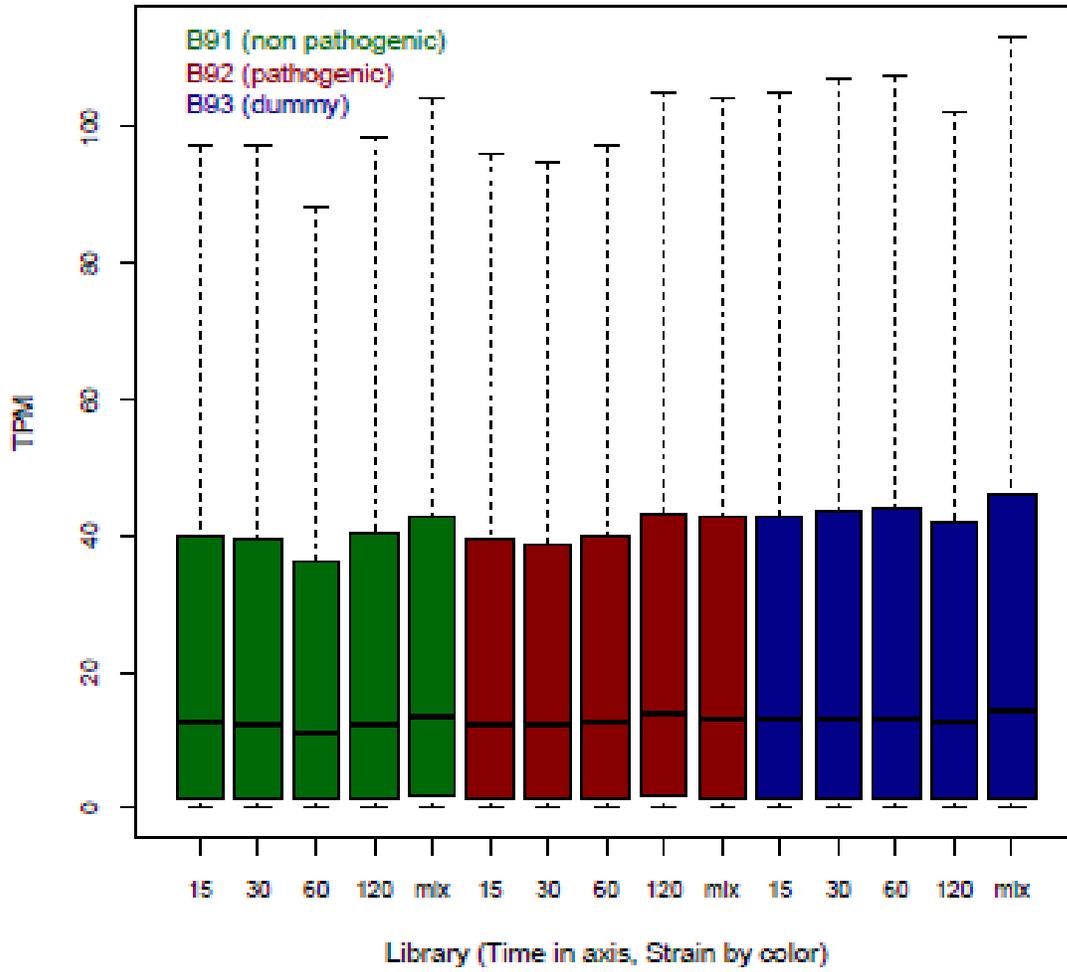


Figura 42. Genes de expresion normalizados en tpm para las 15 librerias. analizadas

## **i. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN LA INTERACCIÓN PLANTA – PATOGENO**

Se analizó una mezcla del transcriptoma de *P. vulgaris* y el hongo patógeno *C. lindemuthianum* en hojas infectadas a diferentes estadios después de la inoculación. En términos generales, solamente 1089 genes mostraron cambios significativos en su patrón de expresión tanto en la interacción con la cepa patógeno, la cepa no patógena y el control.

La comparaciones entre control-compatible y control-no compatible mostraron cambios significativos en 1482 y 1632 genes comunes respectivamente mientras entre compatible y no compatible compartieron 5917 genes diferenciales, sugiriendo que estos genes responden a la presencia del patógeno.

De manera interesante el número más grande de genes expresados diferencialmente en la planta fue para la interacción no compatible o de resistencia (10329) mientras en la interacción compatible o de susceptibilidad fueron menos (7680) y solamente 2306 genes expresados diferencialmente fueron específicos para el tratamiento control.



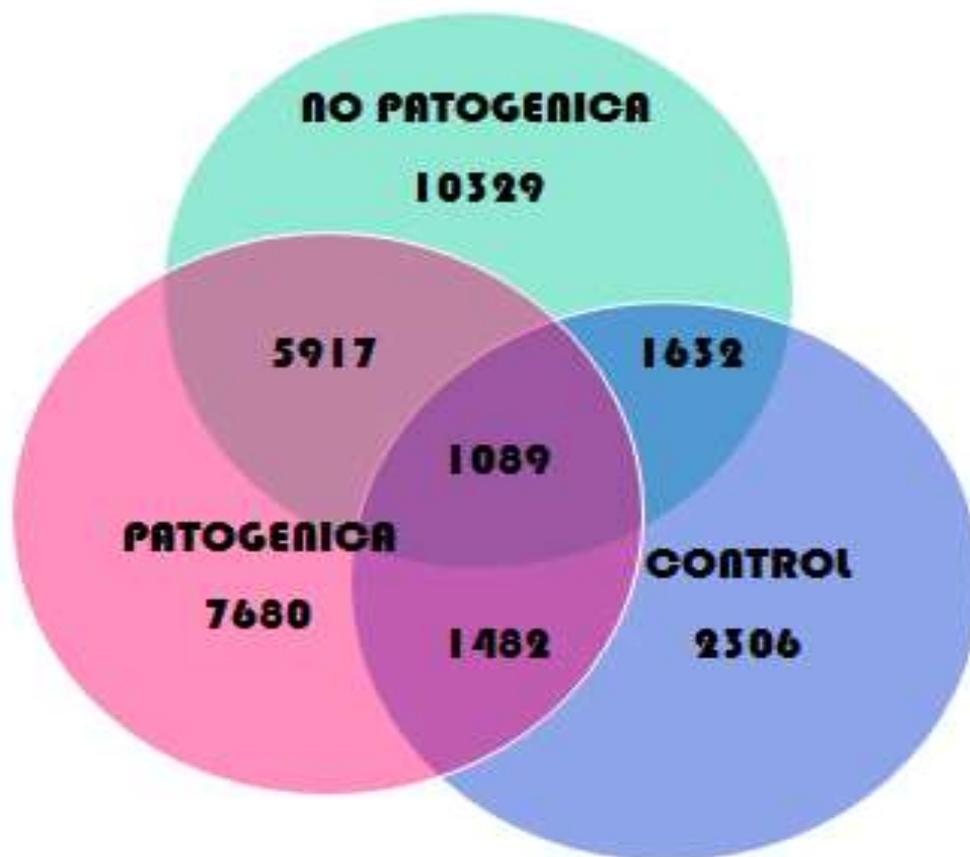


Figura 43. Numero de genes expresados significativamente entre cada una de las imteracciones analizadas.

## ii. ANÁLISIS DEL SISTEMA FACTORIAL SIN RÉPLICAS

Debido al hecho de que no se cuenta con réplicas de las muestras analizadas, se utilizaron los tiempos próximos como pseudoreplicas en las diferentes condiciones que se analizan, De esta manera fue posible identificar los patrones de expresión diferencial entre las reacciones compatibles e incompatibles asociadas con la patogenicidad de *C. lindemuthianum* sobre el cultivar BAT93.

Se corrigió del nivel de significancia, implementando la corrección de Bonferroni, fijando error experimental de tipo  $\alpha = 0:05$ . La corrección de Bonferroni consiste en

dividir el nivel deseado por el número de prueba a realizar y utilizar el valor resultante como umbral de significancia en las pruebas individuales. Esto nos asegura que los genes diferenciales detectados son realmente significativos.

Definimos pseudo réplicas utilizando periodos de tiempo cercanos: 15 y 30 min. 60 y 120 minutos. y la biblioteca de la mezcla de los tiempos más altos (4, 8, 24, 48, 72 y 96 h.) nombrado low, intermediate y high respectivamente.

#### ● PSEUDOREPLICAS

- Low : 15 – 30 min
- Intermediate: 60 – 120 min
- High: Conjunto de los tiempos más avanzados (4, 8, 24, 48, 72 and 96 h.)

Para realizar el análisis se utilizó la función `exactTest` del paquete de `edgeR` (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>). Este paquete compara los recuentos de expresión de diferentes conjuntos de datos experimentales y utiliza la prueba exacta de Fisher para identificar productos génicos expresados diferencialmente. El enfoque de `edgeR` utiliza una distribución binomial negativa y simplifica la estimación de la dispersión excesiva suponiendo que la media y la varianza se relacionan, permitiendo su aplicación en experimentos con un pequeño número de repeticiones.

En la tabla 14, se describe el número de contrastes realizados y el número de genes significantivos, aplicando un error experimental de  $\alpha = 0.05$ . Las condiciones de interacción que se analizan en el primer contraste son entre las diferentes interacciones, con la cepa no patogénica 256 (B91) y con la cepa patogénica 1088 (B92), a distintos intervalos de tiempo, no patogénica; low (etapa temprana de la interacción de 15 y 30 min), intermediate (de 60 a 120 min) y high (a partir de las 4 y hasta las 96 h), de la misma forma se analizan los datos obtenidos en el control (B93),



El segundo contraste compara los genes expresados entre las interacciones con ambas cepas patogénica y no patogénica en la etapa temprana de 15 a 30 minutos y en la etapa intermedia de 60 a 120 minutos.

El tercer contraste muestra los resultados obtenidos del análisis de la interacción, de cada condición, cepa patógena, cepa no patógena y control, comparando los primeros 15 minutos de la interacción, contra los genes significativos en la etapa intermedia que se definió de 30 a 60 y de 60 a 120 minutos para cada caso, y la etapa high o elevada que comprende los genes expresados de 120 minutos hasta las 96 horas,



Tabla 12 Definición de contrastes realizados y numero de genes significantes.

<b>CONTRASTES</b>		<b>TIEMPO</b>			<b>NGS</b>
<b>No. Contraste</b>	<b>Cepa</b>	<b>low</b>	<b>intermediate</b>	<b>high</b>	
<b>i.h.B91</b>	<b>B91</b>		<b>60 - 120</b>	<b>mix</b>	<b>175</b>
<b>l.h.B91</b>	<b>B91</b>	<b>15 - 30</b>		<b>mix</b>	<b>2,934</b>
<b>l.i.B91</b>	<b>B91</b>	<b>15 - 30</b>	<b>60 - 120</b>		<b>338</b>
<b>i.h.B92</b>	<b>B92</b>		<b>60 - 120</b>	<b>mix</b>	<b>184</b>
<b>l.h.B92</b>	<b>B92</b>	<b>15 - 30</b>		<b>mix</b>	<b>1,438</b>
<b>l.i.B92</b>	<b>B92</b>	<b>15 - 30</b>	<b>60 - 120</b>		<b>197</b>
<b>i.h.B93</b>	<b>B93</b>		<b>60 - 120</b>	<b>mix</b>	<b>59</b>
<b>l.h.B93</b>	<b>B93</b>	<b>15 - 30</b>		<b>mix</b>	<b>132</b>
<b>l.i.B93</b>	<b>B93</b>	<b>15 - 30</b>	<b>60 - 120</b>		<b>0</b>
<b>B91.iB92</b>	<b>B91 vs. B92</b>		<b>60 - 120</b>		<b>11</b>
<b>iB91.iB93</b>	<b>B91 vs. B93</b>		<b>60 - 120</b>		<b>248</b>
<b>iB92.iB93</b>	<b>B92 vs. B93</b>		<b>60 - 120</b>		<b>536</b>
<b>iB91.iB92</b>	<b>B91 vs. B92</b>	<b>15 - 30</b>			<b>211</b>
<b>lB91.lB93</b>	<b>B91 vs. B93</b>	<b>15 - 30</b>			<b>2338</b>
<b>lB92.lB93</b>	<b>B92 vs. B93</b>	<b>15 - 30</b>			<b>1960</b>
<b>l.i1.B91</b>	<b>B91</b>	<b>15</b>	<b>30-60</b>		<b>13</b>
<b>l.i1.B92</b>	<b>B92</b>	<b>15</b>	<b>30-60</b>		<b>8</b>
<b>l.i1.B93</b>	<b>B93</b>	<b>15</b>	<b>30-60</b>		<b>215</b>
<b>l.i2.B91</b>	<b>B91</b>	<b>15</b>	<b>60 - 120</b>		<b>68</b>
<b>l.i2.B92</b>	<b>B92</b>	<b>15</b>	<b>60 - 120</b>		<b>75</b>
<b>l.i2.B93</b>	<b>B93</b>	<b>15</b>	<b>60 - 120</b>		<b>0</b>
<b>l.h1.B91</b>	<b>B91</b>	<b>15</b>		<b>120 - mix</b>	<b>25</b>
<b>l.h1.B92</b>	<b>B92</b>	<b>15</b>		<b>120 - mix</b>	<b>32</b>
<b>l.h1.B93</b>	<b>B93</b>	<b>15</b>		<b>120 - mix</b>	<b>0</b>

Analizando en detalle los resultados de la Tabla 14 Podemos comparar los números de genes significativamente expresados bajo diferentes condiciones y en diferentes tiempos como se puede observar en las Figuras 46 y ¿??.



COMPARACIÓN DE NÚMEROS DE GENES SIGNIFICATIVOS  
EN DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO

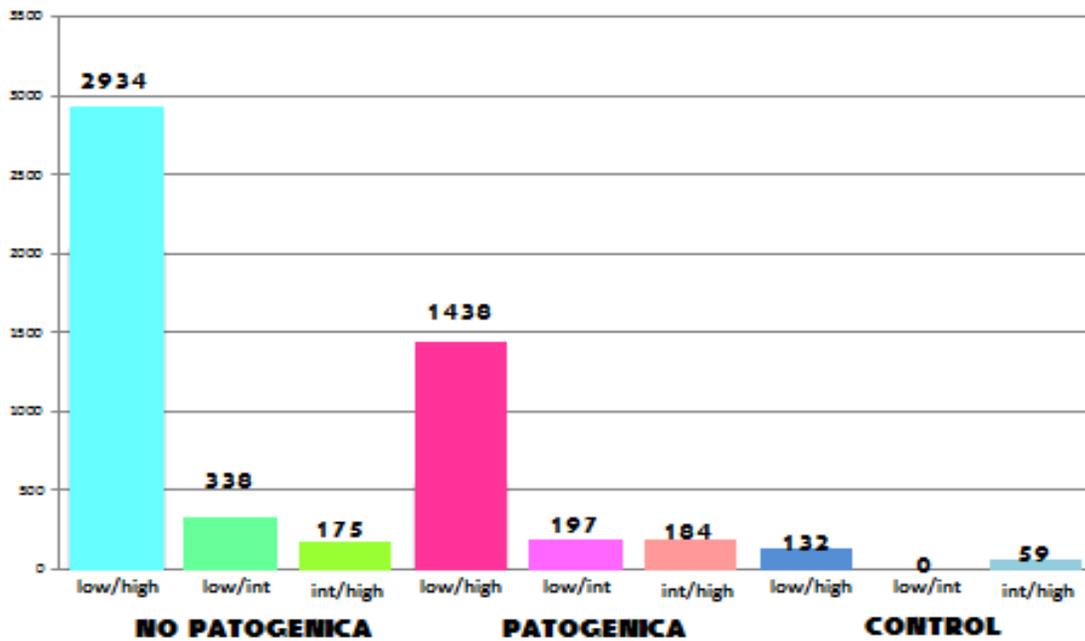


Figura 44 Comparación de números de genes significativos en diferentes intervalos de tiempo, en las diferentes condiciones de interacción, cepa no patogénica, cepa patoénica y control.

En los estudios que describen la expresión temprana de genes, en la respuesta de defensa en plantas completas de frijol ante el patógeno *C. lindemuthianu m*, se ha demostrado una expresión más rápida de respuesta en el caso de una interacción incompatible en comparación con las interacciones compatibles, sugiriendo que los tiempos máximos de la expresión de genes de respuesta frente a la infección por hongos en la interacción compatible se retrasan en comparación con los de la interacción incompatible.

La Figura 47 muestra que en la reacción incompatible (no patogénica) un mayor número de genes sufren cambios en expresión en la primera etapa de la interacción que en las etapas más tardías mientras en la interacción compatible los números de genes con cambios en expresión varían muy poco y en el control son mucho menores.



Además, cuando se comparan los números de genes expresados diferencialmente utilizando la cepa compatible o la incompatible, encontramos que la reacción incompatible conduce a la expresión deiferencial de un número mayor de genes que la reacción compatible o el control. Este resultado concuerda con la idea que la cepa incompatible induce una respuesta más temprana por parte de la planta huésped.

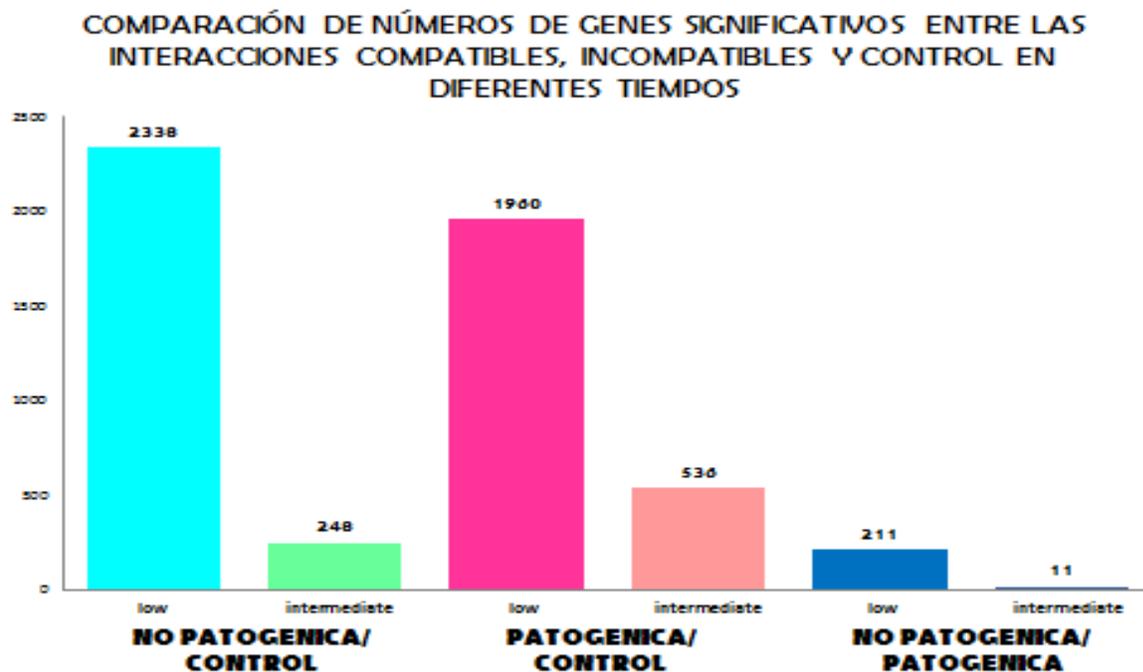


Figura 45 Comparación de los números de genes significativos

Diferentes intervalos de tiempo, en las interacciones entre la cepa no patógena y el control, la cepa patógena y el control y entre ambas cepas, en los intervalos de tiempo low (15-30 min) e intermediate (60-120 min).

Los resultados de nuestro análisis de ARN-Seq indican que las inducciones diferenciales de la expresión de genes de respuesta a la infección entre las interacciones compatibles e incompatibles ocurren en la primera etapa de la infección (Figura 47).

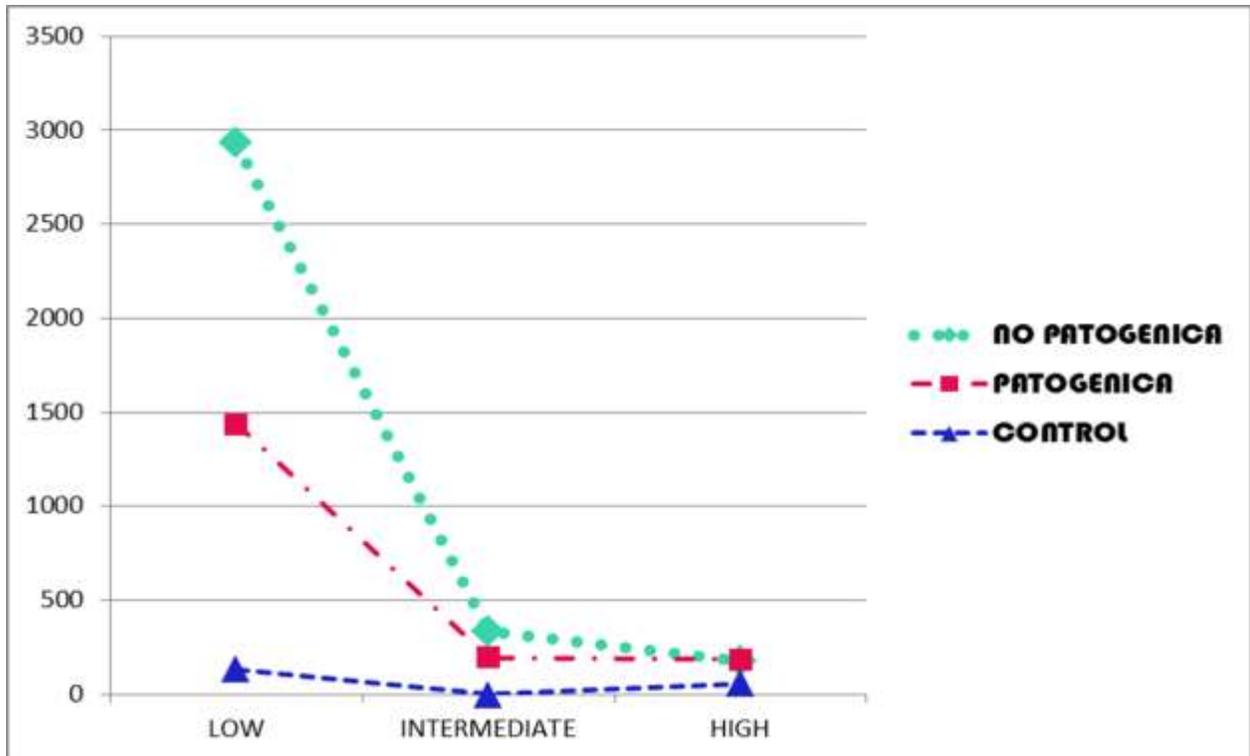


Figura 46 Expresión de genes significativos en diferentes etapas en la interacción entre *C. lindemuthianum* y *P. vulgaris*

Con las cepas no patogénica, patogénica y el control. Usando un nivel de significancia, implementando la corrección de bonferroni, fijando error experimental de tipo  $\alpha = 0.05$ .

Tomando en cuenta estas observaciones y dado que las etapas iniciales de la interacción con las más críticas, analizamos en más detalle los genes expresados diferencialmente en el primer par de interacciones. Solamente considerando los genes con función putativa basado en su anotación, en el primer par de interacciones encontramos una relación similar a los resultados globales con la gran mayoría de los genes con cambios significativos en expresión asociados a la interacción incompatible (4048) y solamente 1549 asociados con la interacción compatible mientras en el control solamente identificamos 141 genes expresados diferencialmente (Figura 50).

## GENES DE INTERES

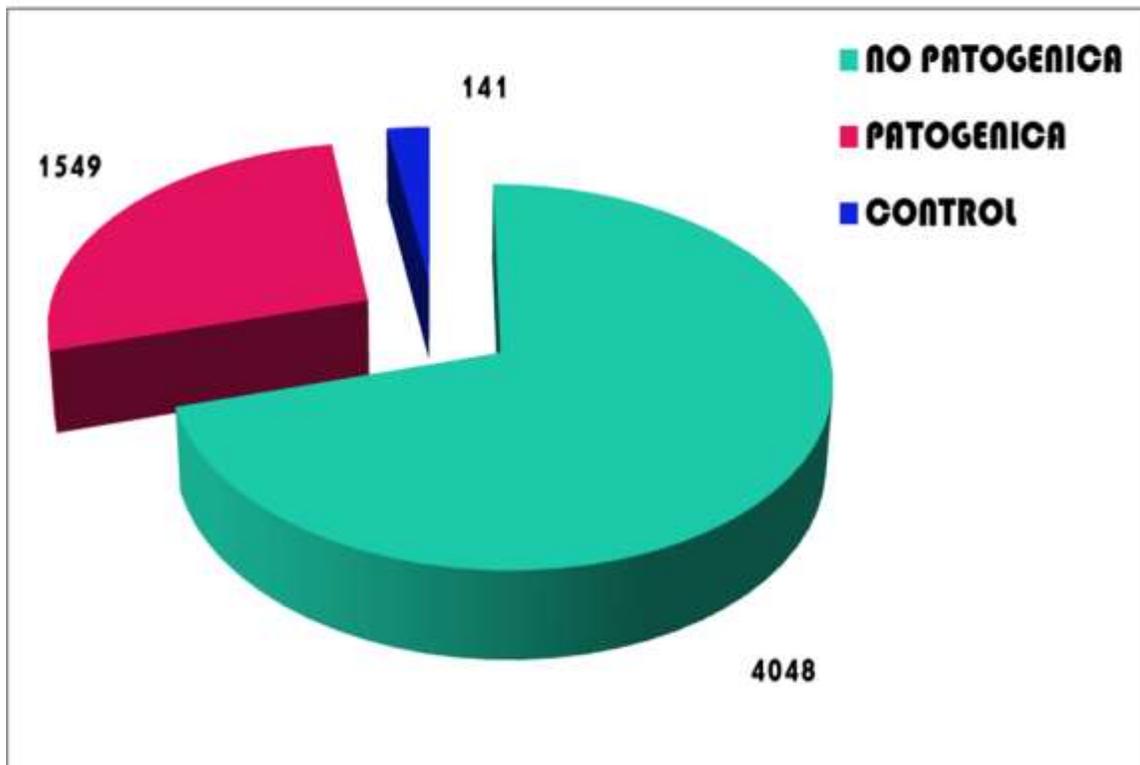


Figura 47 Genes de interes expresados diferencialmente en *phaseolus vulgaris* en cada condicion en específico.

Las respuestas rápidas a la presencia de patógenos implican cambios en la iniciación de nuevos transcritos y esto se debe reflejar también en la transcripción y actividad de genes codificantes de factores de transcripción (FT). Como se muestra en la Figura 51, identificamos un mayor número de factores de transcripción con patrones de expresión diferencial en la interacción incompatible comparada con la interacción compatible o el control. Estos resultados confirman de nuevo que la respuesta de expresión diferencial del cultivar BAT93 fue más pronunciado en la reacción de resistencia que en la reacción susceptible.

Se detectó la sobreexpresión de 25 genes con anotaciones funcionales de FTs. De ellos, 21 genes mostraron sobre expresión en la interacción incompatible, 3 en la interacción compatible y solamente 1 en la muestra control (Tabla15).

## FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

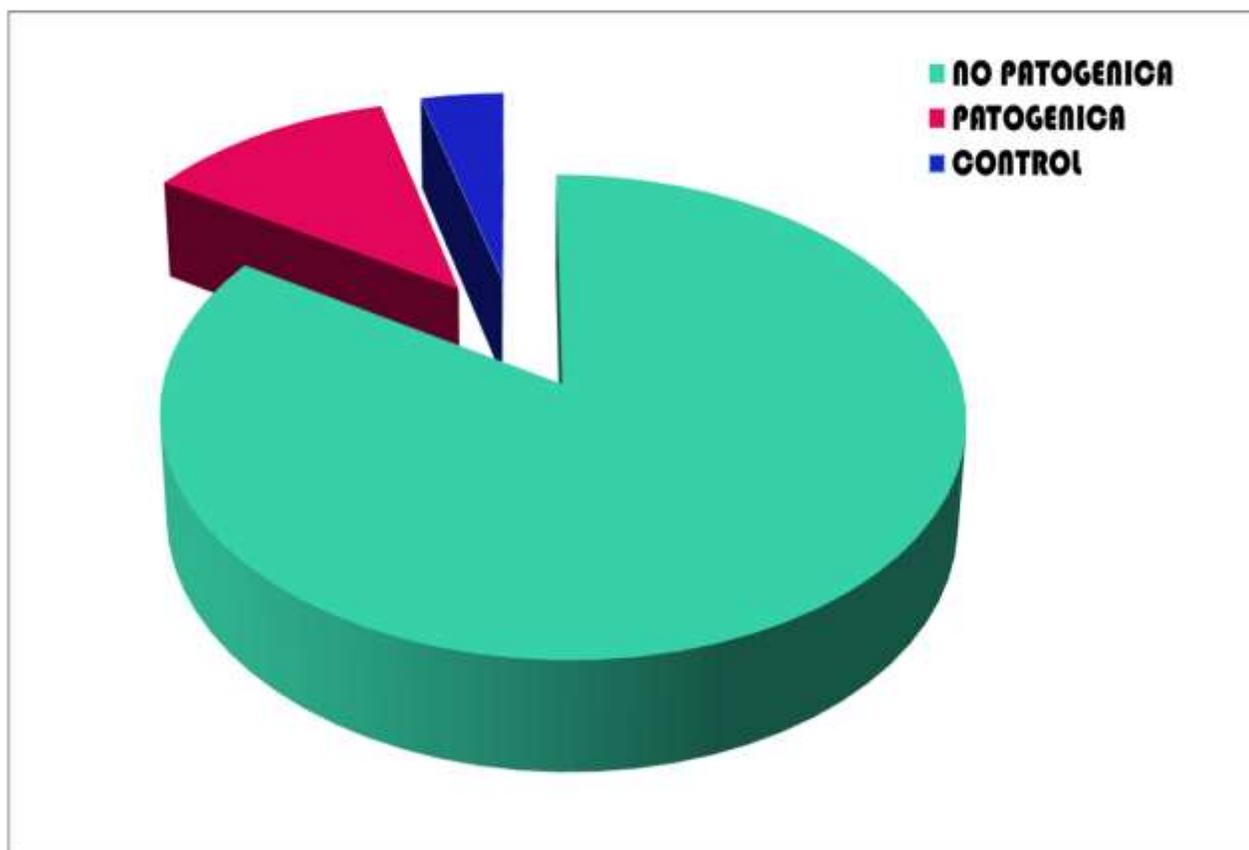


Figura 48 Factores de Transcripcion en la interaccion entre *Phaseolus vulgaris* en cada condicion en específico.

En la reacción incompatible encontramos 12 clases de FT diferentes, con los tipo “Basic Helix-Loop-Helix (BHLH) siendo los más abundantes seguido por los factores tipo WRKY.

**Tabla 13 Factores de transcripcion expresados en las distintas interacciones en phaseolus vulgaris.**

<b>NO PATOGENICA</b>	<b>PATOGENICA</b>	<b>CONTROL</b>
bzip domain class transcription factor [malus x	bzip transcription factor family protein	transcription factor myb48 [arabidopsis
ethylene-responsive transcription factor tiny	transcription factor asg4-like	
mads-box transcription factor	transcription factor bhlh63-like	
myb transcription factor [medicago		
myb-like transcription factor [medicago		
transcription factor bhlh122-like		
transcription factor bhlh128-like		
transcription factor bhlh130-like		
transcription factor bhlh149-like		
transcription factor bhlh25		
transcription factor bhlh35		
transcription factor bhlh51-like		
transcription factor ilr3-like		
transcription factor myc2-like		
transcription factor spatula [medicago		
transcription factor tcp20-like		
transcription factor tga1-like		
trihelix transcription factor		
wrky transcription factor [gossypium		
wrky transcription factor [gossypium		
wrky transcription factor [medicago		

Los resultados de nuestro análisis de ARN-Seq indican que las inducciones diferenciales de la expresión de genes de respuesta a la infección entre las interacciones compatibles e incompatibles son observadas en la primera etapa de la infección.



## DISCUSIÓN

En la comunidad de investigación en *P. vulgaris*, el cultivar BAT93 ha sido utilizado extensamente para llevar a cabo análisis genéticos y estudiar los procesos de domesticación de esta especie (Freyre et al. 1998; Papa y Gepts 2003; González et al. 2005; Blair et al., 2003; Grisi et al. 2007). Como uno de los cultivares mejor caracterizados su genoma ha sido secuenciado bajo la iniciativa PHASIBEAM y por consecuencia se escogió BAT93 para el presente trabajo con el objetivo de aprovechar los datos genómicos ya disponibles.

En el grupo de trabajo tenemos una colección extensa de cepas/razas de *C. lindemuthianum* obtenidas de cultivos de frijol de diferentes regiones geográficas del país (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Forestales y Pecuarias INIFAP) de México). Estas cepas han sido caracterizadas anteriormente basándose con base en su genotipo molecular y su patogenicidad en relación a la colección de cultivares diferenciales disponibles para *P. vulgaris*. La colección de cepas es resguardada a 4°C y las suspensiones de esporas a -80°C. Para iniciar el proyecto actual fue necesario reactivar un grupo de cepas para probar su reacción con el cultivar BAT93 e identificar cepas que produjeran reacciones diferenciales en términos de patogenicidad hacia BAT93. Para confirmar los patotipos/razas de las cepas reactivadas llevamos a cabo inoculaciones sobre el juego de 12 cultivares diferenciales, obteniendo las reacciones compatibles e incompatibles esperadas en cada caso.

Comprobamos además que el sistema de inoculación sobre hipocotilos produce resultados consistentes y comparables con las inoculaciones sobre plantas completas y se empleó el sistema de inoculación de hipocotilos para determinar la patogenicidad de las cepas de *C. lindemuthianum* sobre el cultivar BAT93. Basados con base en los resultados obtenidos con las plantas completas 6 cepas fueron utilizadas para probarlas con BAT93. El cultivar testigo Victoria fue incluido como un cultivar universalmente susceptible.



Las cepas 1088 y 256 mostraron reacciones claramente contrastantes en relación a su compatibilidad o incompatibilidad con BAT93 mientras ambas cepas fueron capaces de infectar a Victoria. Por consecuencia las cepas 1088 y 256 fueron escogidas para llevar a cabo el análisis de RNAseq de muestras obtenidas durante el desarrollo de las interacciones compatibles e incompatibles con BAT93 con el fin de identificar transcritos expresados diferencialmente en estas interacciones con un solo genotipo de *P. vulgaris*.

Aunque existen informes de que la reacción de compatibilidad o incompatibilidad se define en un tiempo muy corto después del contacto entre huésped y patógeno, para la interacción *C. lindemuthianum*–*P. vulgaris* esto no ha sido documentado en detalle a nivel microscópico, por lo que considerábamos esencial llevar a cabo un análisis comparativo de las etapas tempranas de las interacciones entre las cepas 1088 y 256 con BAT93 y Victoria. Para facilitar este análisis y distinguir fácilmente entre las estructuras del hongo y las de la planta, transformamos cada una de las cepas (1088, 256) con un cassette que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) usando el sistema de *A. tumefaciens* el cual ha sido utilizado previamente con éxito en *C. lindemuthianum* (Quintero-Jiménez et al., 2010).

Las observaciones mostraron diferencias claras entre la reacción incompatible entre la cepa 256 y BAT93 y la reacción compatible entre 256 y Victoria mientras ambos cultivares mostraron reacciones compatibles con 1088. Treinta minutos después del contacto entre 1088 y BAT93 y 1088/256 con Victoria, pudimos apreciar que algunas conidias cambiaban su forma de ovalada, mostrando una forma puntiaguda en un extremo señalando el inicio de la formación de tubos germinativos y apresorios. Aunque algunas conidias en la interacción BAT93/256 mostraron estos cambios los observados en tiempos más largos (48 y 72 h después de la inoculación). El proceso de infección en las interacciones compatibles siguen los pasos descrito en páginas anteriores hasta completar el ciclo produciendo peritecios y conidias nuevamente. En contraste, en la reacción compatible las plantas responden al patógeno produciendo callosidades y mostrando reacciones de hipersensibilidad y así restringiendo la invasión del patógeno. Los resultados muestran que las reacciones de compatibilidad son



definidas muy tempranamente en la interacción-al menos en las primeras 30 minutos-justificando la toma de muestras para el análisis de expresión diferencial desde los 15 minutos pos-inoculación.

La identificación de exones o secuencias que codifican proteínas a través del mapeo con un genoma de *P. vulgaris* desarrollado en la Unidad de Genómica Avanzada del, Cinvestav Irapuato (Vlasova et al., 2016) y la anotación de estas secuencias permitió determinar un total de 21,325 genes codificantes putativos basados en el cDNA. Este resultado concuerda bien con el estudio de (Jeremy Schmutz et al., 2014; Vlasova et al., 2016) donde reportan 27,197 y XXX (22,706 sin incluir transcritos alternos) genes putativos en el genoma secuenciado de *P. vulgaris* indicando que la cobertura del genoma de *P. vulgaris* en nuestros datos de RNAseq era representativa y aceptable para llevar a cabo un análisis de expresión diferencial entre los diferentes etapas del proceso de infección con *C. lindemuthianum*.

Dado la carencia de réplicas para el análisis diferencial, se implementó la estrategia de emplear los tiempos de muestreo más cercanas como pseudo-réplicas. De esta manera fue posible identificar los patrones de expresión diferencial entre las reacciones compatibles e incompatibles asociadas con la patogenicidad de *C. lindemuthianum* sobre el cultivar BAT93. Viendo los resultados en diferentes niveles, las conclusiones son muy congruentes. En la reacción de incompatibilidad (resistencia) observamos que un número mucho mayor de genes se expresa de manera diferencial en las primeras etapas de la interacción en comparación con la interacción compatible (susceptible) o el control con agua. Este resultado concuerda perfectamente con la hipótesis de que en las interacciones incompatibles, la planta percive la presencia del patógeno y reacciona rápidamente, estimulando su metabolismo de defensa para rechazar al invasor mientras en la reacción compatible, la planta no monta esta respuesta, permitiendo el avance y penetración del hongo. Las observaciones a nivel molecular concuerdan muy bien con las observaciones del progreso de la infección a nivel microscópico. La expresión diferencial de más factores de transcripción en las etapas iniciales en la reacción incompatible en comparación con la reacción compatible también apoya esta conclusión.



El análisis de los datos a nivel general también descubrió otros resultados interesantes. Solamente 1080 genes fueron compartidos en términos de expresión diferencial en la reacción incompatible, compatible y el control y probablemente no están directamente relacionados con el proceso de infección sino con el metabolismo general de las plantas. Los transcritos diferenciales específicos de cada condición sugieren que la planta reconoce y responde de manera distinta a cada cepa y al agua en sí. La respuesta al control de agua es la más baja y puede representar la respuesta a estrés por las condiciones de incubación de la planta o simplemente como respuesta a condiciones de lluvia. La respuesta específica a la cepa compatible es significativa con 7680 transcritos expresados diferencialmente. Es posible que esta interacción represente no solamente la falta de reconocimiento por parte de la planta sino una respuesta específica estimulado por parte del patógeno para inhibir la respuesta de defensa.

La diferencia significativa en el número de FT expresados diferencialmente en la condición incompatible en comparación con la condición compatible también confirma una reacción más rápida y efectiva en las primeras etapas en la condición incompatible. Los factores de transcripción más abundantes en esta condición fueron los tipo bHLH. Esta clase de FT hasta la fecha no ha sido ampliamente estudiada en las plantas, sin embargo se han caracterizado por la función de biosíntesis de antocianinas, señalización por fitocromo, la expresión de globulina, la dehiscencia del fruto y carpelo y el desarrollo de la epidermis (Mahe A, et al 1993; O'Connell RJ 1985).

La producción de antocianinas es común en los mecanismos de defensa y respuestas a estrés en especies vegetales y la asociación con los BHLH y desarrollo de epidermis es interesante dado que este tejido sufre el primer contacto con el patógeno y desencadena las respuestas de compatibilidad o incompatibilidad. Además las estructuras (callosas) que forman una barrera física e impiden la penetración de los apresorios (Figura 33) se desarrollan justo debajo de la epidermis de las células.

La presencia de los FT tipo WRKY es muy consistente con la respuesta incompatible dado que han sido descritos como importantes en la respuesta a ataque de patógenos y en la señalización de la molécula de Ácido Salicílico (SA; Eulgem y Somssich, 2007).



Se activan localmente, así como en la defensa sistémica de respuesta (llamada resistencia sistémica adquirida [SAR]), y están moduladas por fitohormonas, especialmente Ácido Jasmónico (JA) y Ácido Salicílico (SA) (Durrant y Dong, 2004; Bostock, 2005).

La identificación de otras clases de FT es consistente con una respuesta a estrés abiótico o biótico y la implementación de una respuesta de defensa general. El hallazgo más interesante es que no hay indicación que estos mecanismos de defensa están estimulados en la reacción compatible en las primeras etapas de la infección, permitiendo la invasión y patogénesis de las cepas compatibles.

Los resultados de nuestro análisis de ARN-Seq indican que la inducción diferencial de la expresión de genes de respuesta a la infección entre las interacciones compatibles e incompatibles son esenciales en las etapas más tempranas de la infección. Los resultados concuerdan con la respuesta gen-por-gen de defensa donde una reacción compatible o incompatible depende de la capacidad de la planta de reconocer el hongo como patógeno desde el contacto inicial como se muestran las imágenes de microscopia y montar de inmediata sus sistema de defensa. Un retraso en esta respuesta permite la entrada del patógeno de las células de la planta, culminando en la infección y daño consecuente.



# CONCLUSIÓN

En el caso del cultivar de fríjol BAT 93, para la evaluación de resistencia/susceptibilidad a antracnosis, el mayor valor en porcentaje corresponde a 4, con la cepa 1088, asumiendo que si la planta no tiene la capacidad de impedir el desarrollo de la infección, por lo que el patógeno coloniza los tejidos, este porcentaje es suficiente para matar la planta, al utilizar la escala de evaluación propuesta de severidad que iba de 0 a 4. Del mismo modo se evaluó un grado 0 en la interacción con la cepa patógena 256, lo que corresponde a una interacción incompatible con respecto a esta raza patógena.

Adicionalmente, los métodos de microscopia confocal permitieron documentar el proceso de desarrollo y propagación de la infección, permitiendo observar la formación de estructuras de penetración, el cambio de la fase biotrófica a necrotrófica y las respuestas de hiper sensibilidad de la plántula para arrestar al patógeno y detener su desarrollo, en base a estos resultados es posible establecer que las etapas tempranas en la interacción de *Phaseolus* con el patógeno son determinantes en establecer si la planta presenta tolerancia a la enfermedad al verse afectada por el patógeno.

La activación de las respuestas de defensa de frijol durante la penetración de los tejidos por *C. lindemuthianum* se desencadenan desde los primeros minutos de contacto entre la planta y el hongo, lo cual pudo ser corroborado con la documentación histológica, utilizando técnicas de microscopia confocal, donde se observaron cambios morfológicos desde los 30 minutos posteriores a la inoculación.

La expresión de estos genes se observó con mayor fuerza en las primeras 2 horas de la interacción, mostramos la expresión de transcritos en las diferentes condiciones de interacción, donde se corrobora que congruentemente con los reportes anteriores la respuesta incompatible es en la que se produce una respuesta por parte de la planta.



Nuestros resultados sugieren que estos factores de avirulencia se producen cuando se produce la penetración de la planta y puede ser desencadenado por compuestos extracelulares secretados por el hongo o proteínas de la pared celular de los hongos, manifestándose una respuesta a nivel transcriptoma, pocos minutos después de tener contacto con el hongo. Los datos obtenidos en este estudio del desarrollo en planta de *C. lindemuthianum* demostró que la resistencia es expresada en diferentes fases de la infección, siendo de una importancia vital el reconocimiento del patógeno por parte de la planta en la etapa temprana de la interacción.

## PERSPECTIVAS

- ❖ Seleccionar genes de interés de acuerdo al análisis de expresión diferencial realizado.
- ❖ Analizar los patrones de expresión de los genes seleccionados por medio de PCR en tiempo real.
- ❖ Analizar la expresión transitoria de genes seleccionados, en presencia y ausencia del patógeno.
- ❖ Analizar a fondo los genes específicos para la reacción incompatible para identificar las rutas/mecanismos potenciales involucrados en promover el rechazo del patógeno.
- ❖ Confirmar los patrones de expresión de los genes seleccionados por medio de PCR en tiempo real.





## BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar, M-, Riva, O., Peltzer E; et al. Analysis of Rhizobium and of its simbiosis with wild Phaseolus vulgaris supports coevolution in centres of host diversification. Proc Natl Acad Sci. (2004). 101: 13548-13553.
2. Aleman Ramos A. Análisis genómico a través de herramientas informáticas aplicadas a datos de secuenciación de nueva generación. Sevilla Master Universitario en Lógica, Computación e Inteligencia Artificial. 2011.
3. Andrew J Severin, Jenna L Woody, et al. RNA-Seq Atlas of Glycine max: A guide to the soybean transcriptome. Severin et al. BMC Plant Biology 2010, 10:160.
4. Araya, Carlos M.; Bonilla, Becerra, Enrique N et al.; A. Importancia, síntomas y manejo de las principales enfermedades del frijol (Phaseolus vulgaris L.) Cali, Colombia: Centro
5. Awale, H.E., and J.D. Kelly. Development of SCAR markers linked to Co-42 gene in common bean. Annu. Rept. Bean Improv. 2001. Coop. 44: 119–120.
6. Balardin RS, Jarosz AM, et al. . Virulence and molecular diversity in Colletotrichum lindemuthianum from South, Central, and North America. Phytopathology 1997 87:1184–1191.
7. Balardin, R.S., A.M. Jarosz, et al. Virulence and molecular diversity in Colletotrichum lindemuthianum from South, Central and North America. Phytopathology 1997. 87(12): 1184–1191.
8. Ballini, E., J.B. Morel, et al. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. Molecular Plant-Microbe Interactions 2008 21(7): 859–868.
9. Bell JN, Dixon RA, et al Differential induction of chalcone synthase mRNA activity at the onset of phytoalexin accumulation in compatible and incompatible plant–pathogen interactions. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:3384–8.



10. Broughton WJ, Hernández G, et al (Phaseolus spp.) – model food legumes. *Plant and Soil* (2003). 252: 55–128. Castellanos Guillermo, Carlos Jara, Gloria Mosquera. *Fitopatología de Frijol Manejo del hongo en el laboratorio. Guías Prácticas de Laboratorio para el Manejo de Patógenos del Frijol. Colletotrichum lindemuthianum Enfermedad: Antracnosis*. 2013. pp: 3-39
11. Chacón, M.I., ., D. Debouck, et al.. Phylogeographic analysis of the chloroplast DAN variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Plant Systematics and Evolution*. 2007.
12. Sonesson C., Delorenzi M.; et al. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *Sonesson and Delorenzi BMC Bioinformatics* 2013, 14:91.
13. Blair M Checa O., et al. Mapping QTL for climbing ability and component traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*; L.). *Molecular Breeding* 2008. 22: 201–215.
14. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). *La antracnosis del frijol y su control*. 2001.
15. Veneault C., Lauge R, et al. Nonpathogenic Strains of *Colletotrichum lindemuthianum* Trigger Progressive Bean Defense Responses during Appressorium-Mediated Penetration. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, p. 4761–4770 Vol. 71, No. 8.
16. Dixon RA, Gerrish C, et al Elicitor-mediated induction of chalcone isomerase in *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. *Planta* 1983; 159:561–9.
17. Dixon RA, Lamb CJ, et al. Stimulation of the novo synthesis of Lphenylalanine ammonia-lyase in relation to phytoalexin accumulation in *Colletotrichum lindemuthianum* elicitor-treated cell suspension cultures of French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biochim Biophys Acta* 1979; 586:453–63.
18. Evangelisti E, Schornack S., et al. Cross-interference of plant development and plant–microbe interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 2014, pp:118–126
19. Fraire-Velazquez S, Lozoya-Gloria E, Differential early gene expression in *Phaseolus vulgaris* to Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* in incompatible and compatible interactions *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63 (2003) pp 79–89
20. French, E.R. Y T.T.Hebert. *Métodos de investigación fitopatológica*. IICA, Costa Rica. 1982 pp. 289.
21. García-Pineda, E, Lozoya-Gloria, E, et al. Genes de Resistencia a Enfermedades en Plantas / Volumen 22, Número 3, 2004, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



22. Garrido R., E.R. Identificación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc y Magn.) Scrib. En México y búsqueda de resistencia genética a éste hongo. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillos, Méx. 1986, pp. 103.
23. Garrido-Ramírez ER, Romero-Cova S. 1989. Identificación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Y Magn.) Scrib. en México y búsqueda de resistencia genética a este hongo. *Agrociencia* 77:139–156.
24. Garzón Gutiérrez L. Homólogos de genes de resistencia en fríjol (*Phaseolus vulgaris*) y su aplicación en resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum*. Bogotá, Colombia. 2012.
25. Garzón, L.N., G. Ligarreto, and M.W. Blair. Molecular Marker-Assisted Backcrossing of Anthracnose Resistance into Andean Climbing Beans ( L.). 2008. *Crop Sci.* 48: 562–570.
26. Garzón, L.N., M.W. Blair, O.A. Oliveros, B. Rosen, G.A. Ligarreto, J. Gao, and D. Cook. Submitted. Isolation and characterization of NBS resistance gene homologues in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Phytopathology*.
27. Geffroy, V., D. Sicard, J.C.F. de Oliveira, M. Sévignac, S. Cohen, P. Gepts, C. Neema, T. Langin, and M. Dron. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1999. 12(9): 774–784.
28. Geffroy, V., M. Sévignac, J.C.F. de Oliveira, G. Fouilloux, P. Skroch, P. Thoquet, P. Gepts, T. Langin, and M. Dron. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2000. 13(3): 287–296.
29. Gepts, P. Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. 33(7): 1124–1130. 1998.
30. Gepts, P., and D. Debouck. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). p. 7–53. In CAB International, Wallingford. Nodari, R.O., S.M. Tsai, R. Gilbertson, and P. Gepts. 1993a. Nodari RO, Tsai SM, Gilbertson RL, Gepts Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based linkage map. *Theor Appl Genet* 1991. 85: 513–520.
31. González, M., Rodríguez, R. M-E. Zavala, Jacobo, J. L. Hernández, F., Acosta J., Martínez, O., Simpson, J. Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopatology* 88: 292-



299.

32. Grisi, M.C., Blair, M.W., Gepts, P., Brondani, C., Pereira, P.A., & Brondani, R.P. Genetic mapping of a new set of microsatellite makers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x Jalo EEP558. *Genet Mol Res* 2007. **6**: 691-706.

33. Halima Awale, Falconí-Castillo E., et al. Caracterización De Aislamientos De *Colletotrichum lindemuthianum* de Ecuador y Guatemala Para Identificar Genes De Resistencia. *Agronomía Mesoamericana* 2008.

34. Hernández, G.F.. Caracterización de la Base genética de la Resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum* en la línea A193 de Frijol Común (*Phaseolus vulgaris* L.) 1998.

35. Hiroyuki Takahara, A.ndreas Dolf, Richard O’Connell, Flow cytometric purification of *Colletotrichum higginsianum* biotrophic hyphae from Arabidopsis leaves for stage-specific transcriptome analysis. *The Plant Journal* (2009) 59, 672–683.

36. INEGI. Estadísticas históricas de México 2014. 2015. 9.22

37. Interacción Planta Microorganismo, Respuesta de Defensa de la Planta. Unidad Academica de Biología Experimental. Dpto. de Biología Molecular de Plantas.

38. Internacional de Agricultura Tropical. 1995. pp. 69.

39. Kaoru Kobayashi, Naoko Yasuno, et al. Inflorescence Meristem Identity in Rice Is Specified by Overlapping Functions of Three AP1/FUL-Like MADS Box Genes and PAP2, a SEPALLATA MADS Box Gene C W. *The Plant Cell*, 2012, Vol. 24: 1848–1859, www.plantcell.org 2012 American Society of Plant Biologists.

40. Kawahara Y, Oono Y, Kanamori H, Matsumoto T, Itoh T, et al. Simultaneous RNA-Seq Analysis of a Mixed Transcriptome of Rice and Blast Fungus Interaction. *PLoS ONE* (2012) 7(11): e49423. doi:10.1371/journal.pone.0049423.

41. Lara Flores. El cultivo del frijol en México. *Revista Digital Universitaria*. 2015 vol.16, No.2

42. León Saavedra Ileana. Instituto de Investigaciones Hortícolas “Liliana Dimitrova”. *Temas de Ciencia y Tecnología* 2009. pp 45 – 54

43. León Saavedra. La antracnosis y la mancha angular del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) *Temas de Ciencia y Tecnología* vol. 13 número 39, septiembre – diciembre. 2009. pp 45 – 54.

44. Madriz Kenneth. *Manejo Integrado de Plagas*, Costa Rica 2002. No. 63 pp. 22 - 32.



45. Marthur, R.S., H.L. Barnett, and V.G.Lilly. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. *Phytopathology* 1950, pp.40: 106-114.
46. Medina-Chávez, R. Estandarización y Caracterización de la Antracnosis en la interacción frijol común (*Phaseolus vulgaris*)-*Colletotrichum lindemuthianum* para el Análisis del Transcriptoma. 2010.
47. Mercedes Cruz Borrueal, Yaquelín Hernández Fundora, Elio Rivas Figueredo. Mecanismos de resistencia de las plantas al ataque de patógenos y plagas *Temas de Ciencia y Tecnología* Vol.10 Número 29. 2006
48. Nodari, R.O., S.M. Tsai, P. Guzman, R. Gilbertson, and P. Gepts. Nodari RO, Tsai SM, Guzmán P, Gilbertson RL, Gepts P (1993 b) Towards an integrated linkage map of common bean. 3. Mapping genetic factors controlling host-bacterium interactions. 1993. *Genetics* 134: 341–350.
49. Nodari, R.O., S.M. Tsai, P. Guzman, R.L. Gilbertson, and P. Gepts. Toward an intergrated map of common bean. 3. Mapping genetic factors controlling host-bacterial interactions. 1993. *Genetics* 134: 341– 350.
50. Noor, M.A.F., A.L. Cunningham, and J.C. Larkin. Consequences of recombination rate variation on quantitative trait locus mapping studies: simulations based on the *Drosophila melanogaster* genome. *Genetics and Molecular Biology* 2001. 159: 581–588.
51. Ochoa, I.E., M.W. Blair, and J.P. Lynch. QTL analysis of adventitious root formation in common bean under contrasting phosphorus availability. *Crop Science* 2006. 46(4): 1609–1621.
52. P.Vidhyasekaran. *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops. Molecular Biology and Host Defense Mechanisms. Second Edition, /Fungal Pathogenesis in Plants and Crops, Second Edition* Editorial Board. 2007.
53. Pastor-Corrales (ed.) La antracnosis del frijol común, *Phaseolus vulgaris*, en America Latina. Documento de Trabajo de la Reunión de Trabajo del CIAT, junio de 1988, Cali, Colombia 1988. pp.212-240.
54. Pastor-Corrales, M.A.. Variación patogénica de *Colletotrichum lindemuthianum*, el agente causal de la antracnosis de frijol y una propuesta para su estandarización. En: M.A.
55. Pavana J. Hiremath, Andrew Farmer. Large-scale transcriptome analysis in chickpea (*Cicerarietinum* L.), an orphan legume crop of the semi-arid tropics of Asia and Africa. *Plant Biotechnology Journal*. 2011 9, pp. 922–931.



56. Roberto Bollini, Emilia Carnovale, Bruno Campion. Removal of antinutritional factors from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 1999, pp. 217–219
57. Rodríguez-Guerra R, Ramírez-Rueda M-T, Simpson J. Capacidad de anastomosis en una colección de cepas del hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. Et Magn.) Scrib., agente causal de la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología.* 2004. pp. 37–43.
58. Rodríguez-Guerra, R.; Acosta-Gallegos, J. A.; González-Chavira, M. M. y Simpson, J. Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol. 2006. *Agri. Téc. Méx.* 32:99-112.
59. Rodríguez-Guerra; Sánchez-García; Simpson Williamson. Patotipos de *Colletotrichum Lindemuthianum* en Oaxaca y San Luis Potosí, México, y Resistencia en Genotipos de Frijol. 2009. *Agricultura Técnica en México Vol. 35 Núm. p.* 49-60.
60. Ryder TB, Cramer CL, Bell JN, Robbins MP, Dixon RA, Lamb CJ. Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cells at the onset of the phytoalexin defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:5724–8.
61. Secretaría de Economía. Análisis de la Cadena de Valor del Frijol, Dirección General de Industrias Básicas. 2015. Pp. 1-39
62. Sonia Tarazona, Fernando García-Alcalde, Joaquín Dopazo, et al. Differential expression in RNA-seq: A matter of depth. *Genome Res.* 2011 21: 2213-2223.
63. Sonia Tarazona, Fernando Garcia-Alcalde. Differential expression in RNA-seq: A matter of depth. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2013.
64. Stange Claudia, E. Briceño, B.A. Latorre y Patricio Arce-Johnson. Fisiología Vegetal. Capítulo XIII. Interacción Planta Patógeno (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.). Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile 2007.
65. Vagner A. , Torres-Jerez , et al. A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* (2008) 55, 504–513
66. Vallejo, V., and J.D. Kelly. New insights into the anthracnose resistance of common bean landrace G 2333. *Open Horticulture Journal* 2009. 2: 29–33.
67. Voorrips, R.E.. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity* 2002 93(1): 77–78.



68. Whitehead IM, Dey MP, et al. Differential patterns of phytoalexin accumulation and enzyme induction in wounded and elicitor-treated tissues of *Phaseolus vulgaris*. *Planta* 1982; pp. 154: 156–64.
69. Yazawa T, Kawahigashi H, et al. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patogeno. Simultaneous Transcriptome Analysis of Sorghum and *Bipolaris sorghicola* by Using RNA-seq in Combination with De Novo Transcriptome Assembly. *PLoS ONE* 2013 8(4): e62460. doi:10.1371/journal.pone.0062460.
70. Young, N.D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 1996 34: 479–501.
71. Young, R.A., and J.D. Kelly. Gene pyramiding using marker assisted selection for stable resistance to bean anthracnose. *Ann. Rep. Bean Improv. 1996. Coop. 39: 57–58.*

