

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

TÍTULO DEL PROYECTO

“Análisis de la expresión del gen *PR-1*, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*”

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

FERNANDO XAVIER RIVAS ROMERO

SANGOLQUÍ, 04 DE OCTUBRE DE 2010

RESUMEN

La respuesta de las plantas frente a la presencia de patógenos, ya sean estos de tipo viral, bacteriano, fúngico, y en este caso antioomicótico con la infección de *Phytophthora infestans*, está enmarcada dentro del sistema SAR, donde los genes *PR* y especialmente los genes *PR-1* son sus máximos representantes. Los genes *PR-1* son los genes de mayor expresión dentro de la clasificación de estos genes, ya que las proteínas *PR-1* representan entre el 1 y el 2% de las proteínas totales de la hoja. Existen varias isoformas de las proteínas *PR-1* en donde la isoforma básica *PR-1b1* fue el objeto de nuestro estudio, debido a que es la isoforma de mayor expresión y la más estable en plantas. En este estudio, la expresión de la isoforma *PR-1b1* fue evaluada en plantas de tomate de las variedades “Indeterminada Alaska”, “Flora Dade”, “Santa Clara 5800” y “Cherry” infectadas con el patógeno *Phytophthora infestans*. Las plantas fueron inoculadas con una solución de 9000 esporangios por mL y las hojas se recolectaron en nitrógeno líquido a las 0, 24, 48 y 72 horas de incubación. Se extrajo el RNA total de las hojas de tomate y se eliminó el DNA contaminante con la enzima DNAsa. El RNA tratado se usó como molde para la síntesis de cDNA mediante la reacción de transcripción reversa (RT). El cDNA se usó como templado para la PCR en tiempo real. El análisis de expresión génica se implementó con los valores de Ct obtenidos de los genes *PR-1b1* y *GAPDH* aplicando el método de $\Delta\Delta Ct$. Al final del experimento, se pudo determinar que las variedades “Indeterminada Alaska” y “Flora Dade” presentaron los niveles más altos de expresión, seguidas por la variedad “Santa Clara 5800” y por último la variedad “Cherry”. Los resultados muestran las diferencias existentes entre las variedades evaluadas, lo que supone que las diferencias morfológicas y fisiológicas entre cada una de las variedades son la causa de la variación en la expresión. El programa de mejoramiento genético con los datos de la expresión génica del gen *PR-1b1* supone el primer paso para la obtención de variedades de alto valor comercial, con alto grado de tolerancia a la infección de *Phytophthora infestans*.

ABSTRACT

The response of plants against different types of pathogens such as virus, bacteria, fungi and, in this case, oomycete with simultaneous infection of *Phytophthora infestans* is framed into the SAR system which is mainly represented by the *PR* genes, specially the *PR-1* genes. The *PR-1* genes show maximum expression out of all the others, because the PR-1 protein represents 1-2% of the total leaf proteins. There are several isoforms of the PR-1 proteins whose basic isoform, PR-1b1, was the object of this study. This is because the PR-1b1 protein is the larger and most stable isoform expressed in plants. In this study, the expression of the *PR-1b1* isoform was evaluated in tomato plants from the cultivars “Indeterminada Alaska”, “Flora Dade”, “Santa Clara 5800” and “Cherry” infected with the pathogen *Phytophthora infestans*. The plants were inoculated with a solution of 9000 sporangia per mL and the leaves were collected in liquid nitrogen after 0, 24, 48 and 72 hours of incubation. The total RNA of the leaves was extracted and the contaminant DNA was eliminated with the DNase enzyme. The treated RNA was used as a template for the cDNA synthesis through the reverse transcription reaction (RT) and was subsequently used as a template for real-time PCR. The gene expression analysis was assembled with the Ct values obtained from reactions of the *PR-1b1* and *GAPDH* genes, applying the $\Delta\Delta C_t$ method. At the end of this experiment, it was determined that the cultivars “Indeterminada Alaska” and “Flora Dade” showed the highest expression levels, followed by the cultivar “Santa Clara 5800” and, coming in at last, the cultivar “Cherry”. The results show the differences that exist between the evaluated cultivars which also imply that the morphological and physiological differences play an important role in the variation of expression levels. The breeding program with the *PR-1b1* gene expression data constitutes the first step towards obtaining cultivars with high commercial value and high tolerance to the infection of *Phytophthora infestans*.

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Sr. Fernando Xavier Rivas Romero

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Ab. Vanessa Andrade

Lugar y fecha: _____

CERTIFICACION

Dra. Karina Proaño T.

Dra. Patricia Jiménez A.

Certifican:

Que el trabajo titulado “**Análisis de la expresión del gen *PR-1*, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*”**, realizado por **Fernando Xavier Rivas Romero**, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

Debido a la relevancia científica expuesta en el presente trabajo de tesis, se recomienda su publicación.

El mencionado trabajo consta de (un) documento empastado y (un) disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a **Fernando Xavier Rivas Romero** que lo entregue al **Ing. Rafael Vargas V.**, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, de del 2010

Dra. Karina Proaño T.

DIRECTORA

Dra. Patricia Jiménez A.

CODIRECTORA

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD

FERNANDO XAVIER RIVAS ROMERO

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “**Análisis de la expresión del gen *PR-1*, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*”**, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, de del 2010

Fernando Xavier Rivas Romero

AUTORIZACIÓN

Yo, Fernando Xavier Rivas Romero

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo: **“Análisis de la expresión del gen *PR-1*, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, de del 2010

Fernando Xavier Rivas Romero

DEDICATORIA

A mi Madre, por darme la vida, por cuidar mi vida y ser mi vida, porque eres mi mejor amiga y apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos, siempre con alegría, dureza, sensibilidad y con tu bendición eterna.....

“Te adoro mi viejita, esto es por ti y para ti..... Gracias”

Fernando (Fer 10)

AGRADECIMIENTO

A mi familia: Papito Jorge, mi tío Tico, mi tío Eduardo, mi tío Paco, que han sido como padres para mí, con su aliento y apoyo incondicional durante el transcurso de toda mi vida.

A las Dras. Karina Proaño y Patricia Jiménez, por darme la oportunidad de hacer mi tesis bajo su dirección y codirección respectivamente, además de prestarme su apoyo, no solo como profesoras, sino como buenas amigas.

Al Dr. Antonio León y al Ing. Pedro Romero, por la asesoría brindada al proyecto, sin la cual no hubiera sido posible el desarrollo de la presente.

Al Centro Internacional de la Papa (CIP) a través del Sr. Marcelo Vinueza y las Srtas. Carolina Mogrovejo y Gabriela Orquera por el gran apoyo brindado en el desarrollo de este proyecto.

A la M.Sc Alma Koch, por abrirme el mundo hacia la ciencia con sus enseñanzas, su rigidez, pero sobre todo, con su amistad, calidez y don de gentes.

A mis profesores de la carrera, en especial a la M.Sc Mónica Jadán, Dr. Marcelo Grijalva, Ing. Betsabé Maldonado, Ing. Rafael Vargas, Ing. Tatiana Páez, M.Sc Claudia Segovia y la Sra. Geomar Zumárraga, por sus enseñanzas durante mi vida académica y por la amistad sincera brindada fuera de las aulas de clase.

A mis compañeros de clase, con los cuales pasé cinco años de amistad, compañerismo, apoyo mutuo y diversión siempre en las buenas y en las malas.

A mis compañeros de laboratorio: Pauli, Santiago, Valeria, Naty, Joha, Alexita, Carito P, Gaby G, Gaby Z, Cris A, Karlita, Ely y Sas, por enseñarme el valor de la amistad sincera, de la comprensión, y del trabajo verdaderamente duro.

Al Sr. César Salvador, por el apoyo incondicional brindado hacia mi en todos los proyectos que he emprendido.

A mi madre y a mi hermano, por demostrarme que la felicidad no es completa sin una familia feliz y siempre unida.

A Dios, por darme la capacidad de dudar de lo que me rodea, y brindarme la sabiduría necesaria para resolver esas dudas para bien de la humanidad

CONTENIDO

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	2
1.3 Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1 Objetivo General	3
1.3.2 Objetivos Específicos	4
1.4 Marco teórico.....	4
1.4.1 El tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	4
1.4.1.1 Generalidades.....	4
1.4.1.2 Botánica de la planta.....	5
1.4.1.3 Enfermedades y plagas que afectan al tomate	8
1.4.2 El Género <i>Phytophthora</i>	9
1.4.2.1 <i>Phytophthora infestans</i>	9
1.4.2.2 Morfología del patógeno.....	10
1.4.2.3 Mecanismo de Infección.....	12
1.4.2.4 Enfermedad del tizón tardío del tomate.....	15
1.4.3 Los genes <i>PR</i>	19
1.4.3.1 Características Generales	19
1.4.3.2 El gen <i>PR-1b1</i>	20
1.4.3.3 Sistema de regulación de los genes <i>PR-1</i>	24
1.4.4 Técnicas Moleculares para el análisis de expresión génica	26
1.4.4.1 Extracción y cuantificación del RNA	26
1.4.4.2 Tratamiento con la enzima DNAsa.....	27
1.4.4.3 Síntesis de cDNA (Transcripción reversa)	28
1.4.4.4 PCR en tiempo real	29
1.4.5 Expresión génica	33
1.4.5.1 Expresión génica absoluta	34
1.4.5.2 Expresión génica relativa.....	34
1.4.5.3 Método del ddCt (Livak, Schmittgen, 2001)	35
1.4.6 Análisis Estadístico	38
1.4.6.1 Análisis de Varianza (ANOVA) de un diseño factorial	38

1.4.6.2	Pruebas de rango múltiple.....	39
1.5	Sistema de hipótesis.....	40
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....		41
2.1	Material vegetal	41
2.2	Inoculación de las plantas de tomate con esporangios de <i>P. infestans</i> y recolección de muestras	42
2.3	Extracción y cuantificación de RNA	44
2.3.1	Extracción de RNA total mediante el kit <i>PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System</i> (INVITROGEN, 2010)	44
2.3.2	Cuantificación de RNA mediante el uso del Fluorómetro <i>Qubit®</i> y el kit <i>Quant-it™ RNA Assay</i> (INVITROGEN, 2010a)	45
2.4	Tratamiento del RNA con la enzima <i>DNase I Amplification grade</i> (INVITROGEN, 2010b modificado).....	46
2.5	Síntesis de cDNA (Transcripción reversa) mediante el uso de la <i>Superscript® III Reverse Transcriptase</i> (INVITROGEN, 2010c modificado)	46
2.6	Diseño de Primers	47
2.7	PCR en tiempo real	48
2.7.1	Estandarización de las condiciones de reacción de PCR en tiempo real.....	49
2.7.1.1	Temperatura de Annealing.....	49
2.7.1.2	Concentración de Primers	50
2.7.2	Ensayos de PCR en tiempo real de las variedades de tomate infectadas con <i>P. infestans</i>	51
2.8	Análisis de la expresión del gen <i>PR-1b1</i>	52
2.9	Análisis Estadístico.....	52
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....		54
3.1	Extracción y cuantificación de RNA total de hojas de tomate	54
3.2	Síntesis de cDNA a partir del RNA extraído.....	56
3.3	Diseño de Primers	57
3.4	Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para la amplificación de los fragmentos de los genes <i>GAPDH</i> y <i>PR-1b1</i>	59
3.4.1	Temperatura de annealing	59
3.4.2	Concentración de primers.....	61
3.4.3	Análisis de disociación	63
3.4.4	Control negativo	65

3.5	Ensayos de PCR en tiempo real de las variedades de tomate infectadas con <i>P. infestans</i>	65
3.6	Cálculo de la expresión del gen <i>PR-1b1</i> de las muestras de tomate inoculadas con el patógeno <i>P. infestans</i> , mediante el método de ddCt	69
3.7	Análisis Estadístico.....	71
3.7.1	Análisis de varianza (ANOVA).....	71
3.7.2	Pruebas de rango múltiple	72
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN		75
4.1	Extracción y purificación de RNA.....	75
4.2	Estandarización de la PCR en tiempo real.....	76
4.3	Análisis de la expresión génica relativa del gen <i>PR-1b1</i> de las variedades inoculadas con <i>P. infestans</i>	78
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES		83
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES		86
BIBLIOGRAFIA		87
ANEXOS		99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Fotografía de una planta de tomate	6
Figura 1.2. Fotografía de una flor de tomate	7
Figura 1.3. Fotografía del micelio de <i>P. infestans</i>	11
Figura 1.4. Esporangioforo de <i>P. infestans</i> con su esporangio	11
Figura 1.5. Esporagios de <i>P. infestans</i>	12
Figura 1.6. Esquema de la infección temprana de <i>P. infestans</i> en plantas susceptibles y resistentes	13
Figura 1.7. Esquema de la infección masiva de <i>P. infestans</i> en el huésped	13
Figura 1.8. Planta de tomate afectada por <i>P. infestans</i>	16
Figura 1.9. Ciclo de reproducción de <i>P. infestans</i> en la naturaleza	17
Figura 1.10. Fotografía de <i>Solanum demissum</i>	19
Figura 1.11. Esquema de la estructura tridimensional de la proteína PR-1b de tomate	22
Figura 1.12. Estructura tridimensional de la GliPR humana y la Pathogenesis related 1a (PR-1a)	23
Figura 1.13. Esquema de la señalización que se produce en el ataque de patógenos y de insectos	25
Figura 1.14. Curva de calibración de RNA	26
Figura 1.15 Síntesis de cDNA mediante la adición del oligo (dT)	28
Figura 1.16. Curva de PCR en tiempo real, donde se detallan sus componentes	31
Figura 1.17. Esquema de las técnicas más utilizadas en PCR en tiempo Real	32
Figura 1.18. Análisis de disociación de una PCR en tiempo real usando SYBR Green I	33
Figura 2.1. Multipots con semillas de tomate colocadas en cajas invernadero en los Laboratorios de Biotecnología de la ESPE, Sangolquí	42
Figura 2.2. Caja Petri con inóculo de <i>P. infestans</i> cepa 3381	43
Figura 3.1. Gel de Agarosa al 2% del RNA de las variedades de tomate en cada uno de sus tratamientos	54
Figura 3.2. Gel de agarosa al 2% de 2,5 µg de RNA tratado con la enzima DNAsa I	56

Figura 3.3 Datos de la selección de primers del software PRIMER 3	58
Figura 3.4. Curvas de amplificación de PCR en tiempo real: temperaturas	60
Figura 3.5. Curvas de amplificación de PCR en tiempo real: primers	62
Figura 3.6. Análisis de disociación del fragmento de amplificación del gen <i>GAPDH</i> y el gen <i>PR-1b1</i>	64
Figura 3.7. Gel de agarosa al 2% de los productos de la PCR en tiempo real	64
Figura 3.8. Curvas de amplificación de los controles negativos de <i>GAPDH</i> y <i>PR-1b1</i>	65
Figura 3.9. Curvas de PCR en tiempo real de las muestras de cDNA de la variedad “Indeterminada Alaska” (In A)	67
Figura 3.10. Curvas de PCR en tiempo real de las muestras de cDNA de la variedad “Flora Dade” (FD)	67
Figura 3.11. Curvas de PCR en tiempo real de las muestras de cDNA de la variedad “Santa Clara 5800” (SC5800).	68
Figura 3.12. Curvas de PCR en tiempo real de las muestras de cDNA de la variedad “Cherry” (Ch).	69
Figura 3.13. Diagrama de Barras de la expresión génica relativa de todas las variedades evaluadas	70
Figura 3.14. Gráfico de perfil de las variedades y tiempos de incubación evaluados	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica del tomate	5
Tabla 1.2. Clasificación taxonómica de <i>Phytophthora infestans</i>	10
Tabla 2.1. Descripción de las variedades de tomate utilizadas en el estudio	41
Tabla 2.2. Secuencias halladas de los genes para el estudio	47
Tabla 2.3. Características básicas a tener en cuenta para el diseño de los primers	48
Tabla 2.4. Condiciones de PCR para la estandarización de la PCR en tiempo Real	50
Tabla 2.5 Volúmenes de cada componente de la reacción de PCR en tiempo Real	51
Tabla 3.1. Valores de cuantificación de RNA obtenidos por el fluorómetro	55
Tabla 3.2. Volúmenes de muestra y reactivos para el tratamiento de DNAsa I	57
Tabla 3.3. Características de los primers diseñados	58
Tabla 3.4. Programa final para la PCR en tiempo real	61
Tabla 3.5 Condiciones finales de reacción de PCR en tiempo real	63
Tabla 3.6. Valores de <i>fd</i> y volúmenes de las muestras de cDNA.	66
Tabla 3.7. Análisis de Varianza ANOVA de los tratamientos	71
Tabla 3.8. Subconjuntos de confianza generados por las pruebas de rango múltiple para el parámetro “Variedad”	73
Tabla 3.9. Subconjuntos de confianza generados por las pruebas de rango múltiple para el parámetro “Tiempo de incubación”	74

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Receta de la Solución Nutritiva Hoagland	99
ANEXO B. Secuencia del gen <i>GAPDH</i>	100
ANEXO C. Secuencia del gen <i>PR-1b1</i>	101

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más ampliamente cultivadas a nivel mundial, representa un alto porcentaje de las plantas comerciales cultivadas en nuestro país. El cultivo de tomate tiene una gran acogida entre los consumidores aunque su producción se ve afectada por una gran cantidad de plagas, entre las que se incluyen bacterias, virus, hongos e insectos.

El cultivo de esta hortaliza ha tenido un creciente desarrollo en los últimos años, aunque se ha visto mermado en un considerable porcentaje por la falta de programas adecuados de sanidad agrícola y control de plagas. El control de enfermedades básicamente se lo realiza con la aplicación de agroquímicos que, si bien brindan un control efectivo también afectan a la salud de los consumidores, contribuyendo así a la contaminación de los terrenos de cultivo y al medio ambiente en general.

Existen algunos mecanismos en las plantas para evitar la infección de las plagas. Estos sistemas de infección son los denominados activos y pasivos. Los sistemas pasivos se identifican porque la planta acumula sustancias tóxicas para protegerse del ataque de patógenos (Zhang, *et al.*, 2004). Los sistemas activos se caracterizan por presentar una serie de eventos bioquímicos que activan y desactivan genes desencadenando la expresión de los mismos, los cuales se denominan genes de defensa (van Ooijen, *et al.*, 2007).

Dentro de los sistemas activos se encuentra los denominados genes *PR*. Se afirma, por ejemplo que las proteínas *PR* ofrecen una resistencia contra el oomicete *Phytophthora infestans* en tabaco al provocar la desintegración de su pared celular evitando así su desarrollo (Woloshuk, *et al.*, 1991).

Estos genes *PR* se expresan de igual manera tanto en plantas resistentes como en susceptibles, constituyendo una barrera natural inicial para evitar la proliferación del

patógeno (Edreva, 2005). Por lo que es de suma importancia estudiar la regulación y expresión de estos genes de defensa, puesto que muchas de las características deseadas comercialmente se encuentran en plantas susceptibles, por ende las más afectadas.

1.2 Justificación del problema

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es uno de los productos más importantes cultivados en el Ecuador. A pesar de la expansión que ha tenido este producto en el país y a la tecnificación de su cultivo, esta planta sigue siendo atacada por una gran variedad de patógenos, entre ellos *Phytophthora infestans*, un oomicete que produce el llamado Tizón tardío del tomate. Este patógeno acaba con gran parte de la producción de esta hortaliza, provocando pérdidas a los agricultores y escasez en el mercado.

Para combatir enfermedades como el Tizón tardío, es necesario generar tecnologías viables que permitan minimizar el problema de una manera eficaz. Es importante que estas tecnologías sean económicamente viables, para que el costo de su desarrollo no altere el precio final del producto. Estas tecnologías además deben ser seguras para que no afecten a la salud de los productores y consumidores y que no generen impacto sobre el medio ambiente.

Es por ello, que la investigación biotecnológica en el campo de la biología molecular e ingeniería genética ha incursionado en el estudio de las técnicas para el análisis de expresión génica. Estas técnicas consisten en determinar los niveles basales de mRNA de cualquier gen o familia génica para cuantificar la cantidad de proteína que se produce (Gachon, *et al.*, 2004) en función del mRNA presente. El conocimiento de estos niveles de expresión es de gran interés, pues son útiles para deducir los procesos fisiológicos que involucran a las células y determinar su normal funcionamiento (Gachon, *et al.*, 2004).

Conociendo el patrón de expresión génica, basado en la cantidad de transcrito detectado, podemos determinar si el comportamiento de la planta estudiada (en este caso el tomate), es influenciado por un factor biótico o abiótico (en esta caso biótico) y de qué manera este afecta al desarrollo de planta, en consecuencia, a la producción.

Es así, que las proteínas PR (*Pathogenic-Related*) se sobreexpresan en las plantas en caso de infección patogénica (Kauffman, *et al.*, 1987; Legrand, *et al.*, 1987; Woloshuk, *et al.*, 1991; Alexander, *et al.*, 1993; Niderman, *et al.*, 1995; Edreva, 2005). Esta sobreexpresión es desencadenada por la acumulación del Ácido Salicílico mediante el llamado SAR (*Systemic Acquired Resistance*) (Ryals, *et al.*, 1995; Ryals, *et al.*, 1996).

Uno de los grupos de proteínas PR más importantes es el grupo de las PR-1, las cuales constituyen aproximadamente el 2% de las proteínas totales de la hoja. Sin embargo, estas proteínas son interesantes desde el punto de vista bioquímico, ya que su función es aún desconocida (Edreva, 2005). Estudios previos sobre estas proteínas han reportado actividad antifúngica e inhibitoria contra *Phytophthora infestans* (Niderman, *et al.*, 1995), lo cual puede ser de importancia para estudios de resistencia.

El control de plagas en el cultivo de tomate es un aspecto muy importante a tener en cuenta, pues el uso indiscriminado de plaguicidas en la agricultura es perjudicial, tanto para los agricultores como para los consumidores. Es así que, el correcto uso de estos agentes químicos en adición a la respuesta defensiva natural de las plantas puede generar una producción más limpia. El conocimiento de este tipo de regulación hace posible el desarrollo de programas de mejoramiento genético, promoviendo el cruzamiento de las variedades con mejor respuesta a este tipo de estrés con variedades que presenten otro tipo de características económicamente aprovechables.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Analizar la expresión del gen *PR-1*, mediante la técnica de PCR en tiempo real, en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) infectada con *Phytophthora infestans*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- a. Estandarizar la técnica de extracción de RNA a partir de hojas.
- b. Estandarizar y optimizar la técnica de RT (*Reverse Transcription*)
- c. Estandarizar y optimizar la técnica de análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real.
- d. Analizar la expresión del gen *PR-1* en variedades comerciales de tomate mediante PCR en tiempo real.

1.4 Marco teórico

1.4.1 El tomate (*Solanum lycopersicum*)

1.4.1.1 Generalidades

El tomate (*Solanum lycopersicum*), es un cultivo solanáceo de gran importancia en nuestro país, ya que es consumido por casi todas las personas en sus diferentes formas debido a las propiedades alimenticias y antioxidantes que presentan. En nuestro país en el año 2006, se reportaron 4169 Ha, con una producción de 87525 TM del producto (SICA, 2006). En el 2008, la superficie mundial cultivada ascendió a las 5227883 Ha con una producción de 129649883 de TM (FAO, 2008) haciendo de este uno de los cultivos masivos más importantes a nivel mundial.

El tomate es especialmente importante para la región andina, pues se conoce que es originario de los Andes, específicamente de Colombia, Perú, Chile, Ecuador y Bolivia (Arie, *et al.*, 2007; Nuez, 2001) en donde se encuentran todavía varias especies silvestres. Aunque no se conoce con exactitud el origen del tomate común cultivado, se cree que tuvo su origen en Perú y Ecuador, pero se sabe que el primer cruzamiento de tomate se lo realizó en México hace más de 1000 años, donde era conocido como *tomatl* (Nuez, 2001; Rodríguez, *et al.*, 2001) terminando aproximadamente en el siglo XV, donde los españoles lo llevaron a Europa (Arie, *et al.*, 2007).

En Europa, el tomate fue inicialmente empleado como planta ornamental, ya que la familia Solanaceae es reconocida por ser rica en alcaloides con fuertes efectos

somníferos, hemolíticos o paralizantes, y en altas dosis mortales. Esta creencia se mantuvo firme hasta inicios del siglo XX en países como Alemania. Es por ello, que la distribución del tomate como una planta alimenticia fue muy desigual en los países europeos, siendo los primeros en admitirla como alimento España e Italia prácticamente desde su introducción (Nuez, 2001; Rodríguez, *et al.*, 2001). El alcaloide que causa esta toxicidad en el tomate es la tomatina, la cual se encuentra en las hojas y frutos verdes, pero se degrada en el momento de su maduración (Rodríguez, *et al.*, 2001).

1.4.1.2 Botánica de la planta

Taxonómicamente el tomate esta descrito de la siguiente manera (tabla 1.1):

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica del tomate (Fuente: NCBI: *Taxonomy ID*: 4081)

TAXON	NOMBRE
Súper-Reino	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Viridiplantae</i>
Phylum	<i>Streptophyta</i>
Subclase	<i>Asterids</i>
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	<i>Solanaceae</i>
Subfamilia	<i>Solanoideae</i>
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Lycopersicum</i>

El tomate es una planta potencialmente perenne y muy susceptible a las heladas. El sistema radicular del tomate consiste en una raíz principal pivotante, la cual crece alrededor de 3 cm por día hasta alcanzar los 60 cm de profundidad, al mismo tiempo crecen simultáneamente raíces adventicias que forman una red densa ocupando un volumen determinado en el suelo (Rodríguez, *et al.*, 2001).

El tallo de la planta de tomate es herbáceo y recto (Fig. 1.1), durante los primeros días de desarrollo, para luego doblarse, por consecuencia del peso de la planta,

por lo que se necesita de estacas para su apoyo. Este puede llegar a medir hasta 2,5 m y este tiene pelos agudos y glándulas que le dan a la planta su olor característico (Rodríguez, *et al.*, 2001).



Figura 1.1. Fotografía de una planta de tomate (*Solanum lycopersicum*), Fuente: Solanaceae Source, 2010.

Las hojas son compuestas y alternadas, el limbo esta seccionado en 7, 9 hasta 11 foliolos y al igual que el tallo, las hojas tienen las mismas glándulas de secreción de olor (Rodríguez, *et al.*, 2001).

Las flores se presentan formando inflorescencias, las cuales pueden ser simples, cima unípara, cima bípara y cima múltipara, pudiendo tener hasta 50 flores por inflorescencia. El tipo simple se encuentra más comúnmente en la parte baja de la planta, siendo los otros tipos más abundantes en las partes altas de la planta (Rodríguez, *et al.*, 2001).

Las flores son radiales y tienen 5 estambres. Presenta ovario súpero, bicarpelar y contiene varios primordios seminales. Los carpelos se presentan en posición oblícua con respecto al plano de la flor (Nuez, 2001). Está formada por un pedúnculo corto, el cáliz es gamosépalo y la corola gamopétala con los estambres adheridos a la corola con las anteras que forman un tubo (Fig. 1.2). El gineceo presenta de dos a treinta carpelos, que al desarrollarse darán forma a los lóbulos del fruto (Rodríguez, *et al.*, 2001). La estructura floral modelo es $K(5) [C(5) A(5)] G2$ (Nuez, 2001).



Figura 1.2. Fotografía de una flor de tomate (*Solanum lycopersicum*). Fuente: Solanaceae Source, 2010.

Antiguamente, el género *Lycopersicum* (Nombre antiguo del género del tomate) se caracterizaba por sus estambres únicos, con conectivos alargados, a diferencia de los otros géneros de la familia (Nuez, 2001).

Cuando las inflorescencias se producen alternando con cada hoja o dos hojas, la planta es de crecimiento “determinado”. Si la alternancia de las inflorescencias es más espaciada, se dice que la planta es “indeterminada” (Rodríguez, *et al.*, 2001).

El fruto es una baya de color amarillo, rosado o rojo por la presencia de licopeno y carotenoides. Su forma va desde la redondeada, pasando por achatada, en forma de pera, alargada y de tamaño variable, según la variedad. En un corte transversal, se puede observar la piel, la pulpa firme, el tejido placentario y la pulpa gelatinosa que envuelve las semillas (Rodríguez, *et al.*, 2001).

Las semillas son grisáceas, tienen forma oval y su superficie está cubierta de vellosidades y restos de tegumento. Miden de 3 a 5 mm de diámetro y en un gramo de semillas puede haber de 300 a 350 semillas. La semilla conserva su poder germinativo durante cuatro años o más si se la mantiene en condiciones adecuadas. La temperatura óptima para la germinación se da entre los 35°C y 10°C (Rodríguez, *et al.*, 2001).

Al germinar, la radícula se alarga, penetrando en el suelo, mientras que el tallito sale a la superficie, al tiempo que los cotiledones alimentan al embrión en formación para posteriormente secarse (Rodríguez, *et al.*, 2001).

Todos los miembros de la especie tienen el mismo número de cromosomas básico ($x=12$) aunque se presentan en la naturaleza de manera diploide ($2n=2x=24$) (Rodríguez, *et al.*, 2001).

1.4.1.3 Enfermedades y plagas que afectan al tomate

El tomate, al ser un cultivo extendido masivamente, es afectado por un número considerable de patógenos y de diversos tipos, sean estos hongos, oomicetes, bacterias, virus y viroides, además de varios insectos y nemátodos. Entre los hongos que afectan a los cultivares de tomate son *Alternaria alternata* (Tizón temprano), *Botrytis cinerea* (Podredumbre gris), *Cladosporium fulvum* (Cladosporiasis del tomate), *Fusarium oxysporum* (Marchitez vascular), entre otros (Arie, *et al.*, 2007).

Entre las bacterias que afectan al tomate tenemos *Pseudomonas solanacearum* (Marchitez), *Clavibacter michiganensis* (Cancro bacteriano del tomate) (Arie, *et al.*, 2007) (Zárate, 2008). Los virus más conocidos que afectan al tomate son el virus del mosaico del tomate (ToMV o *Tomato mosaic virus*), el virus Y de la patata (PYV o *potato Y virus*), el virus del mosaico del pepino (CMV o *Cucumber mosaic virus*), el virus del bronceado del tomate (TSWV o *Tomato spotted wilt virus*) y finalmente el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV o *Tomato yellow leaf curl virus*) (Arie, *et al.*, 2007) (Sandoval, 2007).

Los insectos que más daño causan a los cultivos de tomate son el trips occidental (*Frankiniella occidentalis*), que actúa como el vector transmisor del virus del bronceado del tomate (TSWV) y la mosca blanca (*Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum*) que actúan como vectores transmisores del virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) (Sandoval, 2007).

Finalmente, el único oomicete que produce patología en los cultivos de tomate es *Phytophthora infestans* que produce el denominado tizón tardío o mildiu del tomate (Erwin & Ribeiro, 1996; Rodríguez, *et al.*, 2001; Arie, *et al.*, 2007).

1.4.2 El Género *Phytophthora*

El género *Phytophthora* es un género de organismos fungoides de la clase Oomycetes, el cual pertenece al Reino Protista conocido por ser el género de patógenos más devastadores para las plantas dicotiledóneas. El género *Phytophthora* causa grandes daños a especies de interés comercial como papa, tomate, alfalfa, pimientos y soya. Así mismo, causa daños a especies silvestres en el medio ambiente (Kamoun, 2003).

El género *Phytophthora* está cercanamente relacionado al género *Phytium*, además que ambos géneros están incluidos en la familia Phytiaceae (Erwin & Ribeiro, 1996).

Los oomycetes del género *Phytophthora* tienen un número considerable de características biológicas que los diferencian de otros microorganismos eucarióticos. Por ejemplo, poseen paredes celulares con β -1,3 Glucanos, que constituyen polímeros de celulosa, a diferencia de los hongos, que presentan quitina en la estructura de su pared celular (Erwin & Ribeiro, 1996; Kamoun, 2003).

Dentro de los oomycetes, el miembro más perjudicial a nivel mundial es *Phytophthora infestans*, el cual produce el tizón tardío en papa y tomate.

1.4.2.1 *Phytophthora infestans*

Phytophthora infestans, es una especie perteneciente al orden de los Oomycetes, que produce el llamado tizón tardío en la papa y tomate. Es la enfermedad más devastadora a nivel agronómico del mundo. Para el año 2009, el Centro Internacional de la Papa (CIP) estima que la pérdida anual producida por este patógeno es de 2,75 billones de dólares en los países desarrollados (Salazar, *et al.*, 2009).

Su clasificación taxonómica se detalla en la tabla 1.2:

Tabla 1.2. Clasificación taxonómica de *Phytophthora infestans* (Fuente: NCBI: Taxonomy ID: 4787)

TAXON	NOMBRE
Súper-Reino	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Protista</i>
Phylum	<i>Stramenopiles</i>
Clase	<i>Oomycetes</i>
Orden	<i>Peronosporales</i>
Familia	<i>Phytiaceae</i>
Género	<i>Phytophthora</i>
Especie	<i>Infestans</i>

1.4.2.2 Morfología del patógeno

Las características morfológicas de *P. infestans* son compartidas por muchos de los miembros de la familia *Phytophthora*, sin embargo, existen pequeñas diferencias que lo hacen distinguible de los demás miembros de la familia.

El micelio de *Phytophthora infestans* está compuesto por filamentos hialinos, ramificados y coenocíticos (No septados), a excepción de cultivos demasiado viejos, en donde ocasionalmente pueden aparecer septado. Esta es una de las características más importantes, puesto que es una de las diferencias con los hongos propiamente dichos. El diámetro del micelio está entre los 5 y 8 μm y este puede ser variable y dependiente de la composición física y química del medio en donde se desarrolla (Fig. 1.3) (Erwin & Ribeiro, 1996; Kamoun, 2003).

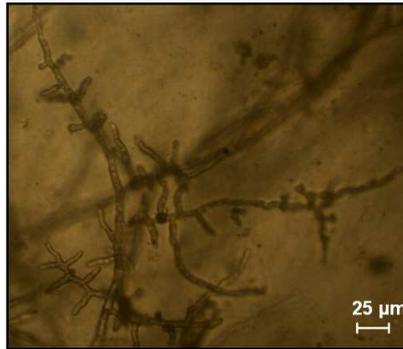


Figura 1.3. Fotografía del micelio de *P. infestans* (Rivas, 2010).

Las especies de la familia desarrollan estructuras asexuales para la reproducción rápida denominadas esporangios. Algunas especies desarrollan esporangios naturalmente en medios de agar, pero otras necesitan un período subsecuente de incubación en medio líquido. Los esporangios son producidos en segmentos del micelio especiales denominados esporangióforos (Fig. 1.4), los cuales se diferencian ligeramente o no, de las hifas vegetativas. En algunas especies de la familia, los esporangióforos nacen de la base de un esporangio previo (denominado *simpodial*) y produce un nuevo esporangio (denominado *simpodio simple*). En el caso de *P. infestans*, los esporangióforos nacen de una ramificación hifal (lo que se conoce como *simpodio compuesto*) (Erwin & Ribeiro, 1996).



Figura 1.4. Esporangioforo de *P. infestans* con su esporangio (Rivas, 2010).

Los esporangios una vez liberados presentan varias formas, dependiendo de la especie a la que pertenezcan. En el caso de *P. infestans*, los esporangios tienen una

forma limoniforme (forma de limón) (Fig. 1.5). En otros casos, dependiendo de las condiciones del medio, pueden variar su forma (Erwin & Ribeiro, 1996).

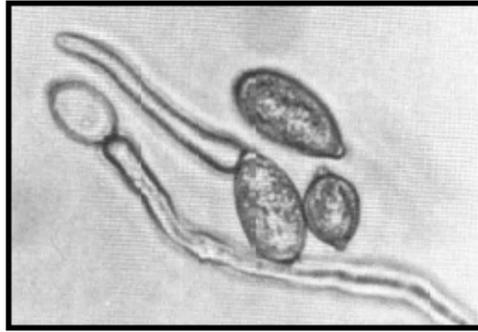


Figura 1.5. Esporangios de *P. infestans*. Fuente: Woloshuk, *et al.*, 1991.

Dentro de los esporangios se desarrollan zoosporas asexuales, las cuales son biflageladas y tienen forma piriforme (forma de pera), y presentan dos flagelos para su locomoción (Erwin & Ribeiro, 1996).

1.4.2.3 Mecanismo de Infección

Existen muchos procesos celulares durante la infección de los oomycetes a las plantas, como por ejemplo la penetración al huésped y la colonización del tejido.

Las especies de oomycetes manipulan muchos procesos fisiológicos y bioquímicos mediante el empleo de moléculas conocidas como efectores. Estas moléculas en diferentes combinaciones facilitan la infección en el huésped. En las plantas susceptibles, las moléculas efectoras promueven la infección suprimiendo las respuestas de defensa, facilitando de esta manera la penetración del patógeno, además de inducir los síntomas de la enfermedad. En cambio, en las plantas resistentes, las moléculas efectoras son reconocidas por las moléculas de defensa de las plantas, lo que resulta en la muerte celular programada por parte del huésped (Fig. 1.6) y desencadenando lo que se conoce como respuesta hipersensitiva (*Hypersensitive response* o HR) (Kamoun, 2003).

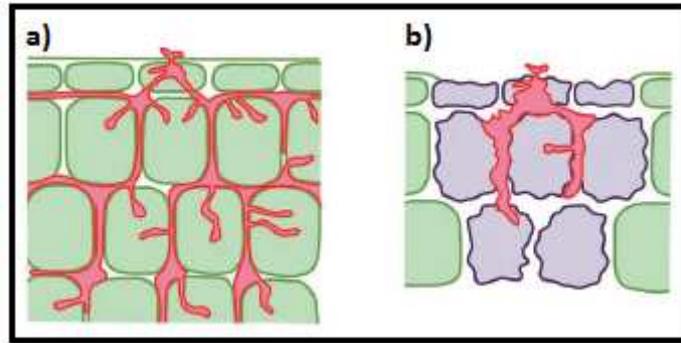


Figura 1.6. Esquema de la infección temprana de *P. infestans* en plantas susceptibles y resistentes: **a)** En plantas susceptibles (No hay respuesta) la colonización por parte del patógeno es total; **b)** en plantas resistentes (existe muerte celular programada en la zona del ataque). Fuente Kamoun, 2001.

En el caso de *Phytophthora*, la infección comienza normalmente cuando las zoosporas se han liberado del esporangio y se han establecido en el tejido del hospedero. Esta zoospora se enquista y germina (Kamoun, *et al.*, 1999; Kamoun, 2003). El momento que ocurre esto, se genera en la zoospora una estructura a manera de un tubo de germinación conocida como apresoria (más técnicamente como “*appressorium like*” o “similar a la apresoria”, puesto que esta es una estructura característica en los hongos) que facilita la adhesión y colonización del patógeno en la superficie de la planta (Fig. 1.7) (Kamoun, 2003; Judelson & Blanco, 2005).

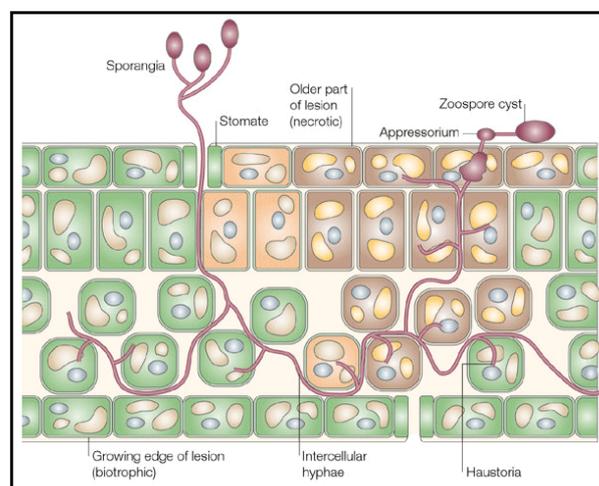


Figura 1.7. Esquema de la infección masiva de *P. infestans* en el huésped. Fuente: Hudelson & Blanco, 2005.

Poco es conocido del mecanismo de desarrollo de la apresoria. Hardam en 2001 propuso que esto puede deberse a la dificultad que presenta la zoospora en penetrar las superficies vegetales en sus intentos por germinar (Hardam, 2001). Recientemente se ha descubierto una pequeña familia génica, *Car*, la cual codifica una proteína del tipo mucina, extracelular y que es expresada cuando la zoospora ha germinado recientemente. Se ha dicho que esta proteína pueda tener una función de adhesión de la zoospora al tejido y el posterior desarrollo de la apresoria (Kamoun, 2003).

La penetración del patógeno en el sistema celular y la posterior colonización implica la expresión de varias enzimas degradantes para vencer las barreras físicas de la planta para la infección. Se han identificado ESTs con alta similaridad a enzimas del tipo proteasas, endo y exo glucanasas y cutinasas. En *Phytophthora* se han caracterizado en detalle unos pocos genes que codifican enzimas con actividad degradante como son fosfolipasas, β -glicosidasas/ β -xilanasas, exo y endo β -1-3 glucanasas, y endopoligalacturonasas (endo-PGs) (Kamoun, 2003).

Análisis filogenéticos han demostrado que las endo-PGs de *Phytophthora* tienen mayor similaridad con las PGs de los hongos, que sus similares de plantas y bacterias. Esta similaridad filogenética con los hongos además ha sido observada en las endo y exo β 1-3 glucanasas de *P. infestans* (Kamoun, 2003; McLeod, *et al.*, 2003).

La supresión de las defensas del hospedero ocurre a través de la producción de proteínas inhibitorias que tienen como objetivo las enzimas del hospedero. Estas proteínas, denominadas “Proteínas inhibitorias de la glucanasa” (GIPs, por *Glucanase inhibitor proteins*). Las GIPs son concebidas como moléculas con función defensiva, puesto que inhiben las enzimas β -1,3 y β -1,6 glucanasas del hospedero que degradan su pared celular (Kamoun, 2003).

Una vez que el patógeno ha penetrado las barreras primarias de las células, se activa la respuesta de defensa de las plantas. Muchas moléculas efectoras en *Phytophthora* actúan como inductores de la respuesta en las plantas. Algunos de estos efectores inducen la respuesta, tanto en plantas susceptibles como en resistentes. Estas moléculas son conocidas como elicitores generales. Estos elicitores generales han sido caracterizados como “Patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs o

Pathogen-associated molecular patterns), los cuales son moléculas derivadas de la superficie celular que inducen la expresión de genes de respuesta defensiva, con la subsecuente producción de sustancias antimicrobianas por parte de la célula huésped, siendo una de ellas las proteínas PR (Kamoun, 2003; Nurnbeger & Brunner, 2002).

Otras moléculas efectoras inducen la respuesta de defensa específicamente en plantas resistentes. Estas moléculas son conocidas como elicitores específicos. *P. infestans* produce algunos de estos elicitores específicos. Un tipo de estos son proteínas extracelulares de aproximadamente 10 kDa de peso, conocidas como elicinas que induce la HR en plantas de tabaco, pero no en plantas de tomate y papa (Kamoun, *et al.*, 1998; Kamoun, 2003).

Esta y otras características hacen de los oomycetes y, específicamente el género *Phytophthora* sean los únicos con este mecanismo de patogenicidad, puesto que con el mismo abarcan un amplio espectro de hospederos, que van desde plantas hasta animales. Sin embargo, aún quedan preguntas por responder en el conocimiento de los mecanismos de infección de estos microorganismos (Kamoun, 2003).

1.4.2.4 Enfermedad del tizón tardío del tomate

El tizón tardío del tomate o mildiu es una enfermedad grave producida por el oomicete *Phytophthora infestans*.

La enfermedad se caracteriza por la presencia de manchas grandes de color negro y aspecto grasiento en las hojas, las cuales van secando progresivamente desde la zona central. En el haz de las hojas, se encuentran de una a dos manchas por cada foliolo y en el envés se encuentran fructificaciones de tipo fúngica en forma de vellocidades blanquecinas. En los pecíolos de las hojas aparecen manchas grandes que se vuelven quebradizas, específicamente en las zonas afectadas. En los frutos, las manchas del patógeno son grandes de color grisáceo y de textura lisa, la cual a medida del avance de la infección, se tornan de color marrón y de aspecto rugoso (Fig. 1.8) (Rodríguez, *et al.*, 2001).



Figura 1.8. Planta de tomate afectada por *P. infestans*. Fuente: Oregon State University, 2010.

El patógeno sobrevive de una estación a otra en forma de un micelio sobre los tubérculos de papa enfermos y las zoosporas producidas son llevadas de una planta a otra por medio del viento y la lluvia. La infección primaria del patógeno en tomate no está claramente definida, pero se puede decir que probablemente viene de los restos vegetales de enfermedades anteriores o de cultivos de papas relativamente cercanos (Rodríguez, *et al.*, 2001).

El ciclo de vida de *Phytophthora infestans* se alterna en dos estadios: el asexual y el sexual, dándose esta última solamente cuando se encuentran juntos los dos tipos A1 y A2. La Fig. 1.9 detalla el ciclo de vida del patógeno en la naturaleza.

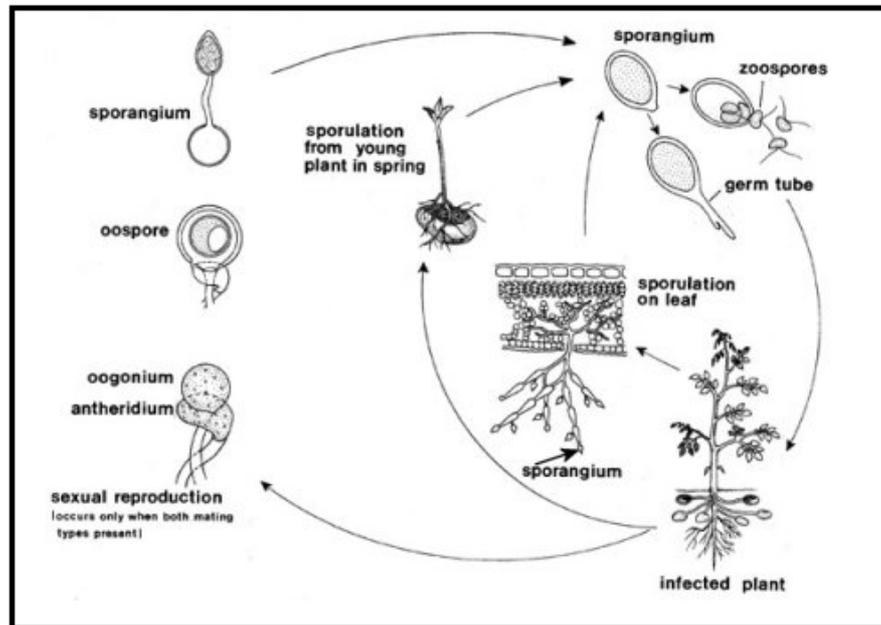


Figura 1.9. Ciclo de reproducción de *P. infestans* en la naturaleza. Fuente: Schumann & D'Arcy, 2000

La reproducción asexual es la más difundida. Se produce con la presencia de un micelio, el cual, después de un período desarrolla esporangios, los cuales al madurar liberan las zoosporas que se liberan al medio y desarrollan un micelio diploide. Este ciclo se mantiene en los dos tipos, el A1 y el A2 independiente el uno del otro. La reproducción asexual se desarrolla en una fase diploide en todo el proceso (Erwin & Ribeiro, 1996).

El momento en el que los dos tipos, A1 y A2 se encuentran en el medio, se desarrollan estructuras reproductivas sexuales en los dos tipos, con la producción de estructuras sexuales femeninas (oogonios) y de estructuras sexuales masculinas (anteridios). Hay que destacar que las estructuras sexuales son haploides. El tubo del anteridio rompe la pared celular de la oogonia, depositando su núcleo en el interior, con la subsecuente generación de una oospora, que vuelve a ser diploide y desarrolla un nuevo micelio, el cual puede volver al ciclo anterior de reproducción asexual, con la producción de esporangios (Erwin & Ribeiro, 1996).

La coexistencia de los tipos A1 y A2 en la naturaleza conlleva a la aparición de nuevas razas del patógeno con un biotipo virulento más fuerte que el anterior, lo que contribuye a la diseminación de la enfermedad, puesto que el la reproducción sexual

produce nuevos caracteres en las razas resultantes (Erwin & Ribeiro, 1996), haciendo que los esfuerzos de obtener variedades resistentes al patógeno sean infructuosos. Esta alternancia de ciclos de reproducción en *P. infestans* hace del tizón tardío una enfermedad multicíclica de muy difícil control en estadios tempranos y avanzados (Erwin & Ribeiro, 1996).

Los esporangios de *P. infestans* germinan solamente en películas de agua sobre las hojas de las plantas cuando la temperatura oscila entre los 10 y 18°C, produciendo de 2 a 8 zoosporas que germinan en el plazo de 3 horas en una humedad relativa entre el 91 y 100% (Rodríguez, *et al.*, 2001).

El control de la enfermedad en ocasiones puede resultar muy difícil por las condiciones favorables del patógeno de humedad y temperatura, por lo que el control más efectivo consiste en la aplicación de fungicidas preventivos. Actualmente los productos agroquímicos más utilizados para el control de la enfermedad son: Curzate, metalaxyl, fosetil-Al, y milfuran (Erwin & Ribeiro, 1996; Rodríguez, *et al.*, 2001).

Se ha estado implementando un tipo de control, con el uso de variedades resistentes, pero esta metodología ha resultado muy difícil aplicar por la enorme variabilidad del patógeno ante el apareamiento de variedades resistentes (Erwin & Ribeiro, 1996). Sin embargo, se ha encontrado una variedad silvestre, *Solanum demissum* (Fig. 1.10) que es aparentemente inmune a *P. infestans* y a partir de ella han sido desarrolladas variedades de papa resistente, que después han resultado ser sensibles al apareamiento de nuevas razas del patógeno. Cabe destacar que los procesos de mejoramiento dan una perspectiva al futuro bastante alentadora (Rodríguez, *et al.*, 2001).



Figura 1.10. Fotografía de *Solanum demissum*,

Fuente: Sárvári Research Trust, 2010.

1.4.3 Los genes *PR*

1.4.3.1 Características Generales

Los genes *PR* son familias génicas que codifican un grupo de proteínas denominadas *PR* (*Pathogenesis-related*), las cuales tienen un importante rol en la resistencia de las plantas contra patógenos, además de intervenir en la adaptación general al estrés del tipo medioambiental (Edreva, 2005).

Las proteínas *PR* fueron descubiertas en hojas de tabaco hipersensitivas, mediante la interacción de estas con el virus del mosaico del tabaco (TMV). Inicialmente, fueron conocidas como proteínas *b* (“*b-proteins*”), presentando gran relevancia en su intervención en la resistencia a los patógenos. Esta aseveración se apoya en los estudios previos, en los cuales las plantas resistentes expresan una respuesta hipersensible a la necrosis producida por patógenos del tipo viral, bacteriano o fúngico (Edreva, 2005).

Antoniw y colaboradores en 1980, instauraron el término “*Pathogenesis-related proteins (PR)*”, las cuales son definidas como proteínas codificadas por la planta huésped pero solamente son inducidas en situaciones patológicas o relacionadas a esta (Antoniw, *et al.*, 1980).

Sin embargo, estudios posteriores afirmaron que las proteínas no solo estaban relacionadas en las interacciones de plantas resistentes con patógenos, sino también en

las interacciones con plantas susceptibles, incluso en plantas sensibilizadas previamente bajo condiciones de estrés abiótico (Edreva, 2005).

Originalmente fueron clasificados 5 grupos de proteínas PR, desde la PR-1 hasta la PR-5, en función de su movilidad electroforética. Cada grupo está conformado por algunos subtipos de proteínas que presentan características comunes entre ellas. El grupo de proteínas PR-1 es el más abundante de todos, constituyendo aproximadamente del 1 al 2% de las proteínas totales de la hoja. En 1994, se unificó la nomenclatura para las proteínas PR bajo una propuesta basada en la agrupación de estas proteínas en función de su secuencia aminoacídica, relaciones serológicas y actividad enzimática, apareciendo en esta ocasión 11 familias de proteínas (PR-1 a PR-11), reconocidas y clasificadas en tomate y tabaco (Van Loon & Van Strien, 1999; Edreva, 2005). Actualmente se reconocen 17 familias de PR descubiertas y clasificadas en diferentes especies vegetales (Van Loon, *et al.*, 2006).

La inoculación de patógenos necrotizantes, o el tratamiento de las plantas con químicos selectos, o la exposición a condiciones ambientales de estrés fisiológico, lidera en varias plantas la inducción de un sistema de respuesta general denominada SAR (*Systemic acquired resistance*), lo que desencadena la acumulación de estas proteínas PR. (Anfoka & Buchenauer, 1997; Van Loon, *et al.*, 2006).

1.4.3.2 El gen *PR-1b1*

El gen *PR-1b1* es un gen miembro de la familia génica *PR-1*. Esta familia codifica para un grupo de proteínas que son conocidas por participar activamente en los mecanismos de defensa contra varios tipos de estrés en las plantas (Tornero, *et al.*, 1994).

Aunque se ha determinado que el grupo proteico PR-1 es el más abundante en las hojas (Edreva, 2005), la familia PR-1 es la única de las familias de proteínas PR que no tiene una función conocida. Miembros específicos de la familia PR-1 tiene actividad antifúngica contra los oomicetes en plantas transgénicas de tabaco (Alexander, *et al.*, 1993; Van Loon & Van Strien, 1999; Van Loon, *et al.*, 2006). La actividad antifúngica fue comprobada *in vitro* con la inhibición de la germinación de las zoosporas de *P.*

infestans e *in vivo* con la reducción de la superficie de infección en discos de hojas de tomate infectadas (Niderman, *et al.*, 1995). La familia proteica PR-1 no comparte homologías con genes conocidos (Tornero, *et al.*, 1994).

Aunque estas proteínas fueron descritas inicialmente en plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TMV), estudios posteriores con herramientas moleculares demuestran que las proteínas de la familia PR-1 se encuentran en muchas otras especies, incluyendo a plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Las proteínas PR-1 se encuentran en numerosas isoformas siendo estas ácidas o básicas, siendo estas últimas las más abundantes en tomate (Tornero, *et al.*, 1994).

Dentro del grupo de genes de la familia *PR*, esta investigación se centrará en el estudio de la isoforma básica conocida como *PR-1b1*. Se ha demostrado que el gen *PR-1b1* es la isoforma que mayor expresión tiene dentro de la familia (Tornero, *et al.*, 1997). Varios estudios han demostrado que la isoforma PR-1b1 tiene un mayor nivel de expresión que su forma ácida PR-1a1, ya que esta isoforma reduce su acumulación con respecto al tiempo de inoculación, mientras que la isoforma básica aumenta considerablemente su expresión (Tornero, *et al.*, 1994).

La proteína PR-1b básica de tomate y ácida de tomate PR-1a, tienen similitud con la proteína básica PR-1g de tabaco. Mediante el uso de la resonancia magnética nuclear (NMR), se determinó que la proteína tiene una arquitectura molecular única (Fig. 1.11). La proteína está conformada por cuatro hélices α (I-IV) y por cuatro cadenas β (A-D), ordenadas antiparalelamente entre las hélices I, III y II, IV respectivamente. Este compactamiento de hojas β centrales resulta en un núcleo fuerte y bipartito, el cual es estabilizado por interacciones hidrofóbicas y múltiples puentes hidrógeno. Esta estructura refleja la alta estabilidad de las proteínas PR-1 y su incompatibilidad ante muchas proteasas (Fernández, *et al.*, 1997; Van Loon & Van Strien, 1999).

Las proteínas del tipo PR-1 muestran un extremo C-terminal corto, la cual las caracteriza como muchas proteínas del tipo básicas, y estas características reflejan sus ligeramente altos pesos moleculares (Van Loon & Van Strien, 1999).

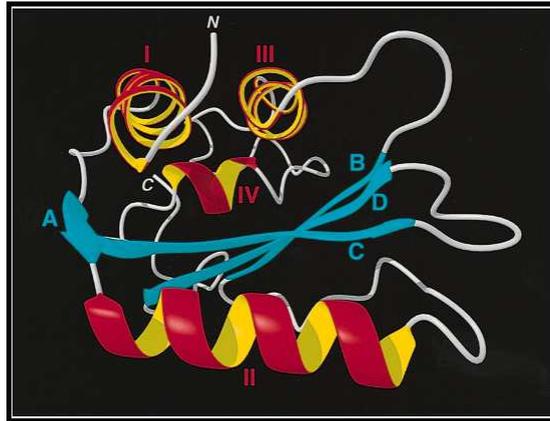


Figura 1.11. Esquema de la estructura tridimensional de la proteína PR-1b de tomate. Fuente: Fernández, *et al.*, 1997

Estas mismas secuencias han sido encontradas en muchos otros organismos como levaduras, insectos y vertebrados. En levaduras, específicamente en *Saccharomyces cerevisiae*, muestran una similaridad de secuencias desde el 25 hasta el 51% entre los genes PR-1 y sus correspondientes en levaduras (Van Loon & Van Strien, 1999).

Estudios con clonación de cDNA han demostrado similaridad de la isoforma de tabaco PR-1a con el antígeno 5 (Dol-Ag5) del veneno de la avispa (*Dolichovespula maculata*). En 130 residuos superpuestos entre las secuencias, de 35 a 39 residuos son idénticos (Fang, *et al.*, 1988). Esta similaridad es compartida con las proteínas del veneno de otros insectos, como el antígeno Dm-Ag5 de la mosca de la fruta (*Drosophyla melanogaster*), teniendo un porcentaje de similaridad del 30% con esta proteína (Van Loon & Van Strien, 1999).

Igualmente, una familia proteica de vertebrados denominada CRISPs (*Cysteine-rich secretory proteins* o “Proteínas secretoras ricas en cisteínas”) han arrojado una homología de hasta el 46% con la proteína PR-1a de tabaco, inclusive, se ha determinado que la secuencia GHYTQVVW es una región bien conservada en ambos grupos de proteínas, lo que sugiere un importante rol funcional de este dominio (Van loon & Van Strien, 1999) (Van Loon, *et al.*, 2006).

Las secuencias CRISP muestran algunas secciones de identidad completa y una identidad total del 30% con dos grandes grupos de proteínas de mamíferos, específicamente proteínas de células tumorales de origen glial y en macrófagos (GliPR y RTPV-1 respectivamente); y la proteína granulada específica 28 (SGP28) en neutrófilos (Fig. 1.12) (Szyperski, *et al.*, 1998) (Van Loon & Van Strien, 1999).

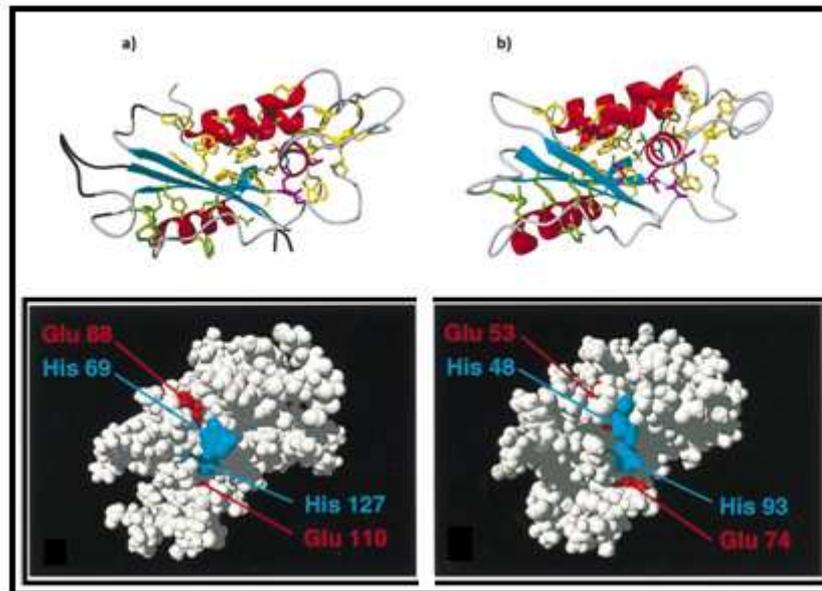


Figura 1.12. Estructura tridimensional de: a) GliPR humana y; b) Pathogenesis-related 1a (PR-1a), Fuente: Szyperski, *et al.*, 1998.

Estas observaciones demuestran que las proteínas de la familia PR-1 muestran homologías y motivos estructurales similares entre hongos, invertebrados y vertebrados, inclusive con los seres humanos, haciendo de esta familia distinta, pero altamente conservada evolutivamente, lo que sugiere que ésta comparte un origen evolutivo común, además de poseer funciones esenciales para la vida de los organismos (Van Loon & Van Strien, 1999).

La mayoría de las proteínas de la familia PR-1 no tiene, o tiene muy poca antigenicidad, lo que no permite tener un conocimiento claro de su función específica. La poca actividad inhibitoria de la tripsina provee pistas importantes sobre el rol bioquímico de las proteínas del tipo PR-1, pero deben realizarse más investigaciones, para finalmente determinar la actividad de las proteínas PR-1 (Van Loon & Van Strien, 1999).

1.4.3.3 Sistema de regulación de los genes *PR-1*

La regulación de las proteínas del tipo PR-1 se produce por la interacción de las plantas con diferentes tipos de estrés, los cuales pueden ser del tipo biótico o abiótico. Al interactuar la planta huésped, con el patógeno, desencadena una respuesta de defensa (HR). Después de la necrotización del tejido y la activación de la HR, se desencadena una serie de señales internas que son conocidas como SAR (*Systemic acquired system* o Resistencia sistémica adquirida) (Enkerli, *et al.*, 1993; Ryals, *et al.*, 1996; Fidantsef, *et al.*, 1999; Van Loon, *et al.*, 2006).

El SAR se refiere a las distintas señales y rutas, las cuales juegan un importante rol en la capacidad de las plantas de defenderse contra el ataque de patógenos. Existen diferentes genes asociados al SAR que son conocidos como genes SAR, entre los cuales los genes *PR* y, específicamente la familia *PR-1* son los más representativos (Ryals, *et al.*, 1996).

La expresión de los genes marcadores del SAR se encuentra asociada a la interacción de numerosos patógenos, entre los que se encuentran virus, hongos y bacterias en varias clases de planta dicotiledóneas (Ryals, *et al.*, 1996).

La activación del SAR se debe a la acumulación de un compuesto que es indispensable para el sistema. Este compuesto es el ácido salicílico (SA), el cual interviene directamente en la activación del SAR y en la expresión de los marcadores moleculares de este proceso (Ryals, *et al.*, 1996; Fidantsef, *et al.*, 1999; Van Loon, *et al.*, 2006).

Si bien los mecanismos mediante los cuales el SA induce la expresión de los genes *PR-1*, son aún desconocidos, se presume que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) actúa como un mensajero secundario del SA en la señalización del SAR. Es así que en algunas investigaciones se ha descrito la presencia de una proteína de unión al SA con función catalasa (Chen, *et al.*, 1993). Se ha encontrado que el SA inhibe la actividad catalasa de esta proteína, elevando los niveles de H_2O_2 (Ryals, *et al.*, 1996).

Las rutas de señalización que controlan los ataques de patógenos e insectos son diferentes el uno del otro. El daño producido por cierto tipo de insectos y herbívoros es señalizado a través de la ruta del ácido octadecanoico con la producción de oxilipinas, las cuales provienen de la peroxidación de ácidos grasos, como el ácido linoléico y linolénico, con la posterior generación de jasmonatos, los cuales activan la resistencia inducida (Fidantsef, *et al.*, 1999). Por otro lado, los patógenos y sus elicitores, además de los metabolitos producto de las lipoxigenasas, fomentan la acumulación de las proteínas PR, por consiguiente, la activación del SAR (Ryals, *et al.*, 1996; Fidantsef, *et al.*, 1999; Van Loon, *et al.*, 2006).

El sistema SAR, mediado por la acumulación de SA, inhibe la resistencia inducida mediada por jasmonatos. Adicionalmente se observa que existe una conexión entre ellos a través de una ruta que, hasta este momento es desconocida. La descripción del proceso de señalización se puede verificar en la Fig. 1.13 (Fidantsef, *et al.*, 1999; Van Loon, *et al.*, 2006).

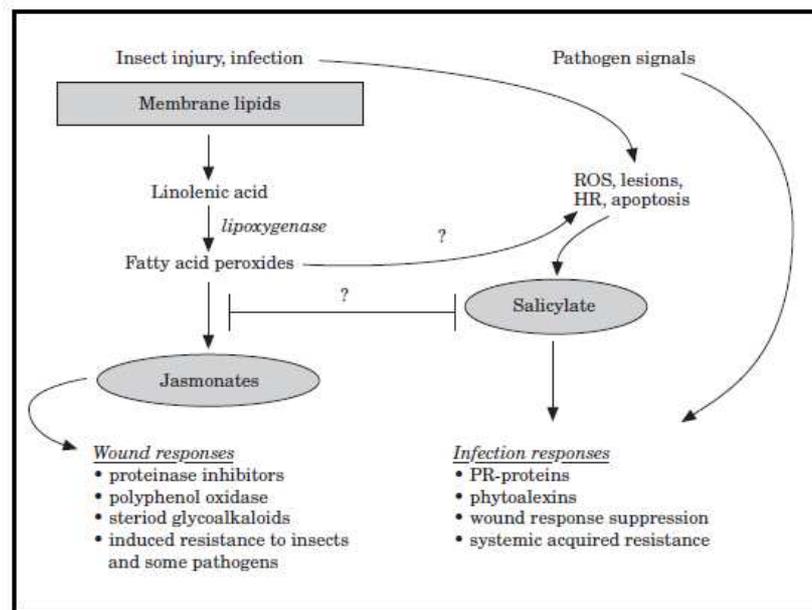


Figura 1.13. Esquema de la señalización que se produce en el ataque de patógenos y de insectos, Fuente: Fidantsef, *et al.*, 1999.

Gracias a este conocimiento, se puede asociar la acumulación de las proteínas PR-1, con la acumulación del SA, lo que los vincula directamente a nivel molecular. Estudios anteriores han demostrado también la acumulación de SA en plantas de tomate

infectadas con *P. infestans* (Enkerli, *et al.*, 1993). Este hecho proporciona valiosa información sobre las interacciones que se producen entre el patógeno y su hospedero, lo que a futuro puede contribuir al desarrollo de tecnologías basadas en este proceso para evitar las infecciones de este patógeno de manera masiva (Van Loon, *et al.*, 2006).

1.4.4 Técnicas Moleculares para el análisis de expresión génica

El análisis de la expresión génica, al ser un proceso molecular, implica una serie de técnicas, las cuales deben ser estrictamente desarrolladas y estandarizadas, puesto que el manejo de la PCR en tiempo real es un proceso muy sensible y requiere de una alta precisión.

Este proceso incluye técnicas como la extracción y cuantificación del RNA, la eliminación del DNA contaminante, la síntesis del cDNA y la PCR en tiempo real.

1.4.4.1 Extracción y cuantificación del RNA

La extracción de RNA es un paso inicial y clave del análisis de la expresión génica debido a la necesidad de obtener un RNA de alta calidad y estable para este tipo de análisis.

La degradación del RNA afecta a todos los tipos de análisis de expresión génica, como Real Time PCR y biochips (QIAGEN, 2006). Para lograr la estabilización de este material se usan soluciones como el isotiocianato de guanidina, la cual al ser sal caotrópica, lisa las membranas celulares y protege el RNA inactivando las enzimas RNAsas (INVITROGEN, 2010).

Los procedimientos deben ser optimizados para obtener los mejores resultados de los protocolos, los cuales garaticen un buen rendimiento en cuanto a cantidad y calidad de RNA para los ensayos de expresión génica.

La cuantificación del RNA es necesaria para conocer la cantidad de RNA que se empleará en los análisis de expresión génica.

Existen varios métodos de cuantificación de RNA, aunque uno de los más utilizados y conocidos es el método mediante el uso del fluorómetro. El fluorómetro es una plataforma que detecta la fluorescencia de una sustancia fluorescente específica, aumentando la fluorescencia en función de la cantidad de RNA presente. La cantidad de RNA se calcula mediante el uso de estándares de calibración con una cantidad conocida de RNA (Fig. 1.14) (INVITROGEN, 2010a).

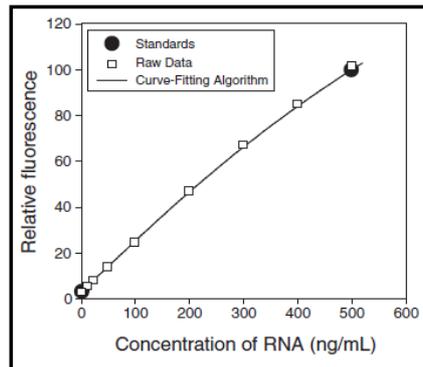


Figura 1.14. Curva de calibración de RNA, Fuente: INVITROGEN, 2010a.

Es muy importante conocer las condiciones óptimas de funcionamiento del equipo y del kit de cuantificación. Las fluctuaciones de temperatura afectan directamente a la concentración de la muestra, pudiendo dar como resultado, sobreestimaciones de cantidad o desestimar la cantidad de la misma (INVITROGEN, 2010a).

Es importante mantener las condiciones adecuadas para la cuantificación para obtener resultados confiables que no alteren los cálculos de expresión génica.

1.4.4.2 Tratamiento con la enzima DNAsa

El tratamiento de muestras de RNA con la enzima DNAsa es un procedimiento mediante el cual se elimina las trazas de DNA contaminante de la extracción de RNA, previo a la PCR en tiempo real, mediante la aplicación de la enzima DNasa I (E.C. 3.1.21.1).

Este tratamiento es esencial para evitar la amplificación de moléculas de DNA contaminante que se pueda encontrar en la solución de RNA. Al ser la PCR en tiempo

real una herramienta de detección muy sensible, se puede amplificar fragmentos de DNA contaminante, dando lugar a los conocidos “falsos positivos” que pueden sobreestimar la cantidad de expresión génica con fragmentos de amplificación de un origen distinto a los de cDNA. Por lo tanto es necesario aplicar este tratamiento siempre que se vaya a realizar cualquier análisis mediante PCR en tiempo real para evitar confusiones en los resultados.

1.4.4.3 Síntesis de cDNA (Transcripción reversa)

En las mediciones de expresión génica mediante la PCR en tiempo real, es indispensable que el mRNA sea transcrito a cDNA mediante la reacción de transcripción reversa (Kubista, *et al.*, 2006).

En la reacción de transcripción reversa, las moléculas de mRNA son copiadas a cDNA por la acción de la enzima transcriptasa reversa junto con un primer. Entre las enzimas transcriptasas reversa las más difundidas y modificadas está la enzima del Virus de Leucemia Murina Moloney (MMLV) y la enzima del Virus de la Mieloblastosis Aviar (AMV) (Kubista, *et al.*, 2006).

La estrategia de “*priming*” más usada en la reacción de transcripción reversa es la adición del oligo (dT) primer. El oligo (dT) es un primer de 18-20 nucleótidos que contiene solamente timinas, el cual hibrida la cola de poli-A del mRNA de la mayoría de organismo eucarióticos (Fig. 1.15). Esto representa una gran ventaja, puesto que para la clonación del cDNA, la secuencia de poli-A (o poli T en la cadena complementaria) hace más fácil su aislamiento (Kubista, *et al.*, 2006).



Figura 1.15 Síntesis de cDNA mediante la adición del oligo (dT), Fuente: Kubista, *et al.*, 2006.

Es importante que las cantidades de cDNA producidas por la reacción reflejen correctamente las cantidades de mRNA inicial para asegurar los resultados de la investigación (Kubista, *et al.*, 2006).

1.4.4.4 PCR en tiempo real

La PCR fue considerada como una revolución en la ciencia desde su invención por Kary Mullis en 1984 (Deepak, *et al.*, 2007; Schaad & Frederick, 2002). A partir de allí y hasta el día de hoy la PCR ha experimentado grandes avances, dentro de los cuales, la PCR en tiempo real constituye uno de sus más importantes.

La PCR en tiempo real o PCR cuantitativa es una variante de la PCR convencional la cual es utilizada para la cuantificación de DNA o RNA mensajero de una muestra.

La detección se realiza por la adición de una sustancia que emite una fluorescencia conocida como fluorocromo. Esta fluorescencia producida es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR generado. Esta fluorescencia se representa a manera de una curva exponencial (2^n es el principio de la PCR, siendo n el número de ciclos de la reacción) (Kubista, *et al.*, 2006). Para la detección se utiliza un termociclador especialmente adaptado para la lectura de cantidades mínimas de fluorescencia.

La PCR en tiempo real es uno de los mayores avances en el campo del desarrollo de la técnica, puesto que las aplicaciones de esta técnica abarcan desde la detección temprana de patógenos, pasando por estudios de discriminación alélica e identificación de genotipos, hasta los estudios de análisis de expresión de genes (Deepak, *et al.*, 2007).

Entre las ventajas de la PCR en tiempo real tenemos su sensibilidad, lo que permite la amplificación de fragmentos de DNA en muestras con muy poca cantidad de templado inicial (Gachon, *et al.*, 2004; Wong & Medrano, 2005; Deepak, *et al.*, 2007).

Otra de las ventajas de esta técnica es la rapidez con la que se pueden obtener resultados. El tiempo estimado de una PCR en tiempo real está entre los 20 minutos y

las 2 horas del inicio. El tiempo es el factor más determinante en el análisis de un ensayo de PCR, el cual se puede reducir drásticamente (Gachon, *et al* 2004).

Aunque la PCR en tiempo real es una importante herramienta para el análisis de la expresión génica, esta tiene algunos inconvenientes, los cuales pueden resultar críticos. Estos problemas se resuelven fácilmente con el correcto uso de los materiales de calibración y referencia, además de una adecuada manipulación del templado que va a ser usado en el análisis de la PCR en tiempo real (Deepak, *et al.*, 2007).

La PCR en tiempo real se divide en 4 fases principales: a) La fase inicial, en la cual la fluorescencia de los primeros ciclos es mínima y no rebasa el “*background*” del medio circundante. En esta fase se calcula la línea base; b) La fase exponencial temprana, en la cual la fluorescencia producida por el producto de PCR rebasa el umbral definido por el equipo, o por el investigador. El ciclo en el cual la fluorescencia ha alcanzado el umbral definido se conoce como *Ct* (*Cycle Threshold* o Ciclo umbral) (Applied Biosystems, 2009). Este valor es representativo de la cantidad inicial de templado que hay en la reacción y es usado en los cálculos posteriores. Mientras más bajo es el valor de *Ct*, mayor es el número de copias del DNA templado en la reacción; c) La fase lineal, en la cual se alcanza un estado de amplificación óptima, en donde la cantidad de producto de PCR se dobla en cada ciclo y finalmente; d) La fase platea o estacionaria, en la cual los reactivos y el equipo han alcanzado el límite de detección y la reacción ha terminado (Wong & Medrano, 2005). La curva de la reacción de PCR en tiempo real se detalla en la Fig. 1.16.

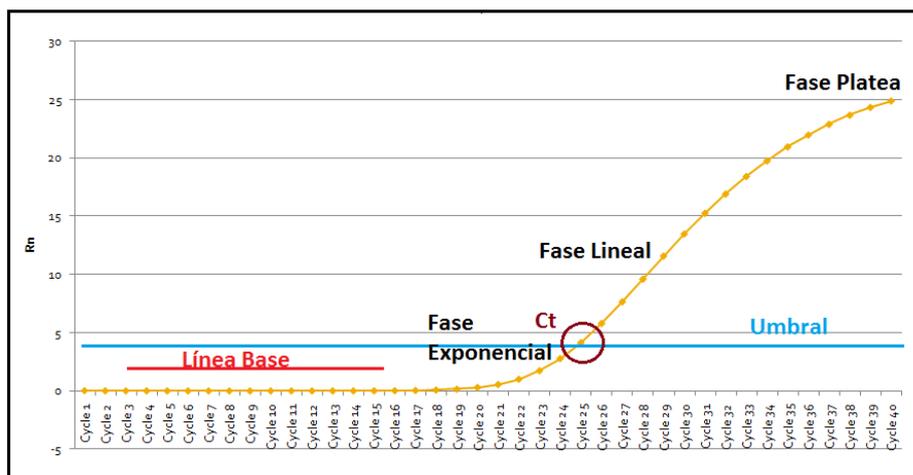


Figura 1.16. Curva de PCR en tiempo real, donde se detallan sus componentes (Rivas, 2010).

La PCR en tiempo real tiene una gran variedad de tecnologías para liberar la fluorescencia. Sin embargo, son dos los métodos más utilizados y son los más comunes para su utilización. Uno de ellos son los fluoróforos de unión al DNA (Fig. 1.17a). En esta tecnología, se añade un fluoróforo que es afin al dsDNA o DNA de doble cadena, es decir, la fluorescencia aumenta, en función de que el producto de PCR en tiempo real se acumula en cada ciclo de la reacción. Esta tecnología es muy flexible, puesto que se puede utilizar un fluoróforo diferente para cada gen en el análisis. Sin embargo, la capacidad de multiplexing de esta tecnología es nula, por que los fluoróforos no son de unión específica a un fragmento en particular, siendo esta tecnología susceptible a la aparición de falsos positivos. Para evitar esto, es indispensable la optimización del proceso y el análisis de disociación (Fig. 1.18), donde la presencia de varios fragmentos de PCR es reflejada en el número de picos de disociación. Esta metodología es una de las más usadas por su bajo costo y facilidad de manejo. El fluoróforo de unión al DNA de mayor uso en esta técnica es el SYBR Green (Ponchel, *et al.*, 2003; Zipper, *et al.*, 2004; Wong & Medrano, 2005; Kubista, *et al.*, 2006).

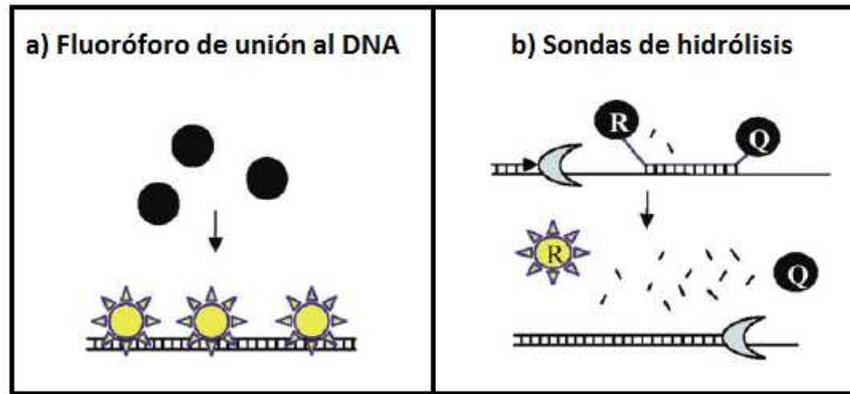


Figura 1.17. Esquema de las técnicas más utilizadas en PCR en tiempo real: a) Fluoróforos de unión al DNA; b) Sondas de hidrólisis, Fuente: Modificado de Wong & Medrano, 2005.

Otra de las tecnologías más utilizadas en la PCR en tiempo real es la de las sondas de hidrólisis (Fig. 1.17b), en la cual la tecnología TaqMan es la más conocida y utilizada. Esta tecnología es conocida también como ensayo 5' nucleasa. La técnica consiste en el diseño de una sonda específica para la secuencia que se desea detectar, la cual es sintetizada con dos tipos de fluoróforos: Uno denominado “Reportero” el cual está en el extremo 5' de la sonda, y el otro denominado amortiguador o “*quencher*”, que se coloca en el extremo 3' de la cadena. La fluorescencia del reportero es reducida por el *quencher* mediante FRET (Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) cuando la sonda se encuentra intacta. Cuando la sonda hibrida su cadena complementaria, la actividad 5'-exonucleasa de la DNA Polimerasa corta en el extremo 5' la unión del reportero con la cadena, separándolo de su amortiguador, con la consiguiente acumulación de la fluorescencia. Esta tecnología presenta una alta sensibilidad y tiene una gran capacidad de multiplexing al añadir a la reacción sondas de distintos genes de interés, cada una con un fluoróforo distinto, detectando los niveles de expresión de todos los genes en una sola reacción. Sin embargo el alto costo de la técnica limita el uso de esta tecnología (Wong & Medrano, 2005; Kubista, *et al.*, 2006).

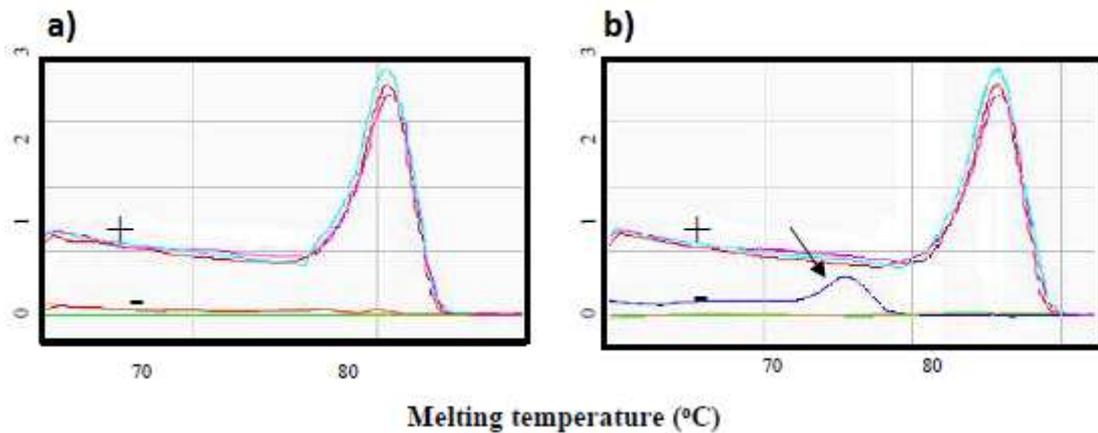


Figura 1.18. Análisis de disociación de una PCR en tiempo real usando SYBR Green I: a) Pico de disociación de 1 solo fragmento; b) Pico de disociación de un fragmento con la presencia de dímeros de primers (Línea azul), Fuente: Ponchel, *et al.*, 2003

Las reacciones de PCR en tiempo real están expuestas a una gran cantidad de inconvenientes, debido a la variación significativa y la no-reproducibilidad de las muestras en diferentes laboratorios. Esta reproducibilidad limitada se debe a la variación en el rendimiento de la reacción de transcripción reversa, la necesidad de dos pasos enzimáticos secuenciales y a la naturaleza exponencial de la reacción de PCR, junto con las pequeñas cantidades de moléculas *target* en el medio. Estos inconvenientes influyen en gran medida en el rendimiento final de los productos amplificados, por lo que se hace imprescindible la estandarización y optimización de todos los procedimientos implicados en la reacción para garantizar la eficiencia y reproducibilidad de la reacción (Bustin, 2005).

1.4.5 Expresión génica

La expresión génica es un proceso biológico mediante el cual la célula transforma la información codificada en el DNA a proteínas a través de la producción del RNA mensajero (mRNA) mediante el proceso de traducción.

La expresión génica de un determinado gen en una célula puede ser cuantificada por la cantidad de proteína producida por la célula o, por la cantidad producida de mRNA del gen en estudio, la cual es la más utilizada actualmente. La cuantificación de

la expresión génica mediante los métodos clásicos (*Northern Blot*) requiere de cantidades de mRNA difíciles de obtener cuando el número de muestras experimentales es limitado. Es por ello que el uso de la PCR en tiempo real ha resuelto estos inconvenientes reduciendo en gran medida la cantidad de mRNA utilizado.

La cuantificación de la expresión génica puede ser del tipo absoluta y relativa. Para el presente trabajo se utilizó la expresión génica relativa.

1.4.5.1 Expresión génica absoluta

El método de cuantificación absoluta usa estándares diluidos de DNA de concentración conocida para construir una curva estándar. Esta curva estándar relaciona linealmente el Ct y las cantidades iniciales de cDNA, por consiguiente, del mRNA inicial, permitiendo la determinación de la concentración de muestras desconocidas en función de su valor de Ct. Este método asume que los estándares y las muestras tienen eficiencias de amplificaciones aproximadas, además que las concentraciones de las diluciones deben abarcar los niveles de expresión de las muestras desconocidas y permanecer dentro de un rango de cuantificación que sea detectable para el equipo y el ensayo (Wong & Medrano, 2005).

El estándar de PCR consiste de fragmentos de doble cadena de DNA (dsDNA) o cadena simple de DNA (ssDNA) que contengan la secuencia que desea ser amplificada. El estándar usado debe ser de una alta pureza y tener un amplio rango de cuantificación y sensibilidad (Wong & Medrano, 2005).

1.4.5.2 Expresión génica relativa

En los métodos de cuantificación relativa, se miden los cálculos de la expresión génica en función de un estándar externo o, una muestra de referencia, también conocida como calibrador. Cuando se usa un calibrador, los resultados se muestran como una relación *target* sobre la muestra de referencia. Existen numerosos modelos matemáticos para calcular la expresión génica normalizada de ensayos de cuantificación relativa, los cuales utilizan metodologías diferentes para minimizar el error experimental (Wong & Medrano, 2005).

Para los cálculos de expresión relativa, es necesario el empleo de un gen de control interno o referencia (también conocido como *house-keeping gene*). Los genes de referencia son genes cuya expresión es estable en las células, es decir, no varían su expresión bajo las condiciones experimentales. Muchos de estos genes son indispensables para la supervivencia celular y son utilizados para validar los estudios de expresión relativa (Expósito-Rodríguez, *et al.*, 2008).

Se han desarrollado varios modelos matemáticos para el cálculo de la expresión génica relativa. Sin embargo, el método del ddCt (Livak & Schmittgen, 2001) es el más empleado y es el que se utilizó para esta investigación.

1.4.5.3 Método del ddCt (Livak, Schmittgen, 2001)

El método del ddCt es un modelo matemático que calcula los cambios en la expresión génica como una diferencia entre una muestra experimental y una muestra calibrador. Este método es muy útil y es de mayor uso por parte de investigadores, además que los softwares de los equipos de PCR en tiempo real incluyen este método por *default*. Este método incluye una corrección no ideal de la eficiencia de amplificación en el cual la eficiencia de la amplificación del gen *target* y el gen de referencia es aproximadamente igual. Para que estas condiciones se cumplan, los fragmentos de amplificación deben ser menores de 150 bp para que la eficiencia de la amplificación sea aproximada a 1 (Livak & Schmittgen, 2001), lo que requiere de una rigurosa optimización. Este método no requiere la elaboración de una curva estándar, lo que lo hace muy útil para el análisis de una gran cantidad de muestras evitando el uso de los estándares diluidos (Livak & Schmittgen, 2001) (Wong & Medrano, 2005).

El modelo se deriva inicialmente de la característica exponencial de la reacción de PCR (Ecuación 1).

$$X_n = X_0 \times (1 + E_X)^n, \quad 1)$$

Donde X_n es el número de copias del gen X en el ciclo n ; X_0 es el número inicial de moléculas del gen X; E_x es la eficiencia de amplificación del gen X y n es el número de ciclos de la PCR. El C_t es el ciclo fraccionario en el cual la fluorescencia del gen alcanza en umbral fijado, entonces la ecuación queda de esta manera (Ecuación 2).

$$X_T = X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X \quad 2)$$

Donde X_T es el número de copias del gen X en el ciclo C_t ; $C_{T,X}$ es el ciclo C_t del gen X y K_x es una constante. Esto se repite para el gen de referencia R (Ecuación 3).

$$R_T = R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}} = K_R, \quad 3)$$

Donde R_T es el número de copias del gen de referencia; R_0 es el número inicial de moléculas del gen de referencia; E_R es la eficiencia de amplificación del gen de referencia; $C_{T,R}$ es el ciclo C_t del gen de referencia y K_R es una constante del gen de referencia. Dividiendo la ecuación 1 para la ecuación 2, tenemos la siguiente expresión (Ecuación 4).

$$\frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 \times (1 + E_R)^{C_{T,R}}} = \frac{K_X}{K_R} = K. \quad 4)$$

Asumiendo que la eficiencia del gen de referencia es igual a la eficiencia del gen X, tenemos (Ecuación 5 y 6):

$$E_X = E_R = E,$$

$$\frac{X_0}{R_0} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,R}} = K, \quad 5)$$

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K, \quad 6)$$

Donde X_N es la cantidad normalizada del gen X (X_0/R_0) y el ΔC_T es la diferencia de los C_t s del gen *target* y del gen de referencia. Ordenando la ecuación queda de la siguiente manera (Ecuación 7).

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T} \quad 7)$$

El paso final es dividir el X_N de cualquier muestra q , que se define como el tratamiento a ser evaluado, para el X_N de la muestra calibrador (cb) (Ecuación 8).

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T} \quad 8)$$

$$-\Delta \Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}).$$

Para amplicones diseñados de un tamaño menor de 150 bp, en el cual las concentraciones de primers y Mg^{2+} han sido adecuadamente optimizadas, la eficiencia de amplificación es cercana a 1, entonces, la cantidad del gen *target*, normalizada a un control endógeno, y relativa a una muestra calibrador queda de la siguiente manera (Ecuación 9):

$$\text{amount of target} = 2^{-\Delta \Delta C_T} \quad 9)$$

Este método permite el cálculo de la expresión génica, asumiendo que las eficiencias de los genes de referencia y el *target* son aproximadamente iguales. En el caso de que las eficiencias de los dos genes difieran mucho entre sí, se hace necesario el análisis de eficiencias mediante una curva estándar, o se puede hacer un nuevo diseño de primers y optimizar las condiciones de reacción para equiparar las dos eficiencias (Livak & Schmittgen, 2001).

1.4.6 Análisis Estadístico

1.4.6.1 Análisis de Varianza (ANOVA) de un diseño factorial

El análisis de varianza ANOVA es el procedimiento principal del análisis de datos experimentales. El principio básico de esta técnica es la separación de las variaciones de las partes con las que contribuye cada una de las fuentes de variación que intervienen en el experimento (Gutiérrez & De la Vara, 2008).

El objetivo principal del análisis de varianza es probar la hipótesis de igualdad de los tratamientos con respecto a la media de la variable de respuesta. Para analizar dos o más factores dentro de un experimento, se debe implementar un diseño factorial, el cual tiene por objetivo el análisis del efecto de varios factores sobre una o varias respuestas con el mismo interés sobre todos los factores (Gutiérrez & De la Vara, 2008).

Las ventajas de los diseños factoriales permiten estudiar el efecto individual, además de la interacción de los distintos factores que intervienen dentro del experimento, además que la interpretación de los cálculos es relativamente sencilla (Gutiérrez & De la Vara, 2008).

Cuando se emplean dos factores (a y b) con niveles de prueba iguales o mayores a 2, se puede construir el diseño factorial $a \times b$ con n número de replicas para tener la validez estadística que necesita el experimento (Gutiérrez & De la Vara, 2008). El modelo estadístico para efectos de este tipo es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$
$$i = 1,2 \dots \dots \dots a; \quad j = 1,2 \dots \dots \dots b; \quad k = 1,2 \dots \dots \dots n$$

Donde Y_{ijk} es el valor de la variable de respuesta del diseño factorial; μ es el valor de la media general; α_i es el efecto debido al i -ésimo nivel; β_j es el efecto debido al j -ésimo nivel; $(\alpha\beta)_{ij}$ es el efecto de la interacción en la combinación ij y; ϵ_{ijk} es el error aleatorio que supone una distribución normal (Gutiérrez & De la Vara, 2008).

Los factores pueden ser del tipo cualitativo o cuantitativo. Para evaluar la manera que cada factor influye sobre el experimento, es necesario elegir por lo menos dos niveles de prueba para cada uno de ellos y con el diseño factorial completo, se corren todas las posibles combinaciones aleatoriamente y cada uno llega a ser un tratamiento dentro del diseño factorial (Gutiérrez & De la Vara, 2008).

Se conoce como el efecto de un factor el cambio de observado en la variable de respuesta por la acción del cambio de nivel de dicho factor, por lo que estos efectos se conocen como efectos principales, por otra parte, cuando los factores interactúan entre sí, se conoce como efecto de interacción. Los valores absolutos de los efectos principales y del efecto de interacción tienen una influencia crítica sobre la variable de respuesta, para lo cual se requiere en ANOVA para conocer su influencia (Gutiérrez & De la Vara, 2008).

1.4.6.2 Pruebas de rango múltiple

Después de que se rechaza la hipótesis nula en el análisis de varianza, es necesario verificar que tratamientos son realmente diferentes, para ello se realizan las pruebas de rango múltiple, para determinar cuáles son los que evidencian la diferencia entre ellos (Gutiérrez & De la Vara, 2008).

Estas interrogantes se contestan cuando se prueba la igualdad de todas las medias, para lo cual se han propuesto varios métodos conocidos como comparaciones o pruebas de rango múltiple. Cada método tiene su forma particular de cálculo de los rangos y su diferencia radica en la potencia para detectar las diferencias entre las medias, es por ello que se dice que una prueba es más potente si es capaz de detectar diferencias más pequeñas (Gutiérrez & De la Vara, 2008).

Las pruebas de significancia más utilizadas son la prueba de Tukey, prueba de Duncan y a prueba de Scheffé.

La prueba de Tukey es un procedimiento que proporciona una tasa con respecto al experimento del tipo fuerte para las comparaciones en pares de todas las medias del

tratamiento y se usa para obtener intervalos de confianza simultáneos (Kuehl, 2001). En el método de Duncan los promedios se colocan ascendientemente si las muestras k son de igual tamaño. En las comparaciones donde las diferencias observadas son mayores que el rango, se dice que son significativamente diferentes y; la prueba de Scheffé está diseñada específicamente para probar todos los contrastes de medias que pudieran interesar al evaluador, sin el riesgo de incluir el error del tipo I (Gutiérrez & De la Vara, 2008).

1.5 Sistema de hipótesis

H₀1: No existen diferencias en la expresión del gen *PR-1b1* en las variedades de tomate utilizadas en el estudio.

H₀2: No existen diferencias en la expresión del gen *PR-1b1* en los tiempos de inducción del patógeno a las plantas de tomate.

H_A1: Existen diferencias en la expresión del gen *PR-1b1* en las variedades de tomate utilizadas en el estudio.

H_A2: Existen diferencias en la expresión del gen *PR-1b1* en los tiempos de inducción del patógeno a las plantas de tomate.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para este estudio se utilizaron cuatro variedades comerciales de tomate (*Solanum lycopersicum*) las cuales se describen en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Descripción de las variedades de tomate utilizadas en el estudio

Variedad	Casa Comercial	Código	Descripción
Indeterminada Alaska Lote# 368	Alaska	“In”	Tomate de variedad adaptada para el campo, especialmente para huertos caseros. De crecimiento determinado. Frutos grandes de entre 180-200 gramos de peso.
Flora Dade	Agro Vital	“FD”	Es una variedad adaptada a climas húmedos. Su fruto es de forma aglobada y de color rojo. Es una variedad de cultivo temprano, medio y tardío, garantizado para la siembra. Presenta resistencia a <i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i> , mancha gris de la hoja, <i>Verticillum</i> y <i>Fusarium</i>
Santa Clara 5800	Agro Vital	“SC5800”	Es una variedad de crecimiento indeterminado. Son plantas altas y vigorosas. Prefiere climas amenos y calientes. Produce frutos grandes, redondos y firmes de 130 a 150 gramos de peso. Presenta resistencia a <i>Fusarium</i> y <i>Verticillum</i>
Cherry	Agro Vital	“Ch”	Es una variedad del tipo “Long life”. Es de vigor medio y de crecimiento indeterminado. No presenta ninguna resistencia. Los frutos son pequeños 1-3 cm y 10-15 g de peso

Las cuatro variedades comerciales se sembraron en pomina cernida como sustrato en tres bandejas “multipots” de 18 plantas cada una (6 x 3 pots). Se colocaron tres semillas de tomate por cada pot. En lo posterior se mantuvo una planta por pot para evitar la competencia por el espacio y los nutrientes, obteniendo al final 54 plantas por

cada variedad. Los multipots se colocaron en bandejas que contenían solución nutritiva Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) (Fig. 2.1). La fórmula de la solución Hoagland se detalla en el ANEXO A.

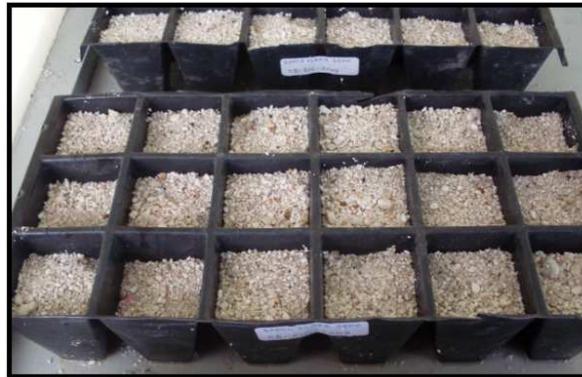


Figura 2.1. Multipots con semillas de tomate colocadas en cajas invernadero en los Laboratorios de Biotecnología de la ESPE, Sangolquí (Rivas, 2010).

La solución nutritiva Hoagland se repuso cada semana. Para los ensayos moleculares, se utilizaron plantas de tomate de aproximadamente 2 meses de edad, con 20 cm. de altura y aproximadamente 4 hojas.

2.2 Inoculación de las plantas de tomate con esporangios de *P. infestans* y recolección de muestras

Para la inoculación de las plantas de tomate, se seleccionó la cepa 3381 de *Phytophthora infestans* del banco de datos del CIP (Centro internacional de la Papa) (Fig. 2.2) la cual fue aislada de cultivos de tomate infectados. El patógeno se replicó en 5 cajas petri para obtener el inóculo suficiente para la infección de las plantas. Los inóculos fueron sembrados en agar centeno e incubados a 20°C hasta que colonicen toda la caja.



Figura 2.2. Caja Petri con inóculo de *P. infestans* cepa 3381 (Rivas, 2010).

Para realizar la inoculación, se lavaron las cajas Petri con el patógeno esporulado con agua destilada estéril. Posteriormente se removieron los esporangios del micelio raspando suavemente con una espátula estéril la caja Petri. Se realizó un contaje de los esporangios separados de las 5 cajas, obteniendo un inóculo de 9000 esporangios/mL en 50 mL de agua destilada estéril.

Para la inoculación de las plantas de tomate, se colocaron de dos a tres gotas de la solución de esporangios sobre cada hoja de la planta. Para favorecer el desarrollo de la infección se elevó la humedad relativa de las cajas invernadero durante el transcurso de la infección hasta el 75% mediante la aspersión de agua dentro de la caja y humidificadores caseros.

Se colectaron solamente las hojas de las plantas colocándolas en paquetes de papel aluminio. Las muestras colectadas se congelaron en nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA de las hojas. Luego fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.

2.3 Extracción y cuantificación de RNA

2.3.1 Extracción de RNA total mediante el kit *PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System* (INVITROGEN, 2010)

En el ensayo de extracción de RNA se utilizó el material vegetal recolectado luego de la incubación del patógeno a 0, 24, 48 y 72 horas. Adicionalmente se utilizó una muestra blanco de material vegetal, la cual fue recolectada antes de la aplicación del patógeno.

Las hojas de tomate recolectadas se molieron con nitrógeno líquido en un mortero congelado. Aproximadamente 100 mg de hojas molidas fueron transferidas inmediatamente a un microtubo de 1.5 mL, nuevo previamente enfriado con nitrógeno líquido. Se añadió 0.5 mL de *RNA Lysis Solution* activada con 10 μ L de β -Mercaptoetanol por cada mL de solución. Se agitó vigorosamente en el vórtex por 3 min a temperatura ambiente para luego centrifugar las muestras a 12000 x g por 2 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante de cada muestra a un microtubo nuevo de 1.5 mL evitando levantar el precipitado en el fondo del tubo. Se añadieron 0.5 volúmenes de etanol absoluto (96-100%) al sobrenadante y se agitó en el vórtex durante 10 segundos hasta formar un precipitado. El sobrenadante se transfirió (incluido cualquier precipitado) a un *RNA spin cartridge*, estos cartuchos se centrifugaron a 12000 x g por 15 segundos descartando el sobrenadante. Se añadió 700 μ L de *Wash Buffer I* a cada cartucho y se los centrifugó a 12000 x g por 15 segundos a temperatura ambiente. Se descartó el líquido con los tubos colectores y los cartuchos se colocaron sobre un *RNA Wash Tube*. A cada cartucho se le añadió 500 μ L del *Wash Buffer II* activada con 4 volúmenes de etanol absoluto (96-100%). Los cartuchos se centrifugaron a 12000 x g durante 15 segundos a temperatura ambiente, descartando solamente el líquido del *RNA Wash Tube*. Se repitieron los dos pasos anteriores para asegurar que el RNA está totalmente limpio. Los cartuchos se centrifugaron a 12000 x g durante 1 minuto para eliminar los restos de las soluciones de lavado y secar la membrana del cartucho. Se descartaron los *RNA Wash Tubes* y los cartuchos se colocaron en los *Recovery Tubes*. Finalmente se añadieron 30 μ L de *RNAse-free Water* sobre la membrana de cada cartucho para eluir el RNA. Se incubaron los cartuchos por 1 min a

temperatura ambiente y se centrifugaron durante 2 minutos a 12000 x g para recuperar el RNA.

Como un paso adicional se tomó la solución de RNA de los tubos y se colocó nuevamente en la membrana, sin descartar el *Recovery Tube*. Se centrifugaron a 12000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente. Este paso es para recuperar la mayor cantidad de RNA de la membrana. Los tubos con el RNA se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. La calidad del RNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

2.3.2 Cuantificación de RNA mediante el uso del Fluorómetro *Qubit*® y el kit *Quant-it*™ RNA Assay (INVITROGEN, 2010a)

Para la cuantificación de las muestras de RNA se hizo una dilución de 1 µL del stock de RNA en 50 µL de agua DEPC para evitar que las muestras se salgan del rango de detección del equipo.

Se preparó el master mix de la solución de trabajo colocando en un tubo (199 x n) µL de *Quant-it*™ RNA buffer más (1 x n) µL de *Quant-it*™ RNA Reagent para preparar la solución de trabajo; n es el número de muestras a cuantificar más los 2 estándares para calibración. La solución de trabajo se mezcló en el vórtex por 2 a 3 segundos.

Para hacer la calibración del equipo se tomaron 190 µL de la solución de trabajo y se colocó en un *Qubit*™ Assay tube. Se añadió 10 µL del *Standard # 1* (0 ng/ µL). El mismo proceso se repitió para el *Standard # 2* (10 ng/ µL). Se agitaron los tubos durante 3 segundos en el vórtex y se incubaron durante 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se procedió a la calibración siguiendo las instrucciones del equipo.

Una vez que se calibró el equipo, se prepararon las muestras para la cuantificación añadiendo 199 µL de la solución de trabajo en cada uno de los *Qubit*® Assay tubes rotulados con el nombre de las muestras. Se añadió 1 µL de la dilución 1:50

de RNA. Las muestras se agitaron en el vórtex durante 3 segundos. Se incubaron las muestras durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Se cuantificaron las muestras en el equipo calibrado y se calculó directamente las concentraciones de las diluciones 1:50 de RNA. Se repitió el procedimiento para asegurarse que las lecturas sean correctas. Para obtener el valor final de concentración de RNA se realizó un promedio de ambas lecturas. Para calcular la concentración del stock inicial de RNA se multiplicó por el factor de dilución (50), el valor promedio obtenido de las lecturas del fluorómetro.

2.4 Tratamiento del RNA con la enzima *DNase I Amplification grade* (INVITROGEN, 2010b modificado)

El tratamiento con la enzima DNAsa I elimina cualquier traza de DNA que pueda contaminar la muestra de RNA. Para ello, se colocó en un tubo de 0,2 mL: El volumen equivalente a 2,5 ug de RNA; 1 µL de *10X DNase I Reaction Buffer*; 1 µL de *DNase I Amplification Grade* y Agua DEPC hasta completar 10 µL. Las muestras se mezclaron vigorosamente en el vórtex durante 10 segundos a temperatura ambiente y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente para que la enzima actúe. Una vez transcurrido el tiempo, se detuvo la reacción con 1 µL de *25 mM EDTA (pH 8.0)* el cual es muy importante para evitar la degradación del RNA por parte de RNAsas activadas por cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} . Posteriormente, se inactivó la enzima DNAsa I incubando a 65°C por 10 minutos en el termociclador. Finalmente obtenemos un volumen total de 11 µL, en el cual hay 2,5 ug de RNA que ha sido tratado con la enzima DNAsa.

2.5 Síntesis de cDNA (Transcripción reversa) mediante el uso de la *Superscript® III Reverse Transcriptase* (INVITROGEN, 2010c modificado)

Para la reacción de síntesis de cDNA, se requiere un volumen de RNA 12 µL. Para completar dicho volumen de RNA obtenido en el paso anterior, se debe añadir agua DEPC hasta completar el volumen indicado. Al volumen completo de RNA se le añadió 1 µL de *Oligo (dt) Primer 0,5 µg/µL* (INVITROGEN™) y 1 µL de 10 mM dNTPs. Se incubó las muestras durante 5 minutos a 65°C en el termociclador. Una vez

incubadas las muestras se las sacó inmediatamente en hielo durante 1 minuto. A los tubos de las muestras enfriadas en hielo se les añadió 4 μ L de *4X First Strand Buffer*; 1 μ L de 0,1 M *DTT* y 1 μ L de *Superscript III Reverse transcriptase*. Se mezclaron vigorosamente los tubos y se incubaron a 50°C por 60 minutos, a 55°C por 15 minutos y a 70°C por 15 minutos para inactivar la enzima. El cDNA sintetizado será empleado como templado para el ensamblaje de la Real Time PCR.

2.6 Diseño de Primers

Para el diseño de los primers, se buscaron las secuencias del gen *PR-1b1* y del gen de control interno *GAPDH* en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Para el gen *PR-1b1* se encontraron 6 secuencias y para el gen *GAPDH* se encontró 1 secuencia. Para seleccionar la secuencia definitiva del gen *PR-1b1*, se tomo en cuenta las que tenían información bibliográfica completa. Las características de las secuencias definitivas se resumen en la Tabla 2.2. Las secuencias de los genes se detallan en el ANEXO B y ANEXO C.

Tabla 2.2. Secuencias halladas de los genes para el estudio.

Nombre	No. Accesoión GenBank	Definición
<i>PR-1b1</i>	Y08804	Pathogenesis-related 1b1
<i>GAPDH</i>	U97257	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

Para el diseño de primers se usó el programa en línea PRIMER 3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi). Se ingresaron las secuencias de cada uno de los genes por separado en formato FASTA. Los primers deben cumplir algunos criterios de diseño que se detallan en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Características básicas a tener en cuenta para el diseño de los primers

Característica	Valor
Tamaño del primer	20 bp
Tamaño de amplicón	Aprox. 100 bp
Temperatura de fusión	Aprox. 65°C
% G-C	20-80%

Una vez diseñados los primers, se comprobó su especificidad *in silico* mediante un análisis con el algoritmo en línea BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La verificación consistió en un único *match* del BLAST en tomate, es decir, que la única secuencia de tomate igual a la de los primers debe ser la del gen de interés. Si el algoritmo arroja más de una secuencia en tomate similar a la de los primers, estos deben ser desechados y hacer un nuevo diseño.

Luego de la comprobación de los primers, se encargó su síntesis química a la casa comercial INVITROGEN, a través de su proveedor autorizado en el país. Una vez sintetizados los primers, se reconstituyeron a una concentración de 100 μ M con agua DEPC. Se dejaron los tubos de los primers a 4°C durante 24 horas. Una vez reconstituidos, se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

2.7 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se ensambló con el reactivo SYBR® *GreenER*TM *qPCR Supermix for ABI-PRISM*® (INVITROGENTM), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante, con algunas modificaciones. Las reacciones fueron efectuadas en el equipo 7300 *Real-time PCR System* mediante el uso del software SDS v1.4 (*Sequence Detector System*) (Applied Biosystems).

Para el ensamblaje de la reacción se usaron los platos *Microamp*® *Optical 96-well Reaction Plate* (Applied Biosystems), los cuales tienen 96 tubos ópticos para la reacción de PCR en tiempo real. Los tubos fueron sellados con los adhesivos ópticos *Microamp*® *Optical Adhesive Film* (Applied Biosystems).

2.7.1 Estandarización de las condiciones de reacción de PCR en tiempo real

La estandarización de esta técnica consiste en definir las condiciones óptimas de la amplificación, tanto del gen *GAPDH* (Control interno) como del gen *PR-1b1* (Gen *target*) dentro del mismo plato de PCR en tiempo real.

Para la estandarización del protocolo de PCR en tiempo real se utilizaron plantas de la variedad “Indeterminada Alaska Lote # 368”, las cuales fueron estimuladas con una solución de ácido salicílico (SA) 1 mM para estimular la expresión del gen *PR-1b1*. Se hicieron diluciones 1:5 de los cDNAs sintetizados de estas muestras para obtener una cantidad suficiente de templado para la estandarización de la reacción de PCR en tiempo real.

Los parámetros evaluados para la estandarización de la reacción fueron la temperatura de annealing, y concentración de primers. La concentración de los otros componentes (MgCl₂, dNTPs, Buffer, *Taq* Polimersa y otros componentes) vienen optimizadas de fábrica para PCR en tiempo real.

2.7.1.1 Temperatura de Annealing

La temperatura de annealing o hibridación es la temperatura a la cual los primers se unen a su secuencia complementaria en la cadena de cDNA. La temperatura de annealing está directamente relacionada a la temperatura de fusión de los primers, la cual es generalmente 5°C mayor.

El diseño de los primers para la investigación contempló una temperatura de fusión de 65°C, por lo que se definió una temperatura de annealing inicial de 60°C. Es por ello que se definieron 4 temperaturas de annealing para estandarizar el protocolo: 50.0°C, 55.0°C, 57.5°C y 60°C. Por lo que el programa de PCR en tiempo real se definió de la siguiente manera (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Condiciones de PCR para la estandarización de la PCR en tiempo Real

Procedimiento	Temperatura	Tiempo (min)	Ciclos
Activación de UDG	50°C	2:00	1
Activación de la Taq Polimerasa	95°C	10:00	1
Denaturación	95°C	0:30	40
Annealing	50°C; 55°C; 57,5°C; 60°C	0:30	
Extensión	72°C	0:30	

Adicionalmente, se añadió un estado de disociación para asegurar que sólo exista un fragmento de amplificación. El estado consiste en incrementos de 1°C de temperatura desde 60°C hasta 95°C con intervalos de 30 segundos en cada incremento. Los datos se visualizarán en una gráfica de la primera derivada de la curva resultante a manera de picos. En los picos se podrán apreciar las temperaturas de fusión de los fragmentos resultantes.

2.7.1.2 Concentración de Primers

Para el parámetro de concentración de primers, se evaluaron dos concentraciones de primers: la primera fue de 20 nM de concentración final en reacción a partir de una concentración stock de 1 µM; la segunda fue la recomendación del fabricante del mix, es decir, 200 nM de concentración final de reacción a partir de una concentración stock de 10 µM. Al final, el perfil de reacción quedó de la siguiente manera (Tabla 2.5).

Tabla 2.5 Volúmenes de cada componente de la reacción de PCR en tiempo Real

Componente	Concentración Inicial	Volumen	Concentración en reacción
SYBR GreenER qPCR Supermix	2X	12,5 uL	1X
Primer Forward	1 μM, 10 μM	0,5 uL	20 nM, 200 nM
Primer Reverse	1 μM, 10 μM	0,5 uL	20 nM, 200 nM
Agua DEPC	-	10,5 uL	-
Total*	24 uL		

* El volumen de cDNA usado fue de 1 μL para obtener un volumen final de 25 μL

2.7.2 Ensayos de PCR en tiempo real de las variedades de tomate infectadas con *P. infestans*

Una vez que el método de PCR en tiempo real se estandarizó, se ensamblaron las reacciones de PCR en tiempo real de las variedades de tomate sometidas a la infección de *P. infestans*.

Inicialmente se ensamblaron 3 reacciones de PCR en tiempo real por cada tratamiento para el gen de control interno (*GAPDH*), con el templado de cDNA sin diluir para obtener los valores iniciales de C_t para calcular el valor del factor de dilución para un C_t en específico. Con los valores de C_t iniciales se aplicó la siguiente fórmula para obtener el factor de dilución:

$$fd = 2^{C_{t_i} - C_{t_p}}$$

Donde el valor C_{t_i} es el valor de C_t que se desea alcanzar; C_{t_p} es el valor de C_t obtenido de las reacciones de PCR en tiempo real. Con los valores de fd obtenidos, se calculó el volumen de agua para obtener el valor de C_t requerido mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$Va = (Vi \cdot fd) - Vi$$

Donde el V_a es el volumen de agua que se debe añadir al cDNA para alcanzar el valor de Ct establecido inicialmente. Con este procedimiento se buscó igualar todas las muestras en un solo Ct del gen de control interno para tener mayor homogeneidad entre los tratamientos.

Una vez que se tuvieron los cDNA diluidos a un solo valor de Ct, se planteó el experimento de PCR en tiempo real para las variedades de tomate infectadas. Para cada tratamiento evaluado se ensamblaron tres reacciones de PCR en tiempo real para minimizar el error experimental. Los datos de los valores de Ct de cada una de las reacciones se exportaron a una hoja de cálculo de Microsoft Excel para realizar el análisis.

2.8 Análisis de la expresión del gen *PR-1b1*

Para el análisis de la expresión del gen *PR-1b1* se utilizó el método de ddCt (Livak & Schmittgen, 2001). Con los valores de Ct se aplicó la fórmula de cálculo de expresión génica:

$$Exp = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_m - \Delta Ct_{cb}$$

Donde el ΔCt_m es el valor de ΔCt de las muestras a ser evaluadas; y el ΔCt_{cb} es el valor de ΔCt de la muestra calibrador. Una vez que los valores de Ct fueron calculados, se hizo una corrección logarítmica para minimizar la varianza de los valores, por la naturaleza exponencial de la curva de PCR en tiempo real.

2.9 Análisis Estadístico

El diseño experimental para este experimento fue un factorial completo 4X4 en modelo univariante, tomándose como factores fijos las variedades de tomate (4) y los tiempos de inducción (4); y como única variable dependiente la expresión génica relativa con la respectiva corrección logarítmica.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los datos obtenidos. Se hicieron pruebas de significancia de Tukey, Duncan y Scheffe, con el objetivo de encontrar subgrupos de significancia, además de gráficos de perfil de todos los parámetros. El análisis estadístico fue realizado en el paquete estadístico SPSS.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Extracción y cuantificación de RNA total de hojas de tomate

La extracción de RNA se realizó con el kit *PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System* de INVITROGEN™ según el protocolo establecido por el fabricante.

Una vez que se estandarizó y optimizó el protocolo de extracción de RNA total, se procedió a la extracción de las muestras a las 0, 24, 48 y 72 horas de incubación. Se empleó como tratamiento blanco (Cb) muestras que no habían sido inoculadas.

Con el RNA total extraído y purificado, se verificó la calidad del mismo con una electroforesis en gel de agarosa al 2%. En la Fig. 3.1 se visualiza el RNA de cada tratamiento, donde se puede apreciar bandas definidas, con ausencia de degradación. Se usó el marcador de peso molecular Track-it™ 100 bp (INVITROGEN) para estimar el tamaño de las bandas de RNA.

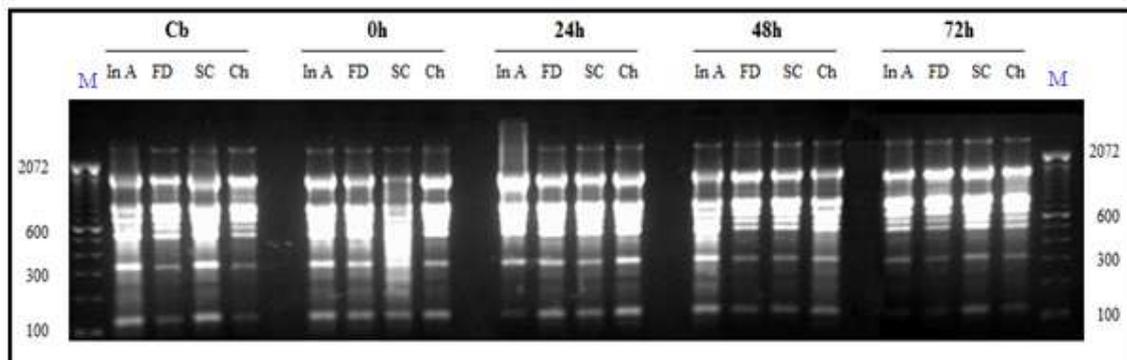


Figura 3.1. Gel de Agarosa al 2% del RNA de las variedades de tomate en cada uno de sus tratamientos: In A, Indeterminada Alaska; FD, Flora dade; SC, Santa Clara 5800; Ch, Cherry a las 0, 24, 48 y 72 horas cada una y el tratamiento blanco (Cb). M: Marcador de peso molecular de 100 bp

La cuantificación del RNA total se realizó con el kit *Quant-it™ RNA Assay* en el equipo *Qubit®* (INVITROGEN) según el protocolo establecido. Las muestras de RNA

extraído tuvieron una concentración de entre 0,5 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, lo que indica que el proceso de extracción de RNA total fue eficiente, como se indica en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Valores de cuantificación de RNA obtenidos por el fluorómetro

Tratamiento	Varietad	[C] stock ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Cb	In. Alaska	1,88
	Flora Dade	0,78
	SC 5800	2,07
	Cherry	0,56
0 horas	In. Alaska	1,56
	Flora Dade	1,27
	SC 5800	1,12
	Cherry	1,12
24 horas	In. Alaska	1,62
	Flora Dade	1,23
	SC 5800	1,05
	Cherry	1,36
48 horas	In. Alaska	1,27
	Flora Dade	0,94
	SC 5800	0,79
	Cherry	1,28
72 horas	In. Alaska	0,85
	Flora Dade	0,65
	SC 5800	1,25
	Cherry	0,64

Las muestras de RNA obtenidas en la extracción presentaron valores adecuados para la investigación, sin embargo, es necesario asegurar que estas muestras no presenten DNA contaminante (banda sobre las 2072 bp en la Fig. 3.1.). Por esta razón, es imprescindible realizar el tratamiento del RNA extraído con la enzima DNAsa I para eliminar la contaminación del mismo con DNA genómico.

El tratamiento se lo realizó con la enzima *DNase I Amplification grade* (INVITROGEN™). El protocolo del fabricante recomienda utilizar 1 μL de DNAsa por cada μg de RNA para hacer el tratamiento, pero se decidió estandarizar las cantidades de enzima DNAsa. Luego de los ensayos de estandarización se determinó que 0,4 μL de DNAsa por cada μg de RNA era ideal para obtener buenos resultados. En la Fig. 3.2 se puede observar la ausencia de la banda de DNA contaminante sobre las 2072 bp en un ensayo realizado con la variedad “Indeterminada Alaska” estimulada con ácido salicílico.

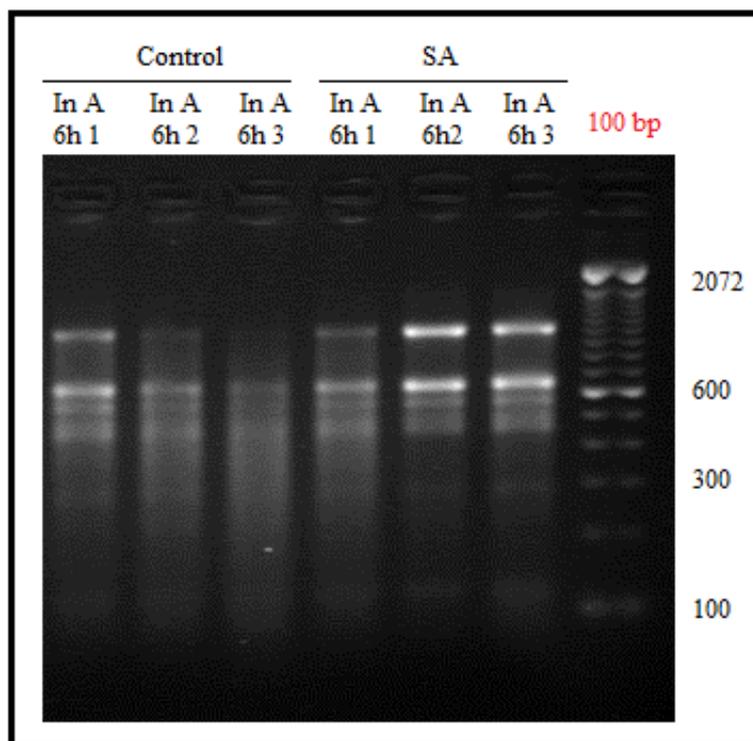


Figura 3.2. Gel de agarosa al 2% de 2,5 μ g de RNA tratado con la enzima DNAsa I en la que se puede observar la ausencia de la banda de DNA contaminante sobre las 2072 bp.

3.2 Síntesis de cDNA a partir del RNA extraído

La técnica de cuantificación de la expresión génica requiere la utilización de cDNA, que actuará como templado en la reacción de PCR en tiempo real. La calidad del cDNA obtenido, depende de la cantidad y calidad de mRNA que se haya extraído en pasos anteriores.

Por este motivo, la obtención de un cDNA de alta calidad, así como la eliminación del DNA contaminante son parámetros muy importantes para la obtención de buenos resultados en la cuantificación de la expresión génica, ya que la técnica de PCR en tiempo real es muy exigente en cuanto a la calidad de los materiales utilizados y cualquier variación en ellos puede alterar los resultados finales.

La cantidad inicial de RNA recomendada para la síntesis de cDNA fue de 2,5 μ g, es por ello que, para los ensayos realizados se tomaron los volúmenes de RNA

equivalentes para cada tratamiento con la enzima DNAsa I. Con un volumen de reacción de 10 μL se obtuvo un volumen final de 11 μL (adicionado 1 μL de EDTA 25 mM), como se indica en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Volúmenes de muestra y reactivos para el tratamiento de DNAsa I (Volumen final de reacción: 10 μL + 1 μL de EDTA 25 mM)

Tiempos	Variedad	[C] stock ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Vol. 2,5 μg RNA (μL)	Vol. agua (μL)	Vol. buffer (μL)	Vol. DNAsa (μL)
Cb	In A	1,88	1,33	6,67	1	1
	FD	0,78	3,21	4,79	1	1
	SC5800	2,07	1,21	6,79	1	1
	Ch	0,56	4,46	3,54	1	1
0 horas	In A	1,56	1,6	6,4	1	1
	FD	1,27	1,97	6,03	1	1
	SC5800	1,12	2,23	5,77	1	1
	Ch	1,12	2,23	5,77	1	1
24 horas	In A	1,62	1,54	6,46	1	1
	FD	1,23	2,03	5,97	1	1
	SC5800	1,05	2,38	5,62	1	1
	Ch	1,36	1,84	6,16	1	1
48 horas	In A	1,27	1,97	6,03	1	1
	FD	0,94	2,66	5,34	1	1
	SC5800	0,79	3,16	4,84	1	1
	Ch	1,28	1,95	6,05	1	1
72 horas	In A	0,85	2,94	5,06	1	1
	FD	0,65	3,85	4,15	1	1
	SC5800	1,25	2	6	1	1
	Ch	0,64	3,90	4,1	1	1

La síntesis del cDNA se llevó a cabo mediante el uso de la enzima *Superscript® III Reverse Transcriptase* (INVITROGEN) según el protocolo modificado del fabricante. La síntesis se realizó con los 2,5 μg de RNA que se trataron con la enzima DNAsa I. La calidad del cDNA se verificó directamente con la PCR en tiempo real.

3.3 Diseño de Primers

Los primers específicos para cada uno de los genes fueron diseñados para generar fragmentos de aproximadamente 100 bp, con una temperatura de fusión de aproximadamente 65°C. El programa PRIMER 3 dio como resultado 5 posibles pares de

primers, de los cuales se escogió la primera opción para cada uno de los genes (Fig 3.3a y 3.3b).

Primer3 Output								a)
No mispriming library specified								
Using 1-based sequence positions								
OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>	
LEFT PRIMER	616	20	64.35	55.00	4.00	0.00	CCATGACTGCCACCCAGAAA	
RIGHT PRIMER	717	20	64.39	65.00	7.00	1.00	CTGCACCAGTGCTGCTAGGG	
SEQUENCE SIZE: 1285								
INCLUDED REGION SIZE: 1285								
PRODUCT SIZE: 102, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00								

Primer3 Output								b)
No mispriming library specified								
Using 1-based sequence positions								
OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>	
LEFT PRIMER	899	20	64.64	55.00	4.00	1.00	GGCATCCCCGAGCACAAAAC	
RIGHT PRIMER	1007	20	65.17	65.00	6.00	3.00	CCTCCCCGTGAAGTCACCAC	
SEQUENCE SIZE: 1136								
INCLUDED REGION SIZE: 1136								
PRODUCT SIZE: 109, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00								

Figura 3.3 Datos de la selección de primers del software PRIMER 3: a) gen *GAPDH*; b) gen *PR-1b1*.

El análisis de las secuencias de los primers resultantes de los genes *GAPDH* y *PR-1b1* con el algoritmo BLAST nos dio como resultado buenos coeficientes de especificidad para cada una de las secuencias de los primers escogidos. Las características de los primers seleccionados y sintetizados se detallan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Características de los primers diseñados

Gen	No. GenBank	Codificación	Secuencia	Tm (°C)	Peso
<i>GAPDH</i>	U97257	GAPDH(FR)fw	5'-CCATGACTGCCACCCAGAAA-3'	64,35	109 bp
		GAPDH(FR)rv	3'-CTGCACCAGTGCTGCTAGGG-5'	64,39	
<i>PR-1b1</i>	Y08804	PR1b1(SAET/FR)fw	5'-GGCATCCCCGAGCACAAAAC-3'	64,64	102 bp
		PR1b1(SAET/FR)rv	3'-CCTCCCCGTGAAGTCACCAC-5'	65,17	

3.4 Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real para la amplificación de los fragmentos de los genes *GAPDH* y *PR-1b1*

Una vez que se han obtenido los primers específicos para la amplificación de los genes *GAPDH* y *PR-1b1*, así como la extracción del RNA y la síntesis del cDNA se procedió a la estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos de dichos genes.

Los parámetros que se probaron para la estandarización de la reacción de PCR en tiempo real fueron la temperatura de annealing y la concentración de primers. Para la estandarización de la técnica se utilizó la variedad “Indeterminada Alaska”, en la cual fue inducida la expresión del gen *PR-1b1* mediante la adición de una solución de ácido salicílico (SA) 1 mM durante 24 horas.

3.4.1 Temperatura de annealing

Para definir la mejor temperatura de annealing de los primers, se partió de la temperatura de fusión de los primers, la cual es aproximadamente 65°C y se varió en un rango de -10°C bajo los 60°C. Las temperaturas que se evaluaron fueron: 50°C, 55°C, 57,5°C y 60°C. Las reacciones se ensamblaron a una concentración final de primers de 20 nM.

A los 50°C se puede constatar que ninguno de los fragmentos amplificó al no formarse curvas de PCR en tiempo real. Al verificarse que 50°C como temperatura de annealing no producía buenos resultados, se probó la reacción con 55°C obteniéndose una mejora sustancial en las curvas de ambos genes. La temperatura de annealing de 55°C arrojó buenos resultados en cuanto a la amplificación, sin embargo, se decidió probar el resto de temperaturas propuestas para la estandarización. El siguiente paso consistió en efectuar a la temperatura de annealing de 57,5°C, con la cual también se obtuvo una buena amplificación de ambos fragmentos. Por último, con la temperatura de annealing de 60°C se obtuvieron curvas de amplificación. Si bien se pudo observar que a 60°C se produjo una cantidad de fluorescencia importante, esta bajó con respecto

a las otras temperaturas probadas, evidenciándose una disminución en la eficiencia de la PCR en tiempo real.

Finalmente, se escogió la temperatura de 55°C como la temperatura de annealing óptima de la reacción para los dos genes: *GAPDH* (Fig. 3.4a) y *PR-1b1* (Fig. 3.4b), al presentar un mejor índice de fluorescencia que las demás temperaturas, lo que indica una mayor eficiencia en la reacción de PCR.

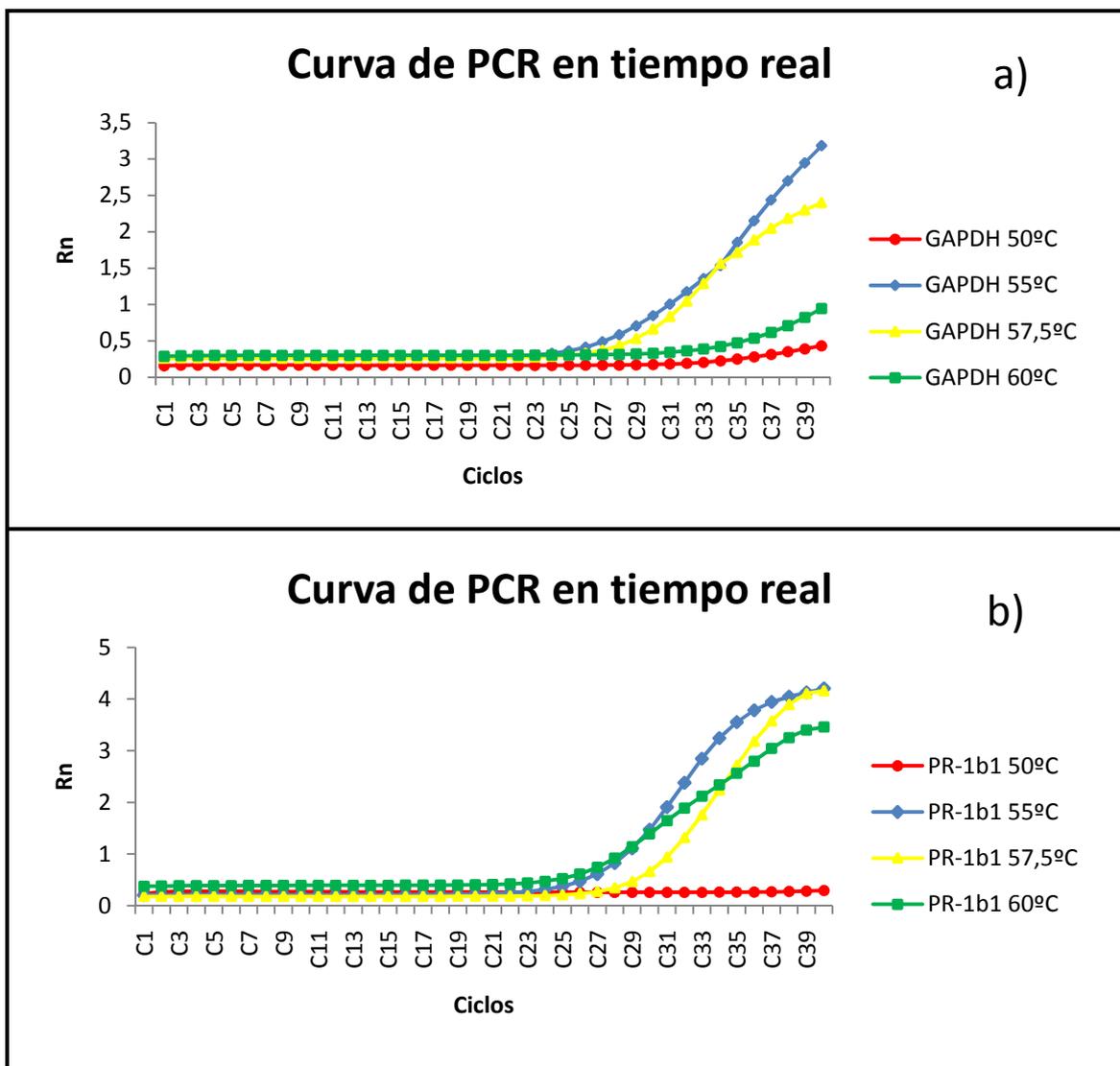


Figura 3.4. Curvas de amplificación de PCR en tiempo real: a) gen *GAPDH*; b) gen *PR-1b1*, con las temperaturas de annealing de 50°C; 55°C; 57,5°C y 60°C, en donde se puede evidenciar que la curva a 55°C de cada gen presenta la mayor cantidad de fluorescencia.

De acuerdo a las figuras anteriores, se llegó a determinar que la temperatura de annealing óptima para la reacción es de 55°C, por lo que el programa de PCR en tiempo real quedó de la siguiente manera (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Programa final para la PCR en tiempo real

Procedimiento	Temperatura	Tiempo (min)	Ciclos
Activación de UDG	50°C	2:00	1
Activación de la Taq Polimerasa	95°C	10:00	1
Denaturación	95°C	0:30	40
Annealing	55°C	0:30	
Extensión	72°C	0:30	

3.4.2 Concentración de primers

Para definir la concentración óptima de los primers, se probó una concentración final en reacción de 20 nM .Además, se probó también la concentración de primers recomendada por el fabricante del mix de PCR en tiempo real, es decir, una concentración final en reacción de 200nM. Las reacciones de PCR se ensamblaron con una temperatura de annealing de 55°C, la cual se escogió como la óptima en el proceso anterior.

Con la concentración final en reacción de 20 nM, se pudo observar fragmentos de amplificación, aunque la fluorescencia presentada por los mismos fue baja. En cambio, con la concentración final de 200 nM se pudo observar un aumento significativo en la fluorescencia emitida por los fragmentos de amplificación.

Se escogió la concentración final de 200 nM, como la concentración óptima de primers para la reacción de amplificación de los dos genes: *GAPDH* (Fig. 3.5a) y *PR-1b1* (Fig. 3.5b), ya que superó de manera significativa la fluorescencia emitida por la reacción con la otra concentración.

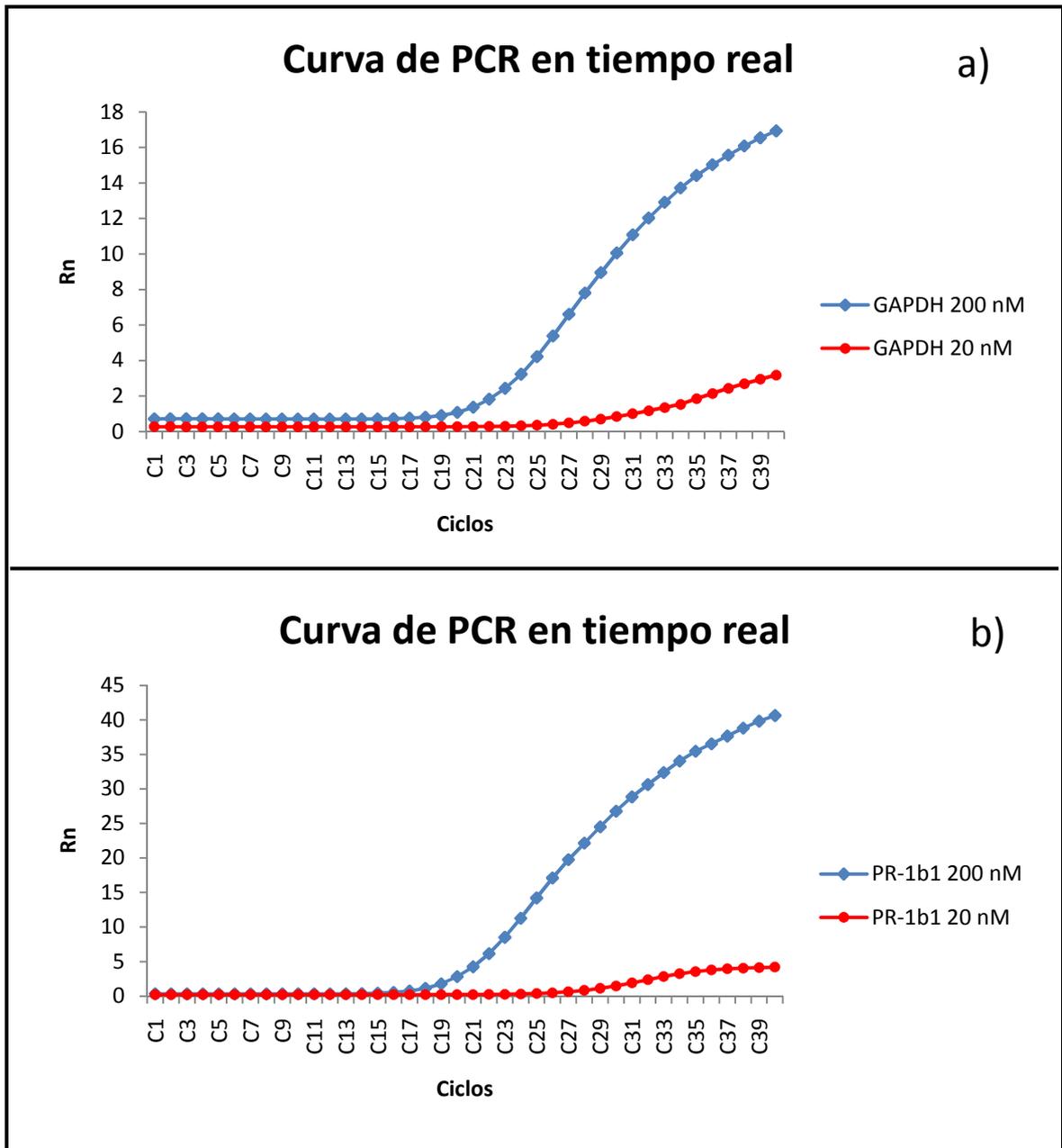


Figura 3.5. Curvas de amplificación de PCR en tiempo real: a) gen GAPDH; b) gen *PR-1b1*, con concentraciones finales de primers de 20 nM y 200 nM, en donde se puede evidenciar que la curva a 55°C de cada gen presenta la mayor cantidad de fluorescencia.

De acuerdo a las figuras anteriores, se determinó que la concentración óptima de primers para la reacción es de 200 nM, por lo que las condiciones de reacción para la PCR en tiempo real quedan de la siguiente manera (Tabla 3.5).

Tabla 3.5 Condiciones finales de reacción de PCR en tiempo real

Componente	Concentración Inicial	Volumen	Concentración en reacción
SYBR GreenER qPCR Supermix	2X	12,5 uL	1X
Primer Forward	10 μM	0,5 uL	200 nM
Primer Reverse	10 μM	0,5 uL	200 nM
Agua DEPC	-	10,5 uL	-
Total*		24 ul	

* El volumen de cDNA usado fue de 1 μ L para obtener un volumen final de 25 μ L

3.4.3 Análisis de disociación

El análisis de disociación se lo realizó para verificar la presencia de un solo fragmento de amplificación en la reacción de PCR en tiempo real. Los datos se presentaron como la primera derivada de la curva de disociación del fragmento. La presencia de un solo fragmento de amplificación en la reacción de PCR en tiempo real se verificó con la observación de un pico en el análisis de disociación por cada uno de los genes evaluados en el estudio.

Los análisis de disociación de las reacciones de PCR en tiempo real demostraron la presencia de un fragmento para el gen *GAPDH* y un fragmento para el gen *PR-1b1* (Fig. 3.6).

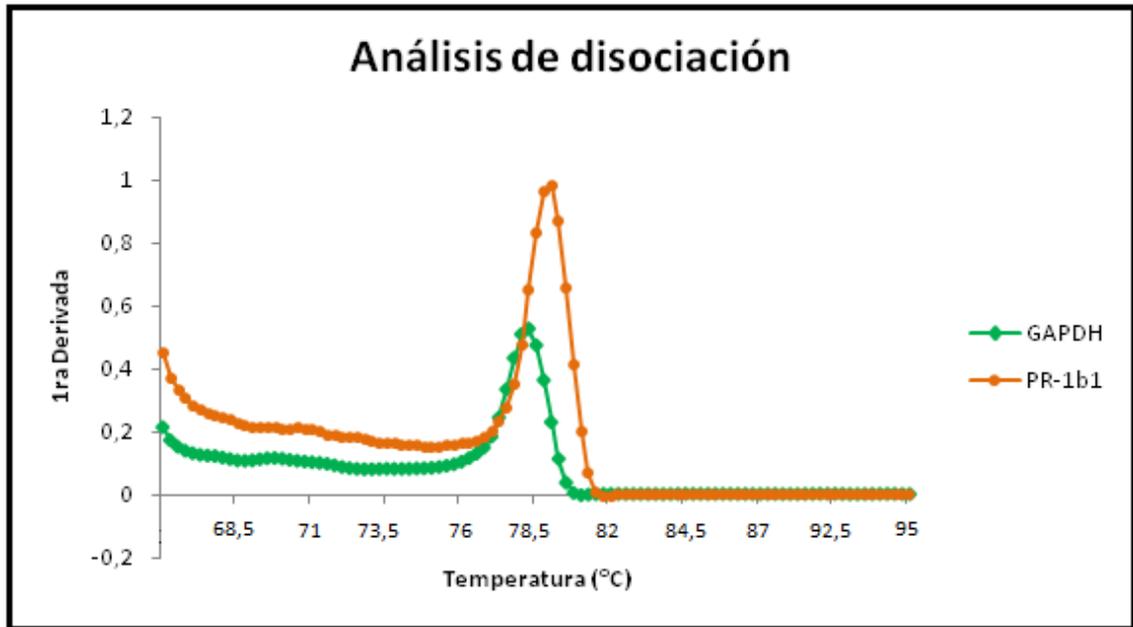


Figura 3.6. Análisis de disociación del fragmento de amplificación del gen *GAPDH* y el gen *PR-1b1*

Además del análisis de disociación, se verificó la presencia de un solo fragmento de amplificación de cada uno de los genes a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Fig. 3.7).

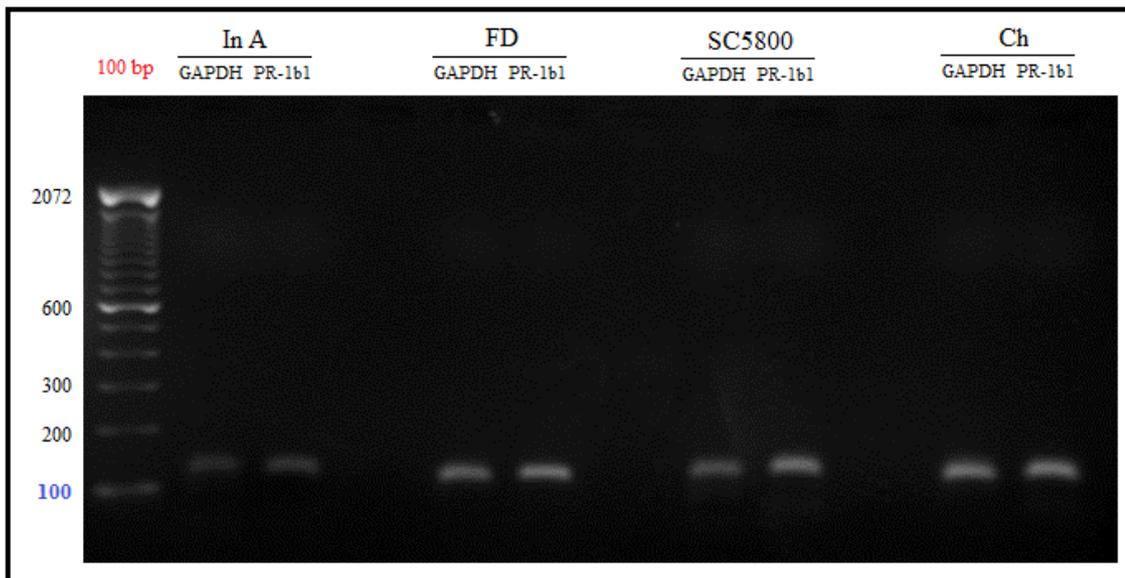


Figura 3.7. Gel de agarosa al 2% de los productos de la PCR en tiempo real. Los fragmentos están entre 100 y 120 bp aproximadamente, según el marcador molecular de 100 bp.

3.4.4 Control negativo

Los controles negativos se implementaron para comprobar que los reactivos utilizados durante la PCR en tiempo real no presentan contaminación de DNA. Los controles negativos en este caso consistieron en reacciones de PCR en tiempo real con agua DEPC en lugar de cDNA. Las reacciones de los controles negativos de cada uno de los genes se pueden verificar en la Fig 3.8.

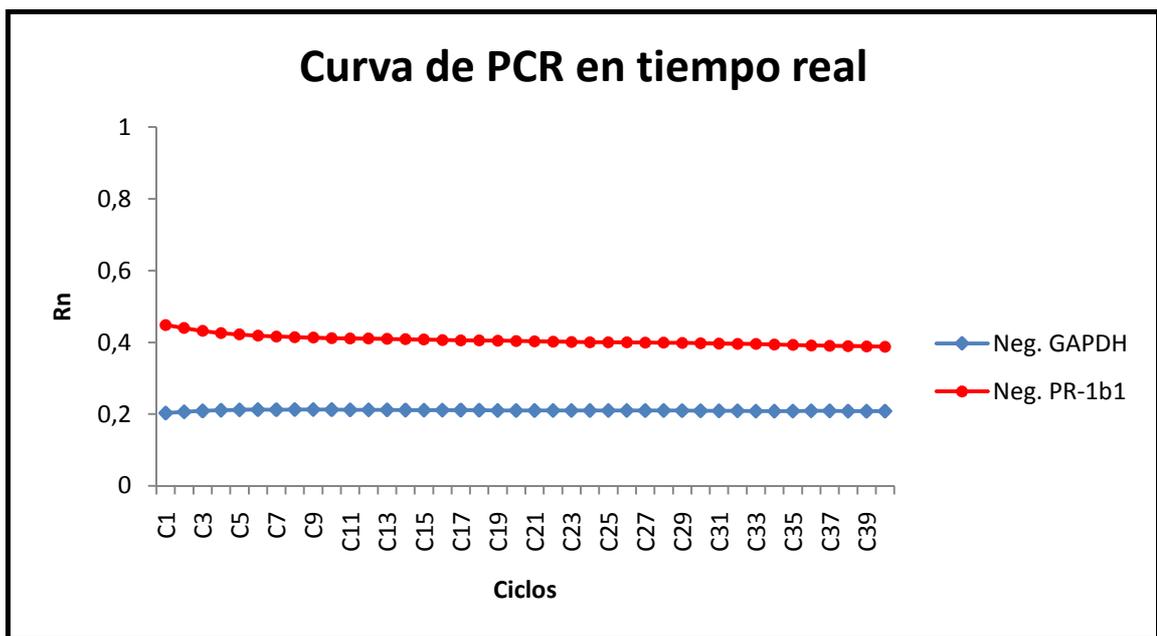


Figura 3.8. Curvas de amplificación de los controles negativos de *GAPDH* (Azul) y *PR-1b1* (Rojo), las cuales indican la ausencia de fragmentos.

Con estas curvas que indican la ausencia de contaminación, se puede proceder al ensamblaje de las reacciones de PCR en tiempo real de los tratamientos que van a ser evaluados.

3.5 Ensayos de PCR en tiempo real de las variedades de tomate infectadas con *P. infestans*

Una vez que el protocolo de PCR en tiempo real se ha estandarizado, se ensamblaron las reacciones de PCR en tiempo real de las variedades de tomate evaluadas a las 0, 24, 48 y 72 horas de incubación con el patógeno *Phytophthora infestans*.

Inicialmente las reacciones de PCR en tiempo real se ensamblaron para amplificar el fragmento del gen *GAPDH* con las muestras de cDNA sin diluir para calcular los factores de dilución e igualar las muestras al Ct de 20 que fue el predeterminado para los cálculos de expresión génica. Los volúmenes de las muestras se detallan a continuación en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Valores de *fd* y volúmenes de las muestras de cDNA.

Variedad	Tiempos	Ct Promedio	<i>fd</i>	Va (μL)	Vf (μL)
In A	0 horas	17,13	7,31	107,28	124,28
	24 horas	16,02	15,78	251,26	268,26
	48 horas	18,09	3,76	46,89	63,89
	72 horas	17,05	7,73	114,37	131,37
FD	0 horas	17,24	6,77	98,16	115,16
	24 horas	16,89	8,63	129,78	146,78
	48 horas	16,71	9,78	149,28	166,28
	72 horas	17,03	7,84	116,20	133,20
SC5800	0 horas	18,02	3,94	50,06	67,06
	24 horas	16,80	9,19	139,22	156,22
	48 horas	16,39	12,21	190,57	207,57
	72 horas	17,96	4,11	52,91	69,91
Ch	0 horas	16,95	8,28	101,95	115,95
	24 horas	16,49	11,39	176,67	193,67
	48 horas	17,88	4,35	56,90	73,90
	72 horas	17,65	5,10	69,67	86,67

En la variedad “Indeterminada Alaska” (In A) (Fig. 3.9) se pudo verificar que las muestras de 0 y 24 horas tienen un valor de Ct alto siendo similares entre ellos. Con respecto a las muestras a 48 y 72 horas de incubación, estas presentaron valores de Ct más bajos que los anteriores y también son similares entre ellos (Fig. 3.9).

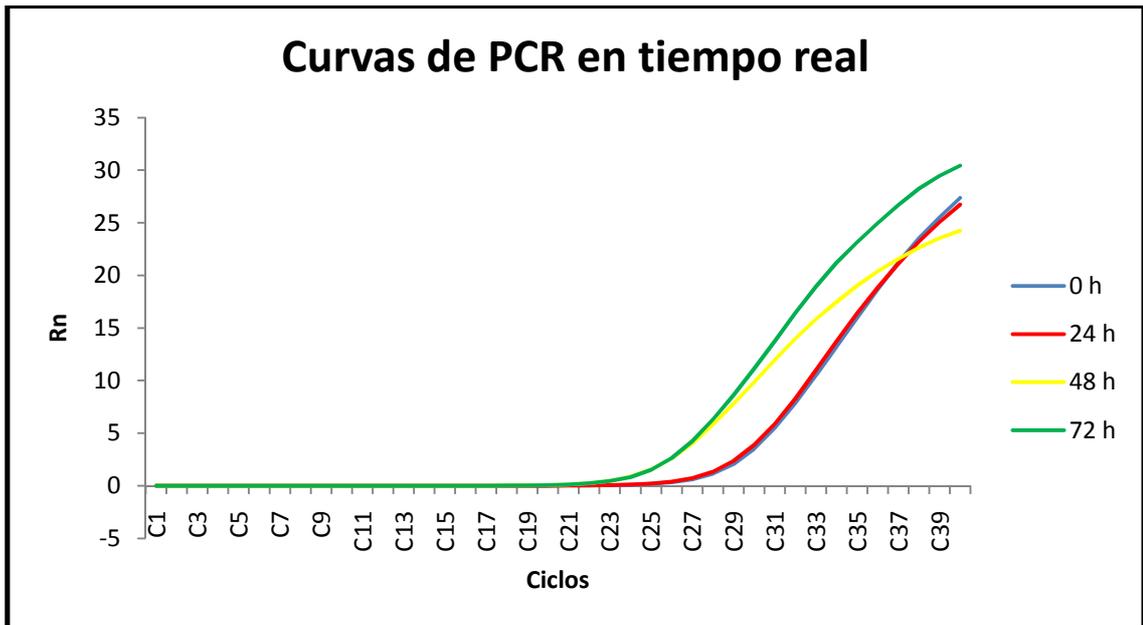


Figura 3.9. Curvas de PCR en tiempo real de las muestras de cDNA de la variedad “Indeterminada Alaska” (In A).

En la variedad “Flora Dade” (FD) (Fig. 3.10) se pudo verificar que todas las muestras tienen un valor de Ct similar entre ellos, lo que indica que todas las muestras tienen aproximadamente la misma cantidad de mRNA del gen *PR-1b1*.

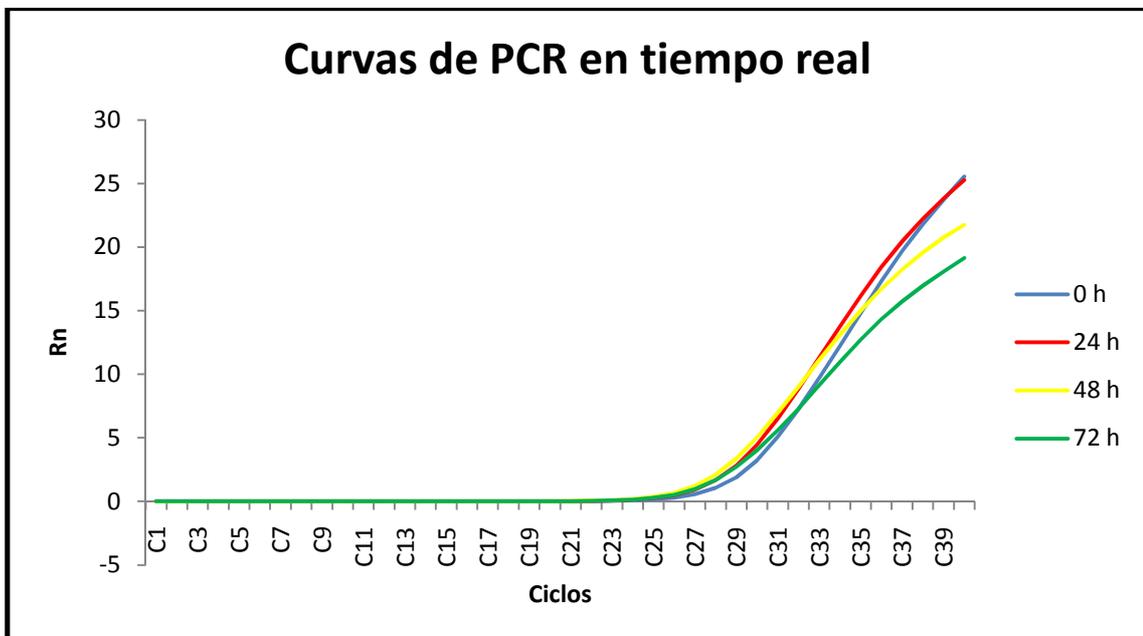


Figura 3.10. Curvas de PCR en tiempo real de las muestras de cDNA de la variedad “Flora Dade” (FD).

En la variedad “Santa Clara 5800” (SC5800) (Fig. 3.11) se pudo verificar que todas las muestras tienen un valor de Ct similar entre ellas, excepto la muestra a las 72 horas de incubación, que presentó un valor de Ct más alto que las demás muestras.

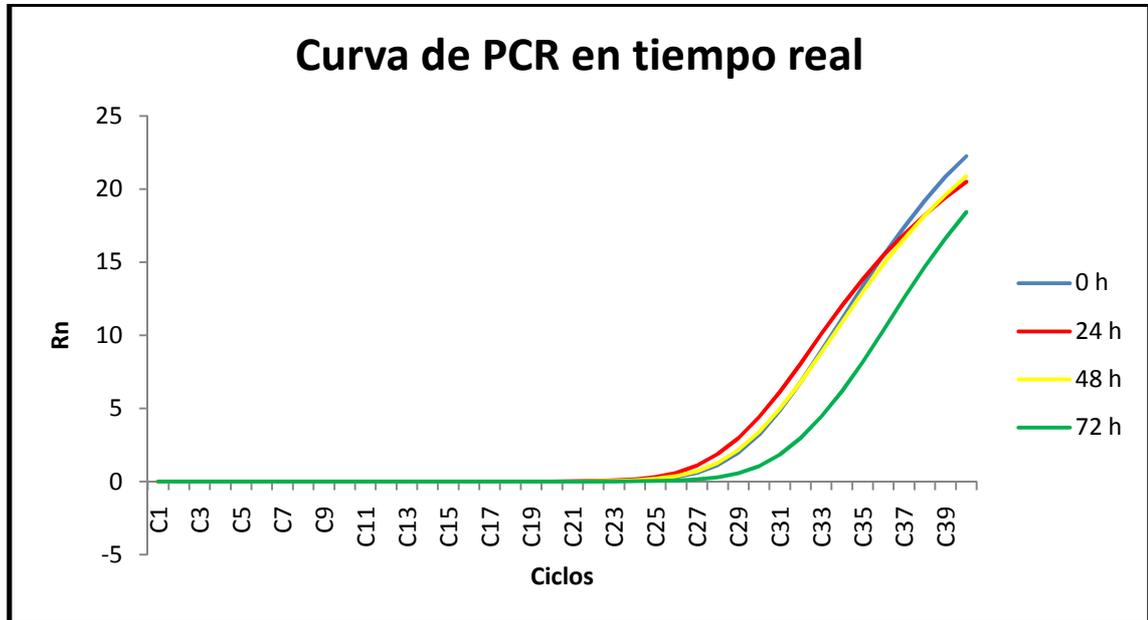


Figura 3.11. Curvas de PCR en tiempo real de las muestras de cDNA de la variedad “Santa Clara 5800” (SC5800).

En la variedad “Cherry” (Ch) (Fig. 3.12) se pudo verificar que las muestras de 0 y 48 horas tienen un valor de Ct bajo y además son similares entre ellos con respecto a las muestras a 24 y 72 horas de incubación, las cuales tienen valores de Ct mayores que los anteriores y también son similares entre ellos.

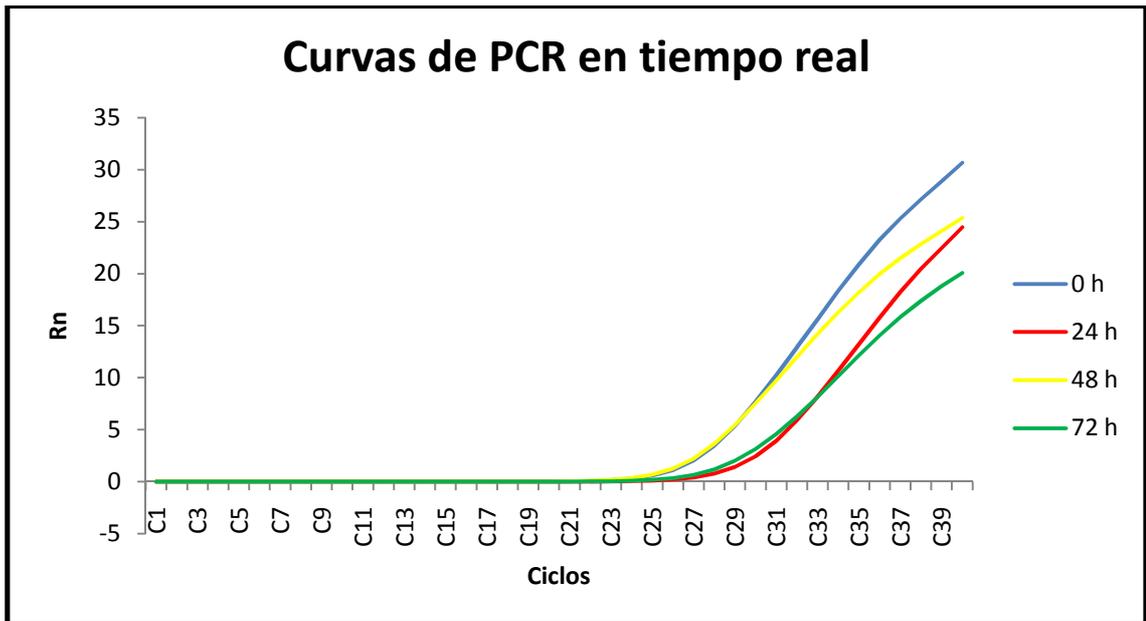


Figura 3.12. Curvas de PCR en tiempo real de las muestras de cDNA de la variedad “Cherry” (Ch).

Los valores de Ct más bajos indican que la cantidad de templado, es decir, el cDNA obtenido a partir del mRNA del gen evaluado es mayor que la cantidad de templado de las muestras que presentan valores de Ct más altos.

Con los valores de Ct obtenidos de cada una de las muestras se realizaron los cálculos de expresión génica mediante la aplicación del método del ddCt (Livak & Schmittgen, 2001).

3.6 Cálculo de la expresión del gen *PR-Ib1* de las muestras de tomate inoculadas con el patógeno *P. infestans*, mediante el método de ddCt

Para el cálculo de la expresión génica se utilizó la fórmula propuesta por Livak y Schmittgen en 2001:

$$Exp = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{cb}$$

$$\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{hk\ gen}$$

La fórmula se aplicó con los valores de Ct de las muestras obtenidos después de la reacciones de PCR en tiempo real. Posteriormente, a los resultados de los cálculos se les aplicó una corrección logarítmica para linearizar los datos y homogenizar las varianzas. Los valores se mostraron en un diagrama de barras (Fig. 3.13).

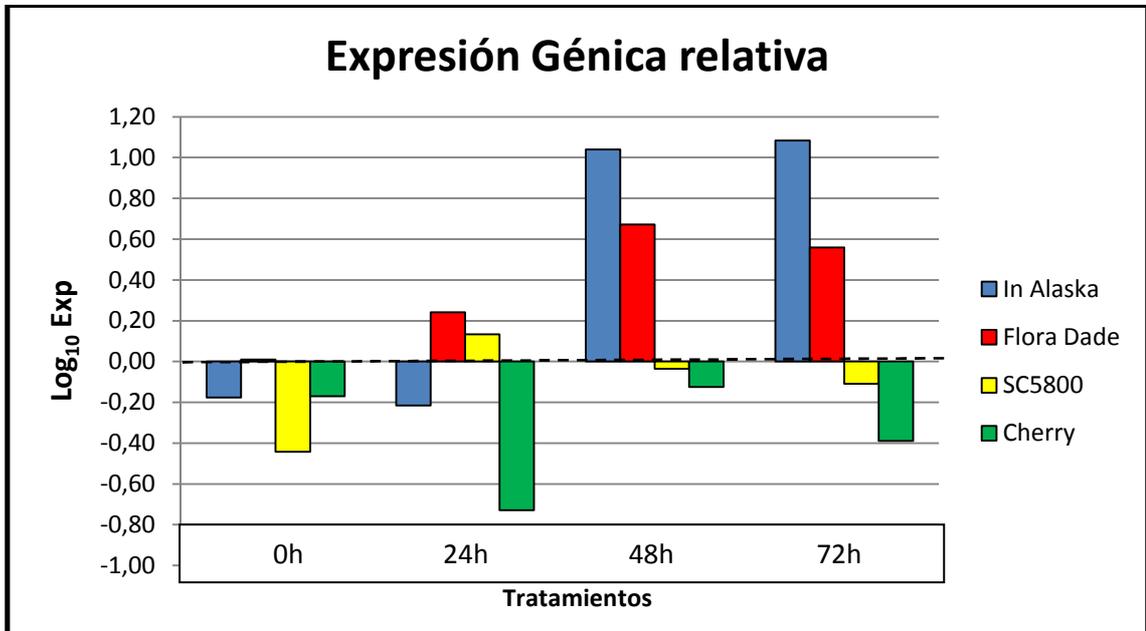


Figura 3.13. Diagrama de Barras de la expresión génica relativa de todas las variedades evaluadas.

En la variedad “Indeterminada Alaska” (In) se pudo observar que los índices de expresión se mantuvieron bajos en los dos primeros tratamientos de 0 y 24 horas. Posteriormente la expresión se elevó en gran medida a las 48 horas y finalmente se mantuvo alta en el transcurso de las 72 horas de incubación (Fig. 3.13).

En la variedad “Flora Dade” (FD) se pudo observar que el índice de expresión es bajo a las 0 horas de inducción. Posteriormente la expresión se elevó gradualmente a las 24 horas de inducción alcanzando su máximo pico a las 48 horas de incubación y finalmente el índice de expresión descendió a las 72 horas de incubación (Fig. 3.13).

En la variedad “Santa Clara 5800” (SC5800) se pudo observar que el índice de expresión es muy bajo a las 0 horas de inducción. Después, la expresión se elevó sustancialmente a las 24 horas de inducción, alcanzando su máximo nivel.

Posteriormente el índice de expresión génica descendió a las 48 horas y 72 horas de incubación (Fig. 3.13).

Y por último, en la variedad “Cherry” (Ch) se pudo observar que el índice de expresión es muy bajo en todos los tiempos de incubación del patógeno. Los niveles de los tratamientos se mantuvieron irregulares, presentándose niveles altos a las 0 y 48 horas de inducción y más bajos a las 24 y 72 horas de inducción, lo que indica una estimulación insuficiente para una expresión significativa (Fig. 3.13).

Finalmente se pudo comprobar, que la variedad que presenta un mayor nivel de expresión génica relativa es la variedad “Indeterminada Alaska”, seguida de la variedad “Flora Dade”, “Santa Clara 5800” y por último la variedad “Cherry”.

3.7 Análisis Estadístico

3.7.1 Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza (ANOVA) del diseño factorial indicó que existen diferencias significativas entre las variedades y también en los tiempos de incubación, puesto que el valor p del análisis de varianza no supera el 5% de significancia (Tabla 3.7), lo que significa que se rechaza la hipótesis nula que indica que no existen diferencias entre las variedades y los tiempos de incubación, inclinándose el resultado a favor de la hipótesis alternativa.

Tabla 3.7. Análisis de Varianza ANOVA de los tratamientos

Variable dependiente: Valor de Expresión génica relativa					
Fuente	S.C	G.L.	Media cuadrática	F	Valor p
<i>Variedad</i>	3,471	3	1,157	5,436	0,009**
<i>Tiempo</i>	2,100	3	0,700	3,289	0,048*
<i>Variedad x Tiempo</i>	2,422	9	0,269	1,264	0,327 ^{n.s.}
<i>Error</i>	3,405	16	0,213		
<i>Total</i>	11,625	32			

** Altamente significativo

* Significativo

^{n.s.} No significativo

El análisis de varianza (ANOVA) indica que las variedades presentaron diferencias altamente significativas entre ellas, mientras que entre los tiempos de inducción solamente se presentaron diferencias significativas entre ellos. En la interacción “Variedad x Tiempo” las diferencias no presentaron significancia entre ellas. El gráfico de perfil de las variedades y tiempos de incubación evaluados (Fig. 3.14) se confirmó los datos arrojados por el análisis de varianza (ANOVA).

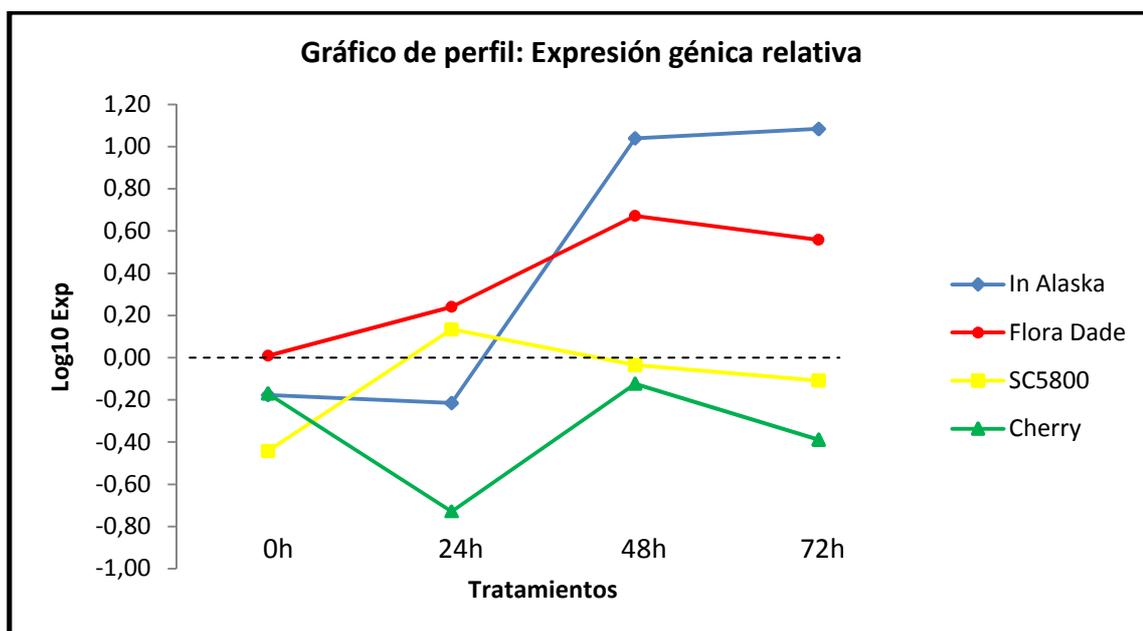


Figura 3.14. Gráfico de perfil de las variedades y tiempos de incubación evaluados.

3.7.2 Pruebas de rango múltiple

Las pruebas de rango múltiple señalaron que en el parámetro “Variedad” existen dos subconjuntos de confianza según las pruebas de Tukey y Scheffé, en las cuales las variedades “Indeterminada Alaska”, “Flora Dade” y “Santa Clara 5800” se agruparon en el subconjunto 2, mientras que la variedad “Cherry” se agrupó en el subconjunto 1. La variedad “Santa Clara 5800” puede incluirse en ambos subconjuntos de confianza, puesto que las dos variedades de este subconjunto presentaron niveles de expresión génica bajos.

La prueba de Duncan agrupó los tratamientos en tres subconjuntos de confianza, donde las variedades “In Alaska” y “Flora Dade” se agruparon en el subconjunto 3. Las variedades “Flora Dade” y “Santa Clara 5800” se agruparon en el subconjunto 2. Las variedades “Santa Clara 5800” y “Cherry” se agruparon en el subconjunto 1. Las variedades “Flora Dade” y “Santa Clara 5800” se agruparon en dos subconjuntos diferentes por la flexibilidad que otorga la prueba de Duncan. La inclusión en cada uno de los grupos depende de las necesidades de la investigación.

Según las pruebas de rango múltiple efectuadas al parámetro “Variedad”, la variedad con mayor nivel de expresión génica es “Indeterminada Alaska”, mientras que la variedad con menor nivel de expresión génica es “Cherry”. Los subconjuntos de confianza generados del parámetro “Variedades” se detallan en la tabla 3.8.

Tabla 3.8. Subconjuntos de confianza generados por las pruebas de rango múltiple para el parámetro “Variedad”

Prueba	Variedad de Tomate	N	Subconjunto		
			3	2	1
DHS de Tukey(a,b)	Cherry	8	-0,353		
	Santa Clara 5800	8	-0,113	-0,113	
	Flora Dade	8		0,370	
	Indeterminada Alaska	8		0,433	
Duncan(a,b)	Cherry	8	-0,353		
	Santa Clara 5800	8	-0,113	-0,113	
	Flora Dade	8		0,370	0,370
	Indeterminada Alaska	8			0,433
Scheffe(a,b)	Cherry	8	-0,353		
	Santa Clara 5800	8	-0,113	-0,113	
	Flora Dade	8		0,370	
	Indeterminada Alaska	8		0,433	

- a) Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8
- b) Alfa = 0,05

Para el parámetro “Tiempo de incubación” existe un solo subconjunto de confianza según las pruebas de Tukey y Scheffé, donde el tiempo de incubación en el cual se presenta un menor nivel de expresión génica es “0 horas”, mientras que el tiempo en el cual se presenta un mayor nivel de expresión génica es “48 horas”.

La prueba de Duncan generó dos subconjuntos de confianza, donde los tiempos de incubación de “48 horas” y “72 horas” se agruparon en el subconjunto 2, mientras que los tiempos de incubación de “0 horas”, “24 horas” y “72 horas” se agruparon en el subconjunto 1. El tiempo de incubación “72 horas” se agrupó en dos subconjuntos diferentes por la flexibilidad que otorga la prueba de Duncan. La inclusión en cada uno de los grupos depende igualmente de las necesidades de la investigación.

Según las pruebas de rango múltiple efectuadas al parámetro “Tiempo de incubación”, El tiempo en el cual se presenta un mayor nivel de expresión génica es “48 horas, mientras que el tiempo de incubación en el cual se presenta un menor nivel de expresión génica es “0 horas” Los subconjuntos de confianza generados del parámetro “Tiempo de incubación” se detallan en la tabla 3.9.

Tabla 3.9. Subconjuntos de confianza generados por las pruebas de rango múltiple para el parámetro “Tiempo de incubación”

Prueba	Tiempo de incubación	N	Subconjunto	
			2	1
DHS de Tukey(a,b)	0 horas	8	-0,195	
	24 horas	8	-0,142	
	72 horas	8	0,286	
	48 horas	8	0,388	
Duncan(a,b)	0 horas	8	-0,195	
	24 horas	8	-0,142	
	72 horas	8	0,286	0,286
	48 horas	8		0,388
Scheffe(a,b)	0 horas	8	-0,195	
	24 horas	8	-0,142	
	72 horas	8	0,286	
	48 horas	8	0,388	

- a) Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8
b) Alfa = 0,05

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Extracción y purificación de RNA

La extracción de RNA se realizó de hojas frescas de tomate colectadas de los tratamientos a 0, 24, 48 y 72 horas de incubación con el oomycete *Phytophthora infestans*.

Es imprescindible que el RNA extraído sea de buena calidad, ya que este paso influye en gran medida en la eficiencia de la reacción de síntesis de cDNA y en consecuencia, la reacción de PCR en tiempo real. En la Fig. 3.1 del capítulo de resultados se pudo evidenciar que el proceso de extracción produjo un RNA total limpio, libre de degradación y con muy poca cantidad de DNA contaminante (Kubista, *et al.*, 2006). Las características más importantes que influyen en la eficiencia de la extracción de RNA son el tamaño del tejido, la cantidad de células que existen en el mismo, la localización y plegamiento del tejido y de la estructura, distribución y concentración las proteínas dentro de las células (Bustin, 2002; Kubista, *et al.*, 2006).

Un factor adicional a tener en cuenta es la cantidad exacta de RNA con la que se cuenta para el análisis de expresión génica. Cantidades diferentes de RNA entre cada una de las muestras puede suponer una sobreestimación o una subestimación de la cantidad de RNA que se usa como material para la síntesis de cDNA el cual es templado que se utiliza para la PCR en tiempo real.

La eliminación del DNA contaminante de las muestras de RNA extraído es un requisito indispensable para los análisis de expresión génica (Čikoš, *et al.*, 2007). En tecnologías como SYBR, empleada en la presente investigación, la presencia de cualquier DNA dentro de las muestras de RNA puede resultar fuente de amplificación inespecífica en la reacción de PCR en tiempo real. Estas amplificaciones se deben a que el fluorocromo de este reactivo se une inespecíficamente a cualquier fragmento de DNA de cadena doble (dsDNA), lo que puede resultar en una sobreestimación de la expresión génica, resultando en un falso positivo. En el presente estudio, la aplicación de la enzima DNasa a las muestras de RNA extraído evita la presencia de DNA

contaminante de las mismas, evidenciándose así en la ausencia de bandas de DNA contaminante en la electroforesis (Fig. 3.2 del capítulo Resultados). Este paso se ha vuelto obligatorio para cualquier análisis que involucre la manipulación de RNA, incluidos los análisis de PCR en tiempo real (Bustin, 2002).

4.2 Estandarización de la PCR en tiempo real

La reacción de PCR en tiempo real para un análisis de expresión génica requiere como templado el cDNA obtenido a partir de la transcripción reversa del mRNA. La síntesis de cDNA es un proceso crítico dentro del análisis de PCR en tiempo real, ya que el cDNA producido representa la cantidad de mRNA del gen en estudio (Bustin, 2002). La PCR en tiempo real es una reacción de tipo exponencial, por lo que está expuesta a una alta variación experimental de los resultados de la reacción, especialmente por la síntesis de cDNA (Kubista, *et al.*, 2006).

Es así que Czechowski y colaboradores en 2004 implementaron un sistema de factores de dilución, con el propósito de igualar las muestras a un valor de Ct del gen de referencia interna previamente fijado. Al aplicar la fórmula del cálculo del factor de dilución a las muestras analizadas en la presente investigación, se pudo comprobar que los valores de Ct del gen de referencia interna se igualaron al valor de Ct fijado previamente, con lo que las variaciones producidas por la reacción de síntesis de cDNA quedan eliminadas. La fórmula para el cálculo de la expresión génica se basa en la naturaleza exponencial de la reacción de PCR (Kubista, *et al.*, 2006) que indica que la cantidad de amplicón en un ciclo determinado se duplica en el siguiente ciclo (Livak & Schmittgen, 2001).

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta cuando se realizan análisis de expresión relativa es la correcta selección del gen que va actuar como referencia o control interno dentro del análisis. La evidencia parte de la premisa que todos los genes se regulan de la misma manera, por lo que se afirma que no existe un gen de referencia universal que se considere de expresión constante (Kubista, *et al.*, 2006). Es por ello, que cualquier gen que se considere como referencia interna debe ser cuidadosamente validado (Kubista, *et al.*, 2006).

El propósito de la validación del gen de control interno es corregir la variación asociada a los múltiples pasos experimentales que puedan afectar el valor de expresión constante de este gen, partiendo desde la extracción del RNA hasta el ensamblaje de la PCR en tiempo real. Es por esta razón que se han empleado como genes de control interno los denominados “*housekeeping genes*”, los cuales son requeridos por la célula para su supervivencia, por lo tanto, se pueden considerar de expresión constitutiva (Expósito-Rodríguez, *et al.*, 2008). Es así que en plantas de tomate se han validado algunos genes de control interno, dentro de los cuales, el gen *GAPDH* (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) es uno de los más utilizados. Este gen es considerado como “Control candidato” en plantas de tomate, ya que ha evidenciado niveles de expresión constantes, con muy pocos cambios bajo condiciones experimentales (Bustin, 2005; Expósito-Rodríguez, *et al.*, 2008). En la presente investigación, los valores de Ct del gen *GAPDH* demostró que los tratamientos evaluados tienen muy pocas variaciones unos con otros, lo que se ajusta a los resultados presentados por Expósito-Rodríguez en 2008, en donde se validaron varios genes de referencia interna, en donde *GAPDH* es uno de los genes candidatos de expresión más estable (Expósito-Rodríguez, *et al.*, 2008).

Los estudios de PCR en tiempo real que cuantifican la expresión de un solo gen normalizado en función de un gen de referencia es una excelente aproximación para muchos procesos de estudio simples, como es el caso de la presente investigación, sin embargo, no es suficiente para la caracterización de estudios complejos. Para esto, se utiliza la técnica de *microarrays* en donde se pueden verificar la expresión de todos los genes en un solo ensayo (Kubista, *et al.*, 2006).

Sin embargo, en muchos casos no es necesario conocer la expresión de todos los genes dentro de un estudio. En algunos tejidos bajo condiciones experimentales, solamente una pequeña parte de los genes se encuentran activos, siendo de utilidad el análisis de los genes que están directamente involucrados con dichas condiciones. Hoy en día, se considera a la PCR en tiempo real como la principal herramienta para el análisis de la expresión de genes individuales (Kubista, *et al.*, 2006).

4.3 Análisis de la expresión génica relativa del gen *PR-1b1* de las variedades inoculadas con *P. infestans*

El análisis de la expresión génica de las variedades estudiadas demostró que existen diferencias altamente significativas entre las variedades de tomate analizadas. Esto se puede justificar en las diferencias morfológicas y fisiológicas que existen entre las variedades evaluadas, así como las condiciones ambientales en las cuales estas se desarrollaron (Herman, *et al.*, 2007). Por ejemplo, la variedad “Cherry”, la cual presenta el fruto más pequeño, presenta los índices de expresión más bajos, en comparación con la variedad “Indeterminada Alaska”, la cual presentó un menor tiempo de crecimiento y tiene frutos de mayor tamaño. Igualmente ocurre con los tiempos de inducción en los que se puede comprobar que algunas variedades como “Indeterminada Alaska” y “Flora Dade” presentaron niveles bajos de expresión en los tiempos iniciales, para aumentar de manera significativa a las 48 horas de inducción. Otras variedades presentaron índices de expresión variables, como “Santa Clara 5800” que presenta su pico a las 24 horas, para luego decaer gradualmente a las 48 y 72 horas, mientras que la variedad “Cherry” nunca alcanzó niveles altos de expresión. Posiblemente esto se puede justificar con la reacción al patógeno que presenta cada variedad (Herman, *et al.*, 2007), ya que al ser obtenidas por el cruce de otras variedades, heredan las características de sus antecesoras, lo que podría resultar en una variación del tiempo de reacción hacia el patógeno.

Los índices de expresión génica obtenidos en la presente investigación se corresponden con los valores de expresión del gen *PR-1b1* reportados en diferentes variedades de tomate por Herman y colaboradores en 2007. Dichos autores realizaron un estudio de campo para comprobar los patrones de expresión génica de las isoformas ácidas y básicas del gen *PR-1* en tres variedades comerciales de tomate: “Rutgers”, “Rio Grande” y “Supersonic”, mediante la aplicación del precursor de ácido salicílico *acibenzolar-S-methyl* (ASM) con la técnica de PCR en tiempo real. Al final del estudio, se comprobó que la variedad “Rutgers” reportó los mayores índices de expresión génica de las dos isoformas del gen *PR-1* siendo la isoforma básica *PR-1b1* la que mayor expresión presentó. La variedad “Supersonic” se ubicó en segundo lugar, siendo en este caso la isoforma ácida *PR-1a* la que presenta mayor índice de expresión. Por último, la variedad “Rio Grande” presentó los índices más bajos de expresión de las tres

variedades, siendo igualmente la isoforma ácida la que mayor expresión presentó. Estos valores se presentan de una manera similar a los encontrados en esta investigación, donde las variedades “Indeterminada Alaska” y “Flora Dade” presentan elevados índices de expresión génica, similar a “Rutgers” y “Supersonic”, mientras que las variedades “Santa Clara 5800” y “Cherry” tienen niveles de expresión bajas e irregulares, similares a “Rio Grande”. En cuanto a los tiempos de inducción, las variedades “Rutgers” y “Supersonic” presentaron índices de expresión bajos en los primeros días de inducción, para luego incrementarse en gran medida a los 8-9 días de inducción, mientras que la variedad “Rio Grande” mantuvo índices de expresión variables durante todo el estudio, presentando su mayor índice de inducción a los 2 y 8 días de inducción (Herman, *et al.*, 2007). Estos resultados difieren con los reportados en la presente investigación, ya que los tiempos de incubación con el patógeno fueron menores, sin embargo, los índices de “Indeterminada Alaska” corresponden a los índices presentados por “Rutgers” al presentar los mayores índices de expresión a las 48 y 72 horas de inducción, con la posibilidad de que sigan aumentando con mayor tiempo de incubación, mientras que las variedades con índices de expresión bajos como “Santa Clara 5800” y “Cherry” posiblemente seguirán presentando índices de expresión irregulares, similares a “Rio Grande”. Estos resultados son interesantes, ya que la variedad “Rutgers” es una variedad adaptada para la siembra de huertos en campo abierto (Herman, *et al.*, 2007), al igual que la variedad “Indeterminada Alaska”, lo que sugiere que la adaptación de las variedades a un ambiente determinado sería clave para la respuesta ante la presencia de un patógeno. El conocimiento de las diferencias de expresión génica en variedades de tomate sembradas en campo provee información importante para la implementación de estudios sobre el impacto del control de enfermedades sobre variedades de interés comercial que puedan resultar susceptibles al ataque de patógenos (Herman, *et al.*, 2007).

Se ha reportado una fuerte correlación entre la infección de *P. infestans* y la sobreexpresión de los genes *PR-1*. Es así que Niderman y colaboradores en 1995 evaluaron la actividad antioomycótica *in vivo* e *in vitro* de tres proteínas PR-1 (P14a, P14b, P14c) de tomate y la isoforma básica de tabaco (PR-1b) (Niderman, *et al.*, 1995). La actividad *in vitro* fue determinada por la destrucción de los esporangios de *Phytophthora infestans*, mientras que la actividad *in vivo* se verificó por la reducción del área necrótica en discos de hojas de tomate (Enkerli, *et al.*, 1993). De estas

proteínas, la que reportó mayor actividad antioomicótica fue la isoforma básica PR-1 de tabaco. Tornero y colaboradores en 1994 presentaron una investigación sobre la similitud de las proteínas PR-1. En función de esta similitud, la proteína PR-1b1 de tomate podría presentar índices de inhibición similares a los presentados en tabaco, lo que podría resultar en la inhibición total o parcial de la infección del patógeno en campo en las variedades de tomate que presentaron los niveles más altos de expresión, como el caso de “Indeterminada Alaska” y “Flora Dade” del presente estudio.

Adicionalmente, la inducción de la expresión génica de los genes *PR-1* puede ser provocada por otros patógenos, sean estos de tipo fúngico, bacteriano o viral. Es así que Anfoka y Buchenauer en 1997 evaluaron la respuesta SAR de plantas de tomate infectadas con el virus de necrosis del tabaco, contra *P. infestans* (TMV) (Anfoka & Buchenauer, 1997). Asimismo, Herman y colaboradores en 2008 evaluaron la expresión de las isoformas ácida y básica del gen *PR-1b1* en plantas de tomate infectadas con *Pseudomonas syringae* mediante RT-PCR en tiempo real (Herman, *et al.*, 2008). Aimé y colaboradores en 2008 analizaron la expresión del gen *PR-1a* en plantas de tomate inoculadas con dos cepas diferentes del hongo patógeno *Fusarium oxysporum* (Aimé, *et al.*, 2008), lo que indica el amplio espectro de acción que tienen los genes *PR-1* en el sistema de respuesta de las plantas. Esto abre la posibilidad de que las variedades con mayores índices de expresión génica como “Indeterminada Alaska” y “Flora Dade” puedan presentar tolerancia a otros tipos de patógenos

La expresión de los genes *PR-1* ha sido ampliamente estudiada en varias especies vegetales, incluida el tomate, que es parte de nuestro estudio. La proteína PR-1 más abundante en plantas infectadas es la isoforma básica de la proteína o PR-1b1. Es así que en los análisis de *Northern Blot* realizados a plantas de tomate infectadas con un viroide se puede apreciar que el mRNA de la isoforma básica PR-1b1 se expresa en grandes cantidades a partir de las 24 horas de inducción aumentando gradualmente su concentración, en contraste con la isoforma ácida PR-1a1, la cual apenas aumenta su expresión a las 72 horas de inducción (Tornero, *et al.*, 1994). Estos valores de expresión de la isoforma básica *PR-1b1* se asemejan a los presentados por las variedades “Indeterminada Alaska” y “Flora Dade”, las cuales aumentan gradualmente la producción de la proteína PR-1b1 a medida que transcurre el tiempo de incubación con el patógeno *Phytophthora infestans*. La expresión diferencial de las isoformas ácida y

básica del gen *PR-1b1* sugiere que existen mecanismos regulatorios independientes para cada gen, siendo el mecanismo más eficiente el del gen *PR-1b1* ya que presenta mayores índices de expresión génica (Tornero, *et al.*, 1994; Tornero, *et al.*, 1997), lo cual es corroborado con la presente investigación.

El mecanismo de regulación del gen *PR-1b1* está mediado por la producción del ácido salicílico (SA), el cual es un compuesto químico del sistema SAR (*Systemic acquired resistance*) (Enkerli, *et al.*, 1993; Van Loon & Van Strien, 1999). El gen *PR-1b1* es fuertemente inducido de manera indirecta por el ácido salicílico, provocando la sobreexpresión de este gen bajo condiciones de estrés, en donde se produce este compuesto (Tornero, *et al.*, 1997). Ryals y colaboradores en 1996 reportaron el aumento de la expresión de los genes *PR-1* mediante la adición de ácido salicílico de manera exógena, lo que sugiere que la expresión de este gen puede ser inducida de manera artificial (Ryals, *et al.*, 1996). La aplicación de ácido salicílico como inductor de la expresión del gen *PR-1b1*, se usó en la presente investigación para inducir la expresión del gen *PR-1b1* para realizar la estandarización de los protocolos de PCR en tiempo real y su aplicación en variedades de alto índice de expresión génica como “Indeterminada Alaska” y “Flora Dade” podría resultar en la anulación total de los síntomas de la infección producidas por el patógeno.

Además del SA, se han reportado otros mecanismos de regulación de los genes *PR-1* que involucran a precursores del etileno y compuestos como la fusicosina (Roberts & Bowles, 1999; Schaller, *et al.*, 1999). Tornero y colaboradores en 1997 reportaron que la expresión de la isoforma básica *PR-1b1* aumentó con la aplicación del precursor de etileno ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) y con el liberador de etileno *Ethephon*. Estos resultados se comprobaron mediante la visualización del transgen *PR-1b1/GUS* en el tejido parenquimático de las hojas, pero no en las venas. Sin embargo, isoforma ácida *PR-1a2* no presentó ninguna reacción a la adición del *ethephon* o al ACC, lo que sugiere una vez más los mecanismos independientes de regulación entre las isoformas del gen *PR-1*. Estos mecanismos pueden resultar de utilidad por la facilidad de manejo y disponibilidad comercial de inductores de etileno como el *ethephon* y su aplicación a las variedades con mayor índice de expresión génica como “Indeterminada Alaska” y “Flora Dade”.

En cuanto a los subconjuntos de confianza generados por las pruebas de rango múltiple, se puede decir que estos se agruparon por las diferencias que aportan al ensayo. Es por ello que las variedades con mayor índice de expresión génica, como son “Indeterminada Alaska” y “Flora Dade”, se agruparon en un subconjunto, mientras que las variedades “Santa Clara 5800” y “Cherry” se agruparon en otro subconjunto, al ser las variedades que menor índice de expresión génica presentaron. La formación de los subconjuntos de confianza supone el primer paso para la implementación de un sistema de mejoramiento genético con base estadística, en función de la respuesta que presenta el gen *PR-1b1*. Al estudiarse todas las características de las variedades miembros de cada subconjunto para hacer una preselección de candidatos para un cruce en función de sus características físicas además de la respuesta del gen *PR-1b1* a la presencia de *P. infestans*.

Sin embargo, son necesarios más estudios para determinar las respuestas de otros genes relacionados con la resistencia a múltiples patógenos para disponer de una base más completa de información para el desarrollo de programas masivos de mejoramiento con la ayuda de herramientas moleculares. Además, se deben realizar más investigaciones en otras variedades de tomate que presentan un alto valor comercial por las características que presentan.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- Se optimizó la técnica de extracción y purificación de RNA total mediante el kit *PureLink™ Micro-to-Midi Total RNA Purification System*, ya que se obtuvo entre 0,5 y 2 µg de RNA total por cada 100 mg de tejido utilizado, así como la cuantificación del RNA con la plataforma *Qubit®* con el kit *Quant-it™ RNA Assay* ya que debido a su sensibilidad se pudo determinar la concentración de las muestras diluidas de RNA total
- El proceso de eliminación del DNA contaminante de las muestras de RNA aislados mediante el uso de la enzima *DNase I Amplification grade* resultó efectivo, ya que no se observaron trazas de DNA presente en las muestras de RNA tratadas con dicha enzima que pudiera interferir en la reacción de síntesis de cDNA.
- Se estandarizó la técnica de síntesis de cDNA, mediante la enzima transcriptasa reversa *Superscript® III Reverse Transcriptase*, más la adición del *Oligo (dt) Primer 0,5 µg/µL*, pues se obtuvieron cantidades suficientes de cDNA para los ensayos de PCR en tiempo real.
- Se estandarizó las condiciones de PCR en tiempo real para el análisis de la expresión del gen *PR-1b1* usando el gen *GAPDH* como control interno. Las condiciones del programa del termociclador para la amplificación de los fragmentos del gen *GAPDH* y *PR-1b1* son: 1 ciclo para la activación de la UDG a 50°C por 2 minutos; 1 ciclo para la activación de la “*Hot start*” Taq Polimerasa a 95°C por 10 minutos y 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos para los pasos de denaturación, *annealing* y extensión respectivamente.
- Se diseñaron los primers para el experimento con las siguientes secuencias: Gen *GAPDH* elegidas para los ensayos fueron: *GAPDH (FR) fw 5'-CCATGACTGCCACCCAGAAA-3'*; *GAPDH (FR) rv 3'-CTGCACCAGTGCTGCTAGGG-5'* con las cuales se obtuvo un tamaño de amplicon de 109 bp. Para el gen *PR-1b1* las secuencias elegidas fueron:

PR1b1(SAET/FR) fw 5'-GGCATCCCGAGCACAAAAC-3'; PR1b1(SAET/FR) rv 3'-CCTCCCCGTGAAGTCACCAC-5' con los cuales se obtuvo un tamaño de amplicón de 102 bp. La concentración final óptima de los primers de cada uno de los genes para la reacción de PCR en tiempo real fue de 200 nM, partiendo de un stock de 10 μ M.

- La variedad "Indeterminada Alaska" fue la que presentó mayores índices de expresión génica relativa del gen *PR-1b1*, seguida de la variedad "Flora Dade", la variedad "Santa Clara 5800" y finalmente la variedad "Cherry".
- Los tiempos de incubación en los cuales se presentaron mayores niveles de expresión génica relativa del gen *PR-1b1* fue de 48 horas para las variedades "Flora Dade" y "Cherry", 72 horas para la variedad "Indeterminada Alaska" y 24 horas para la variedad "Santa Clara 5800".
- El análisis de varianza (ANOVA) determinó que existen diferencias altamente significativas en los niveles de expresión génica relativa del gen *PR-1b1* entre las variedades analizadas, además de que existen diferencias significativas entre los tiempos de incubación evaluados. El análisis de varianza no evidencia diferencias significativas en la interacción Variedad x Tiempo.
- Las pruebas de Tukey y Scheffé aplicadas al parámetro "Variedad" agruparon a las variedades en 2 subconjuntos de confianza. En el subconjunto 1 se agruparon las variedades "Cherry" y "Santa Clara 5800", mientras que en subconjunto 2 se agruparon las variedades "Santa Clara 5800", "Flora Dade" e "Indeterminada Alaska". La variedad "Santa Clara 5800" se ubicó en ambos subconjuntos de confianza, mientras que la prueba de Duncan agrupó a las variedades en 3 subconjuntos de confianza. En el subconjunto 1 se agruparon las variedades "Cherry" y "Santa Clara 5800", mientras que en subconjunto 2 se agruparon las variedades "Santa Clara 5800" y "Flora Dade" y finalmente en el subconjunto 3 se agruparon las variedades "Flora Dade" e "Indeterminada Alaska".
- Las pruebas de Tukey y Scheffé aplicadas al parámetro "Tiempo de incubación" agruparon a las variedades en un único subconjunto de confianza mientras que la

prueba de Duncan aplicada al parámetro “Tiempo de incubación” agrupó a las variedades en 2 subconjuntos de confianza. En el subconjunto 1 se ubicaron los tiempos de incubación de 0, 24 y 72 horas, mientras que en el subconjunto 2 se ubicaron los tiempos de incubación de 72 y 48 horas. El tiempo de 72 horas se ubicó en ambos subgrupos de confianza.

- El tratamiento con mayor nivel de expresión génica relativas del gen *PR-1b1* fue el de la variedad “Indeterminada Alaska” a las 72 horas de incubación del patógeno, mientras que el tratamiento con menor nivel de expresión génica fue el de la variedad “Cherry” a las 24 horas de incubación con el patógeno
- Los resultados del experimento sugieren que las variedades de tomate estudiadas se comportan de maneras diferentes, lo cual se debe posiblemente a las características morfológicas y fisiológicas de cada una de ellas.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- La extracción del RNA total se la realizó con el kit *Purelink Micro-to Midi Total RNA Purification system* de INVITROGEN, sin embargo, se recomienda probar otros kits de diferentes marcas o en lo posible probar protocolos manuales de extracción de RNA total para cotejar los resultados obtenidos y para la optimización de recursos.
- La PCR en tiempo real se realizó con un paso de extensión a 72°C por 30 segundos que alargó el tiempo de los ciclos de PCR en tiempo real, por lo que se recomienda probar la PCR en tiempo real eliminando ese paso para tener una PCR en tiempo real bifásica y reducir el tiempo de los ciclos de reacción para reducir los tiempos de análisis y hacer el proceso más eficiente.
- El SYBR Green I resultó eficiente para la amplificación y el cálculo de la expresión génica relativa del gen *PR-1b1*, sin embargo, se recomienda comprobar los resultados con otras tecnologías de PCR en tiempo real, especialmente con sondas TaqMan, ya que es la tecnología más comúnmente utilizada.
- Los resultados obtenidos con las variedades y tiempos de incubación evaluados fueron favorables, por lo que se recomienda continuar con el trabajo propuesto probando con nuevas variedades y mayores tiempos de incubación del patógeno.
- Conociendo la regulación hormonal de los genes de la familia *PR-1* y especialmente el gen *PR-1b1* se recomienda realizar nuevos estudios probando diferentes concentraciones hormonales y tiempos de inducción con las variedades evaluadas en este estudio y con otras variedades de interés comercial, para obtener una base de estudio sólida en pos de implementar posibles planes de mejoramiento genético en función de las variedades con mayor expresión génica y con las características comerciales más apreciadas en el mercado.

BIBLIOGRAFIA

Aimé, S., Cordier, C., Alabouvette, C., Olivain, C., 2008, Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici* and the biocontrol strain *F. Oxysporum* Fo47, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol 73, pg: 9-15.

Alexander, D., Goodman, R., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E. y Ryals, J., 1993, Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a, *Plant Biology*, Vol 90, pg: 7327,7331.

Anfoka, G., Buchenauer, H., 1997, Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol 50, pg: 85-101.

Antoniw, J., Ritter, C., Pierpoint, W., Van Loon, L., 1980, Comparison of Three Pathogenesis-related Proteins from Plants of Two Cultivars of Tobacco Infected with TMV, *J. Gen. Virol.*, Vol 47, pg: 79-87

Applied Biosystems, 2009, Relative Quantification, Applied Biosystems 7300/7500 Real Time PCR System-Getting Started Guide, Applied Biosystems Publication.

Arie, T., Takahashi, H., Kodama, M. y Teraoka, T., 2007, Tomato as a model plant for plant- pathogen interaction, *Plant Biotechnology*, Vol 24, pg: 135-147.

Bustin, S., 2000, Absolute quantification of mRNA using real-time PCR reverse transcription polymerase chain reaction assay, *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol 25, pg: 169-193.

Bustin, S., 2002, Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trend and problems, *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol 29, pg: 23-39.

Čikoš., Š, Bukovská, S., Koppel, J., 2007, Relative Quantification of mRNA: Comparison methods currently used for real-time PCR data analysis, *BMC Molecular Biology*, Vol 8, pg: 1-14.

Chen, Z., Silva, H., Klessig, D., 1993, Involvement of reactive oxygen species in the induction of systemic acquired resistance by salicylic acid in plants, *Science*, Vol 242, pg: 883-886.

Czechowski, T., Bari, R., Stitt, M., Scheible, W., Udvardi, M., 2004, Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes, *Plant J*, Vol 38, pg: 366-379.

Deepak, S., Kottapalli, K., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K., Iwahashi, H., Masuo, Y., Agrawal, G., 2007, Real-time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes, *Current Genomics*, Vol 8, 234-251.

Edreva, A., 2005, Pathogenesis-Related Proteins: Research progress in the last 15 years, *Gen. Appl. Plant Physiology*, Vol 31, pg. 105-124.

Enkerli, J., Gisi, U., Mössinger, E., 1993, Systemic acquired resistance to *Phytophthora infestans* in tomato and the role of pathogenesis-related proteins, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol 43, pg: 161-171.

Erwin, D., Ribeiro, O., 1996, *Phytophthora Diseases Worldwide*, Ed. APS Press, St Paul, MN, pgs: 592.

Expósito-Rodríguez, M., Borges, A., Borges-Pérez, A., Pérez, J., 2008, Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato developing process. *BMC Plant Biology*, Vol 8, pg: 1-12.

Fang, K., Vitale, M., Fehlner, P., King, T., 1988, cDNA cloning and primary structure of a white-face hornet venom allergen, antigen 5, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, Vol 85, pg: 895-899.

Fernández, C., Szyperski, T., Bruyère, T., Ramage, P., Mössinger, E., Wüthrich, K., 1997, NMR Solution Structure of the Pathogenesis-related Protein P14a, *J. Mol. Biol.*, Vol 266, pg: 576-593.

Fidantsef, A., Stout, M., Thaler, J., Duffey, S., Bostock, R., 1999, Signal interactions in pathogen and insect attack: Expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II and

pathogenesis-related protein P4 in tomato, *Lycopersicon esculentum*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol 54, pg: 97-114.

Gachon, C., Mingam, A. y Charrier, B., 2004, REVIEW ARTICLE: Real-time PCR: what relevance to plant studies?, *Journal of Experimental Botany*, Vol 55, pg: 1445-1454.

Gutiérrez, H., De la Vara, R., 2008, Análisis y diseño de experimentos, Ed. McGraw-Hill, 2da Edición, pg: 564.

Hardam, A., 2001, The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity, *Australas. Plant. Pathol.* Vol 30, pg: 91-98.

Herman, M., Restrepo, S., Smart, C., 2007, Defense gene expression patterns of three SAR-induced tomato cultivars in the field, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol 71, pg: 192-200.

Herman, M., Davidson, J., Smart, C., 2008, Induction of Plant Defense Gene Expression by Plant Activators and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in Greenhouse-Grown Tomatoes, *Phytopatology*, Vol 98, pg: 1226-1232.

Hoagland, D, Arnon, D., 1950, The water-culture method for growing plants without soil, *College of Agriculture, University of California, Berkeley, California*, circular # 347.

INVITROGEN, 2010, Purelink Micro to Midi Total RNA Purification system-User manual, Consulta en línea: 2010/07/13, http://www.interactivebioscience.cz/admin/_docs/protokol%20Invitrogen%20%20Purifikace%20PureLink%20Micro-to-Midi.pdf

INVITROGEN, 2010, Qubit Fluorometer-Instruction Manual, Consulta en línea: 2010/07/13, <http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf.Par.32407.File.dat/mp32857.pdf>

INVITROGEN, 2010, Deoxyribonuclease I, amplification grade-User manual, Consulta en línea: 2010/07/13, <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/18068015.pdf>

INVITROGEN, 2010, Superscript III Reverse Transcriptase-User manual, Consulta en línea: 2010/07/13, http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/superscriptIII_man.pdf

Judelson, H., Blanco, F., 2005, The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer, *Nature Reviews Microbiology*, Vol 3, pg: 47-58.

Kamoun, S., van Hest, P., Vleeshouwers V., de Groot, K., Govers, F., 1998, Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1, *Plant Cell*, Vol 10, pg: 1413-1426.

Kamoun, S., Huitema, E., Vleeshouwers V., 1999, Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response?, *Trends. Plant. Sci.* Vol 4, pg: 196-200.

Kamoun, S., 2001, Nonhost resistance to *Phytophthora*: Novel prospects for a classical problem, *Plant Biology*, Vol 4, pg: 295-300.

Kamoun, S., 2003, MINIREVIEWS: Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes, *Eukaryotic Cells*, Vol 2, pg: 191-199

Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P. y Fritig, F., 1987, Biological function of pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity, *EMBO J.*, Vol 6, pg. 3209-3212.

Kuehl, R., 2001, Diseño de experimentos, Ed. Thompson Learning, 2da edición, México D.F, México, pg: 659.

Kubista, M., Andrade, J., Bengsston, M., Foorotan, M., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Sthåhlberg, A., Zoric, N., 2006, The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, Vol 27, pg: 95-125.

Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. y Fritig, B., 1987, Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases, *PNAS*, Vol 84, pg. 6750-6754.

Livak, K., Schmittgen, T., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method, *Methods*, Vol 25, pg: 405-408.

McLeod, A., Smart, C., Fry, W., 2003, Characterization of 1,3- β glucanase and 1,3;1,4- β glucanase genes from *Phytophthora infestans*, *Fungal Genet. Biol.*, Vol 38, pg: 250-263

National Center of Biotechnological Information (NCBI), Taxonomy Browser, Taxonomy ID: 4081, Consulta en línea: 2010-04-01, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4081&vl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f>

National Center of Biotechnological Information (NCBI), Taxonomy Browser, Taxonomy ID: 4787, Consulta en línea: 2010-07-07, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=4787&vl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, F. y Mössinger, E., 1995, Pathogenesis-Related PR-1 Proteins Are Antifungal. Isolation and Characterization of Three 14-Kilodalton Proteins of Tomato and of a Basic PR-1 of Tobacco with Inhibitory Activity against *Phytophthora infestans*, *Plant Physiol.*, Vol 108, pg. 17-27.

Nuez, F., 2001, El cultivo del tomate, *Ed. Mundiprensa*, 1ra ed. Reimpresa, Madrid, España, pg: 32, 35, 36.

Nurnberger, T., Brunner, F., 2002, Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns, *Curr. Opin. Plant Biol.*, Vol 5, pg: 318-324.ç

Pfaffl , M., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acid Research*, Vol 29, pg: 2002-2007.

Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Long, F., Douglas, S., Field, S., Bell, S., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A., Robinson, P., Inglehearn, C., Isaacs, J., Markman, A., 2003, Real Time PCR based on SYBR Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplification and microgen deletions, *BMC Biotechnology*, Vol 3, pg: 3-18.

Oregon State University Extension, 2010, An Online Guide to Plant Disease Control, Consulta en línea: 27/07/2010, <http://plant-disease.ippc.orst.edu/disease.cfm?RecordID=1084>

QIAGEN, 2006, RNeasy Mini Handbook, Consulta en línea: 2010/07/13, http://labs.fhcrc.org/fero/Protocols/RNeasy_Mini_Handbook.pdf.

Roberts, M., Bowles, D., 1999, Fusicoccin, 14-3-3 Proteins and Defense response in Tomato Plants, *Plant Physiology*, Vol 119, pg: 1243-1250.

Rodriguez, R., Tabares, J., Medina, J., 2001, Cultivo moderno del Tomate, Ed. *Mundiprensa*, 2ra ed. Reimpresa, Madrid, España, pg: 13

Ryals, J., Lawton, K., Delaney, T., Friedrich, L., Kessmans, H., Neuenschwander, U., Uknes, S., Vernooij, B. y Weymann, K., 1995, Signal transduction in Systemic Acquired Resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol 92, pg: 4202-4205.

Ryals, J., Neuenschwander, U., Willits, M., Molina, A., Steiner, H. y Hunt, M., 1996, Systemic Acquired Resistance, *The Plant Cell*, Vol 8, pg: 1809-1819.

Salazar, L., Winters, P., Maldonado, L., Hareau, G, Thiele, G., 2009, Assessing the impact of late blight resistance varieties on smallholders potato producers in the Peruvian Andes, *CIP Working Paper No. 2009-5*, pg: 1-30.

Schaad, N., Frederick, R., 2002, Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostic, *Can. J. Plant. Pathol.*, Vol 24, pg: 250-258.

Sandoval, K., 2007, Detección del gen de Resistencia (Tm-2) al virus del mosaico del tomate (ToMV) mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el marcador molecular SCAR (SCG09700), en variedades cultivadas y silvestres del Ecuador, Tesis previa a la obtención del título de tercer nivel, Quito, Ecuador.

Sárvári Research Trust, 2010, Know your enemy – Blight, Consulta en Línea: 2010/07/08, <http://www.sarvari-trust.org/late-blight.html>

Schaller, A., Roy, P., Amrhein, N., 2000, Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related gene expression by fusicoccin, *Planta*, Vol 210, pg: 599-606.

Schumann, G., D'Arcy, C., 2000, Late blight of potato and tomato. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0724-01, Consulta en línea: 2010/07/08,

SICA, 2006, Servicio de información y censo agropecuario del Ministerio de Agricultura y Ganadería, Consulta en Línea: 2009/02/16, http://www.sica.gov.ec/agro/docs/sup_prod.htm

Solanaceae Source, 2010, *Solanum lycopersicum*, Consulta en Línea: 2010/07/08, The Natural History Museum, Cromwell Road, London, <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/solanaceaesource/>

Szyperski, T., Fernández, C., Mumenthaler, C., Wüthrich, K., 1998, Structure comparison of human glioma pathogenesis-related protein GliPR and the pathogenesis-related protein P14a indicates a functional link between the human immune system and the plant defense system, *Proc. Nat. Acad. Sci, USA*, Vol 95, pg: 2262-2266.

Tornero, P., Conejero, V., Vera, V., 1994, A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection, *Mol. Gen. Genet.*, Vol 243, pg: 47-53.

Tornero, P., Gadea, J., Conejero, V., Vera, P., 1997, Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a Pathogenesis-related

gene during the hypersensitive response and development, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Vol 10, Pg: 624-634.

Van Loon, L., Van Strien, E., 1999, The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol 55, pg: 85-97.

Van Loon, L., Rep, M., Pieterse, C., 2006, Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants, *Annu. Rev. Phytopathol.*, Vol 44, pg: 135-162.

Van Ooijen, G., van den Burg, H., Cornelissen, B. y Takken, F., 2007, Structure and function of Resistance Proteins in Solanaceus Plants, *Annu. Rev. Phytopatol*, Vol 45, pg. 43-72.

Woloshuk, C., Meulenhoff, J., Sela-Buurlage, M., van den Elzen, P. y Cornelissen, B., 1991, Pathogen-Induced Proteins with Inhibitory Activity toward Phytophthora infestans, *The Plant Cell*, Vol 3, pg: 619-628.

Wong, M., Medrano, J., 2005, Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques* Vol 39, pg: 1-11

Zárate S., 2008, Búsqueda de los genes de resistencia Mi-1 y Mi-3 al nemátodo formador de nudo *Meloidogyne spp.* en varias especies silvestres de la familia Solanaceae del Ecuador, Tesis previa a la obtención del Título de tercer nivel, Quito, Ecuador

Zhang, H., Xie, X., Xu, Y. y Wu, N., 2004, Isolation and fuctional assessment of a tomato proteinase inhibitor II gene, *Plant Physiology and Biochemistry*, Vol 42, pg. 437-444.

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzhum, F., 2004, Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications, *Nucleic Acids Research*, Vol 32, pg: 1-10.

ANEXOS

ANEXO A. Fórmula de la solución nutritiva Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950).

Stock	Volumen Stock (L)	Peso nutriente (g)	mL Stock / L solución
2M KNO ₃	0.5	101	2.5
2M Ca (NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	0.25	118	2.5
Fe.Na-EDTA	0.5	7.5	1.5
2M MgSO ₄ x 7H ₂ O	0.5	246.5	1
1M NH ₄ NO ₃	0.5	40	1
Menores:			
H ₃ BO ₃		2.86	
MnCl ₂ x 4H ₂ O		1.81	
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	1	0.22	1
CuSO ₄ x 5H ₂ O		0.051	
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O		0.12	
1M KH ₂ PO ₄ (pH 6)	0.5	68	0.5
Regulador de pH:			
3M KOH	0.25	42	-

ANEXO B. Secuencia del gen *PR-1b1*.

L.esculentum mRNA for PR protein

GenBank: Y08804.1

>gi|2529164|emb|Y08804.1| L.esculentum Mrna for PR protein

```
CATATCAAAC TATTTATGCTATATTTAATACTTATTTAAATCGTAACTATTTATTTCTAAATTGCAGCTC
TAACACTTTTTTAAAAAGTTTTTTAAAATTTTCTTTTCGAAGCTACAAGGATTGAGGCAGTTTCTAATTTCCA
CATAAAGGACCAAAAAATTGTTTTGGTTTTAAGTGTGTCTATCACTTCCATTGTTTGTGTTTTTCATTATA
TCCATTATATCCAAATTGCTTTCAATGACTAACAAATACTTGAGTCTTCTCTCTCATAGAATAACTTT
CTTCCATAAATCCACGTAAGGCGGCTCAATAAGTGTGTTTTAATATTATCTAAATAATAGAGTAAAGTAT
GATTATTC TTTAAAGCATATAGTATTTCC TTAATCACACGACATGCAATCTCCTTTGAATTTTCTTCACA
TGTGAATAAAATTCACAAAAGTTTTAAATTTAACAATTTTCACAAAATTTGATTAAATTGAACAATCAAAGT
TTGATAAATATCTTATCGAAACCAAAAGTGTTCACTTTTTGAAAAATATAAAGGACCAAAAAAGATCACTT
TTGACAATCTTAAGGACCAAAATTGCTCTTATCATAACATAAGGGAGTCTATTGAAACTACTAAAAAGATA
AGGAAGCCTTTTTGTCAATTTCTCTATAATTTCTTTGAATTTTTCTTCATACATGCTAAACAAAATTACA
CAATGTTTAATTATATATACACTATTTAAAGGACCAAAAGTAATTAATTCTAAAAAGTTTTAAGGACCAA
AATCACTTAGCAAAATACACAAGAGACTATTTTGAAGTACTATCAAAGATAAGAGACCATTTTTTATCAT
TTCTCTACTAATAATTTCTTTGAATTTTTCTTCACACATACTTAGCAAAATTCACAATTTTTACTTAT
AAATACACTACTTATCTCACGTTTATAATCACAATAACTTAGATTTATTTTCTCTGCACTAAACCTAAAG
AAAAATGGGGTTGTTCAACATCTCATTGTTACTCACTTGTCTCATGGTATTAGCCATATTTCACTCTTGT
GAGGCCCAAAATTCACCCCAAGACTATCTTGCGGTTTCATAACGATGCCCGTGCCCAAGTCGGAGTCGGGC
CTATGTCTTGGGATGCCAACTTGGCATCCCGAGCACAAAATATGCCAACTCAAGAGCTGGTGATTGTAA
CTTGATTCAATCTGGTGTCTGGGGAGAATCTTGCCAAGGGTGGTGGTGACTTCACGGGGAGGGCAGCCGTG
CAATTGTGGGTGTCCGAGAGGCCAAGCTATAACTACGCTACCAACCAATGTGTTGGTGGAAAAAGTGTA
GACATTATACTCAAGTAGTCTGGCGCAACTCAGTCCGACTAGGTTGTGGTTCGGGCACGTTGCAACAACGG
ATGGTGGTTCATTTCTTGCAACTATGATCCTGTAGGCAACTGGATCGGACAACGTCTTACTAAAAATGAT
GTATACTTATGACATGTTGCTAGTATTAATAAAAATTTCTCATATGAGACGTCGAGAAGTTAAAAATTAAG
TTTGACATATGAATCAAGTCAAACCTCTATCTAAAATATTAAGGGATTAATATTGAACATCTATAATTA
TTATTATTTCCCTTTTGATGTTGCTAATATGAATAATTCACATACCATATGTTTATAATGGGCTTAAGT
TGATTATTAAGTACTGCATCTTCTTGTTCATAAAAACATTAATATACATAAAAATTTAATTAAGCATGG
CATATATTAATTAGGCACATCAAGCACTTATCTAAACACGTAACTATTTATTCTATAAATTCAGTTTCAAC
CATTCAAAATATTTGTTCTATTTTAAGTGCCATCAAAAAAAAATTC AATCATTACCCAATTTTTTTTCA
ATGACTAACAAATACTCAAGTCTTCCATATTCTCTCATACAATAATGGCCTAAAAC TATATTTTCATAAAA
ATATTTTATAGGTGAAAATTGAATTTTATCCTTTCTTGACCTATTGTCTTAGATTTGAATACCAGAAATA
AAAACAAATATTGCTATTTATTGAAAAAATTTACGTAGCATGAAATTAATAAATTTGGCACATATTTAAA
ATATCTCGTCAGGAAAAAAAAATTTGACCCCTAACAAACGTTTAAATTTAATAATTTTCACAAATGTTAC
TAAATTTAACAATGAGAGTTTGATAAATATCTAATGGTGAACAGAAAGTGTTCAC TTTTCGAAAAACAAAG
AGGAGGAAAAGTGATCTATTTTGACAAATTTAAGGATCAA AATGATCCAATCATAACATTAGGGACTATT
TTGAATCTACTATAAAAATGATAAGGAACCATTTTTTTGTTTTTTTCATTTTCTCTATTAAGTTTCTTTGA
ATTTTCTTCACACATGCTAA
```

ANEXO C. Secuencia del gen *GAPDH*

Lycopersicon esculentum glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA, complete cds

GenBank: U97257.1

```
>gi|2078297|gb|U97257.1|LEU97257 Lycopersicon esculentum  
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA, complete cds  
CCATAACCTAATTTCTCTCTTACATCTTTGCTTAAGCATTACTACTCTTTTTTTTTCTTAGCAATGGC  
AAACGGAAAGATCAAAATCGGAATCAACGGATTCGGTAGAATTGGTCGTTTGGTGGCTAGAGTTGCTCTA  
CAGAGAGATGATGTTGAACTAGTTGCAGTGAATGATCCATTTATTTCCACTGATTACATGACATATATGT  
TTAAGTATGATTCAGTACATGAACAATGGAAGCATCATGAGCTAAAGGTCAAGGATGAGAAGACACTTCT  
CTTTGGAGAGAAGGCTGTTACAGTTTTTGAATCAGGAACCCTGAAGATATCCCATGGGGTGAAGCTGGT  
GCTGACTTCGTTGTTGAATCAACCGGTGTCTTCACTGACAAGGACAAGGCTGCTGCTCACTTGAAGGGTG  
GTGCCAAGAAGGTTGTGATCTCTGCTCCTAGCAAAGATGCTCCCATGTTTGTGTTGGGTGTCAACGAGAA  
TGAATACAAGCCAGAGCTGGACATTGTCTCCAATGCTAGTTGCACAACGAACTGCCTTGCACCTTTGGCT  
AAGGTTATCAATGATAGGTTTGGCATTGTTGAGGGTCTCATGACCACTGTCCACGCCATGACTGCCACCC  
AGAAAACCTGTTGATGGTCCATCCATGAAGGACTGGAGAGGTGGAAGAGCTGCTTCATTCAACATCATCCC  
TAGCAGCACTGGTGCAGCCAAGGCTGTTGGAAAAGTGCTCCCACAACCTAACCGCAAATTGACTGGAATG  
GCCTTCAGAGTACCAACTGCTGATGTCTCCGTTGTCTGATCTTACTGTAAGACTCGAGAAAAGAAGCCTCCT  
ATGAAGACATTAAGGCTGCAATCAAGGAGGAATCAGAGGGTAAATTGAAGGGTATCTTGGGATACACTGA  
AGATGATGTGGTTTCCACAGACTTTGTTGGTGACAGCAGGTCAAGCATTTTTGATGCCAAGGCTGGAATT  
GCTTTGAGCAAGAATTTTGTGAAAGTTGTGTCTATGGTATGACAACGAATGGGGTTACAGTTCCCGTGTGA  
TTGATTTGGTCTGCCATATGGCTAAGGCTTGATTGATGCTGCTGGGGAGCAAAGACAGCAATGTGTTTTT  
AGTTTTCGCTTGAAGTACTATTAGTTTTTGTGGCCTGGAGTGGTCTTTCTTGTGTTATGTGTAATTGAAT  
AACCAGAGAAGAACGGAACCCGTTGTTATCTTTGAGGAAATCTTTTTTATTGTTTGACTTTGTCATGAA  
TGAAACAATCAAACCTTACCTTTCT
```