

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

Análisis de expresión de la resistencia de *Solanum commersonii* frente al
patógeno *Ralstonia solanacearum*

por

Rafael Narancio Ferrés

TESIS presentada como uno de los requisitos para
obtener el título de *Magister* en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetales

Montevideo
Uruguay
Diciembre 2011

Tesis aprobada el 20 de diciembre de 2011 por el tribunal integrado por Ing. Agr.
Guillermo Galván PhD, Carlos Robello PhD, José Sotelo Silveira PhD. Director
Ing. Agr. Marco Dalla Rizza PhD, Co-director Ing. Agr. Clara Pritsch PhD.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
RESUMEN.....	II
SUMMARY	II
1. <u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>	1
1.1. EL CULTIVO DE PAPA.....	1
1.1.1. <u>Orígenes y diversidad genética</u>	1
1.2. <i>Ralstonia solanacearum</i>	4
1.2.1. <u>Control de la enfermedad</u>	7
1.3. FUENTES DE RESISTENCIA GENÉTICA	7
1.4. <i>Solanum commersonii</i>	8
1.5. BARRERAS REPRODUCTIVAS.....	9
1.6. HIBRIDACIÓN <i>S. commersonii</i> x <i>S. tuberosum</i>	10
1.7. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS.....	11
1.7.1. <u>Inmunidad disparada por PAMPs</u>	12
1.7.2. <u>Inmunidad disparada por efectores</u>	16
1.7.2.1. Efectores.....	17
1.7.2.2. Genes R	19
1.7.3. <u>Vías de señalización posteriores a la percepción del patógeno</u>	23
2. <u>INSIGHTS ON GENE EXPRESSION RESPONSE OF A CHARACTERIZED RESISTANT GENOTYPE OF <i>S. commersonii</i> Dun. AGAINST <i>Ralstonia solanacearum</i>.</u>	26
2.1. SUMMARY	26

2.2. INTRODUCTION.....	28
2.3. MATERIALS AND METHODS	33
2.3.1. <u>Plant materials and inoculation</u>	33
2.3.2. <u>Sample preparation</u>	34
2.3.3. <u>Microarray analysis</u>	34
2.3.4. <u>Real time PCR validation</u>	35
2.4. RESULTS.....	36
2.4.1. <u>Cluster analysis</u>	44
2.4.2. <u>Real time PCR validation</u>	46
2.5. DISCUSSION	47
2.6. ACKNOWLEDGMENTS:.....	53
2.7. REFERENCES	53
3. <u>CONCLUSIONES</u>	64
4. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	67

RESUMEN

S. commersonii es una especie emparentada con la papa cultivada. Algunos genotipos de *S. commersonii* muestran resistencia a la bacteria patogénica *R. solanacearum*, la cual causa grandes daños en el cultivo de papa y en otros cultivos de importancia económica. En este trabajo se realizó un análisis de expresión de genes de un genotipo resistente de *S. commersonii* en respuesta a la infección con *R. solanacearum* utilizando el Potato Oligochip Initiative (POCI) array, el cual es la representación del transcriptoma de papa más actualizada hasta el momento. El objetivo del presente trabajo fue desentrañar los procesos moleculares involucrados, establecer el momento de la respuesta e identificar genes relacionados con la resistencia. La respuesta de defensa se inició a las 6 horas post-inoculación (hpi) y se estableció a las 24 hpi, momento en el cual se sobre-expresaron varios genes de defensa. En un estadio temprano, la fotosíntesis se vio altamente reprimida y varios genes que codifican para proteínas relacionadas con las especies reactivas del oxígeno fueron expresados diferencialmente. Los genes ERF, ACC-oxidasa pertenecientes a la vía del etileno y también genes que codifican proteínas PR1 y PR5 relacionadas con la vía del ácido salicílico se sobreexpresaron a las 24 hpi. La activación de estas dos vías sostiene la posible característica hemibiotrófica del patógeno en esta interacción. Este trabajo confirma que la base de la resistencia de *S. commersonii* frente a *R. solanacearum* es genética y potencia a la especie como un recurso genético valioso para el mejoramiento del cultivo de la papa contra la marchitez bacteriana.

Palabras clave: marchitez bacteriana, microarreglos, defensa en plantas, mejoramiento de papa, recurso genético silvestre

SUMMARY

GENE EXPRESSION ANALYSIS OF THE *Solanum commersonii* Dun. RESISTANCE AGAINST PATHOGENIC BACTERIA *Ralstonia solanacearum*.

S. commersonii is a wild species related to the cultivated potato. Some *S. commersonii* genotypes have proven to be resistant to the pathogenic bacteria *R. solanacearum*, which causes several damages in potato and other economically important crops. Here an expression analysis of the response of a resistant *S. commersonii* genotype against *R. solanacearum* was performed by the Potato Oligochip Initiative (POCI) array, which is the most actualized representation of the potato transcriptome. The aim of this work was to elucidate the molecular processes involved in the interaction, establish the timing of the response, and identify genes related to the resistance. The defense response was initiated at 6 hours post-inoculation (hpi) and established at 24 hpi, when many defense genes were differentially expressed. At early stage, the photosynthetic process was highly repressed and several genes encoding proteins related to reactive oxygen species (ROS) production were differentially expressed. The ERF and ACC-oxidase genes belonging to the ethylene pathway and also the genes encoding PR1 and PR5 proteins related to the salicylic acid pathway were over-expressed at 24 hpi. The induction of both pathways supports the hemibiotrophic nature of the pathogen in this interaction. This work confirms that *S. commersonii* resistance has a genetic basis and potentiates the species as a valuable genetic source for potato breeding against bacterial wilt.

Key words: bacterial wilt, microarrays, plant defense, potato breeding, wild genetic resource

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. EL CULTIVO DE PAPA

La papa (*Solanum tuberosum*, tbr, $2n=4x=48$) es uno de los cultivos alimenticios más importantes y difundido a nivel mundial. En cuanto a producción, ocupa el tercer lugar después de los cereales arroz, trigo y maíz, con una producción anual cercana a las 300 millones de toneladas (Centro Internacional de la Papa, CIP 2011) y es plantada en 149 países que se sitúan entre las latitudes 65 N y 50 S y hasta altitudes de 4000 metros sobre el nivel del mar (Bradshaw et al. 2006).

En nuestro país las zonas que abarca el cultivo son el sur (San José, Canelones, Colonia y Flores), este (Rocha y Maldonado), y norte (Tacuarembó, Rivera, Salto y Paysandú) (Vilaró et al. 2000). Se planta en dos ciclos, primavera y otoño, exceptuando el este, donde se planta en una sola zafra de verano. La producción de papa varía dependiendo del año. Como ejemplo citamos el otoño del año 2010, cuando se alcanzó una producción total de 63,5 mil toneladas y una superficie sembrada de 3203 hectáreas (oficina de Estadísticas Agropecuarias, Ministerio de Agricultura y Pesca 2010).

1.1.1. Orígenes y diversidad genética

Las papas cultivadas en regiones templadas como Europa y América del Norte se originaron en los Andes en América del Sur y son llamadas colectivamente con el nombre de *Solanum tuberosum*. Existen variedades criollas de papa cultivada y alrededor de 190 especies silvestres emparentadas que forman tubérculos (del género *Solanum*, sección Petota) que se encuentran ampliamente distribuidas en los Andes desde el oeste de Venezuela hasta el norte de Argentina, incluyendo la isla de Chiloé y el archipiélago de los Chonos en el centro-sur de Chile. Tanto las papas cultivadas como las especies silvestres tienen un número básico de 12 cromosomas ($x=12$) y ploidías que van desde diploides ($2n = 2x = 24$) hasta pentaploides ($2n=5x=60$) en papas cultivadas y desde diploides hasta hexaploides ($2n = 6x = 72$) en especies

silvestres. Las variedades cultivadas son muy diversas, y existen cientos de clones con diferentes colores y formas de tubérculo, variaciones en las flores, hojas y hábitos de crecimiento (Spooner et al. 2005).

Las diferencias taxonómicas y moleculares llevaron a subdividir la especie *S. tuberosum* en dos subespecies *S. tuberosum* spp. *andigenum* y *S. tuberosum* spp. *tuberosum* (Hawkes 1994). Existe una gran controversia sobre cual subespecie dio origen a los cultivares modernos. Sin embargo, hay bastante consenso respecto a que las variedades criollas chilenas derivan de las variedades andinas (Bradshaw 2006). *S. tuberosum* spp. *andigenum* está adaptada a condiciones de días cortos, y es cultivada principalmente en los Andes. Juzepczuk y Bukasov (1929) propusieron que los cultivares modernos de *S. tuberosum* se originaron en las variedades chilenas. Hawkes (1990) sugirió que los cultivares modernos tienen su origen en variedades andígenas y que hubo un posterior mejoramiento con variedades andígenas, chilenas y silvestres. Hawkes, basándose en similitudes morfológicas y en la capacidad de floración y tuberización en condiciones de día largo, clasificó a las variedades criollas chilenas y los cultivares modernos bajo el nombre de *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (Raker y Spooner 2002; Huamán y Spooner 2002).

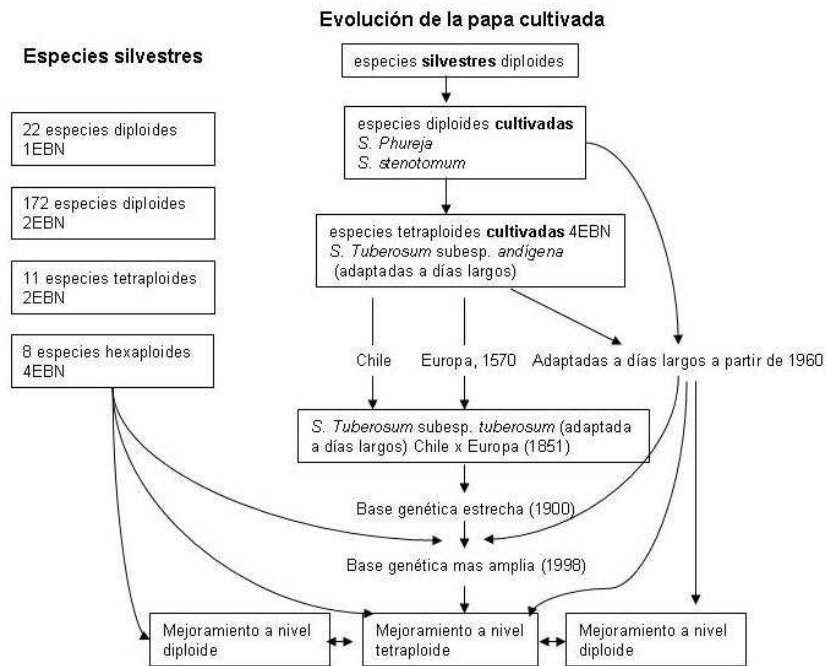


Figura 1. Esquema del aprovechamiento del germoplasma disponible para el mejoramiento de papa (Bradshaw et al. 2006).

Según Simmonds (1995), las especies *S. brevicaula*, *S. leptophyes* y *S. canasense* fueron domesticadas en los Andes en el sur de Perú y el norte de Bolivia hace aproximadamente 7000 años. Más tarde Spooner et al. (2005) propuso un origen de domesticación único en Perú, a partir del complejo de especies de *S. brevicaula*. El resultado de esta domesticación fue la especie diploide *S. stenotomum*, también conocida como *S. tuberosum* (grupo Stenotomum), a partir de la cual se originaron otras especies cultivadas que incluyen *S. phureja* (grupo Phureja), *S. tuberosum* subespecie andígena (o grupo Andígena) y *S. tuberosum* subespecie tuberosum (o grupo Tuberosum) (Bradshaw et al. 2006).

En 1570, *S. tuberosum* fue introducida en Europa a partir de variedades chilenas y luego expandida a otras partes del mundo. Probablemente los genotipos introducidos hayan sido pocos, lo que hizo que la base genética de la papa sea bastante estrecha y la amplia diversidad existente, especialmente en las especies andígenas, no sea lo suficientemente explotada (Figura 1) (Hawkes 1990; Spooner et al. 2005).

1.2. *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum es una bacteria gram negativa patógena que causa la enfermedad conocida como marchitez bacteriana de la papa. Este patógeno ataca un gran número de cultivos de importancia agronómica a nivel mundial, como papa, tomate, morrón, berenjena, maní, plátano, e incluso especies forestales como el eucalipto (Hayward 1991). *R. solanacearum* afecta una amplia área mundial, especialmente en zonas tropicales y subtropicales. En los últimos años su incidencia se ha expandido a zonas templadas de Europa y Norte América como consecuencia de la diseminación de cepas adaptadas a ambientes más fríos (Genin y Boucher 2004).

El principal síntoma de la enfermedad es el marchitamiento, probablemente provocado por la falta de agua debido a la acumulación de la bacteria en los vasos del xilema del tallo y la excreción de polisacáridos. La infección generalmente ocurre por la raíz, donde el patógeno entra en el momento de la emergencia de las raíces secundarias o en las heridas causadas al trabajar la tierra (Figura 2) (Genin 2010).

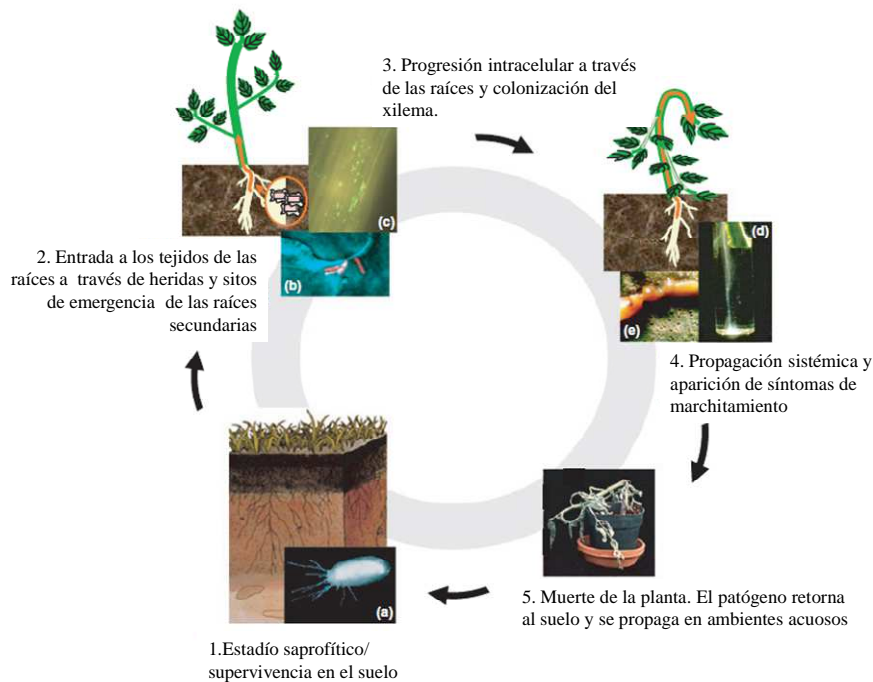


Figura 2. Ciclo de la marchitez bacteriana causada por *Ralstonia solanacearum* (Genin 2010).

Las principales fuentes de inóculo primario son los tubérculos semilla infectados y los suelos infectados (Martin y French 1985). Un problema importante es el uso de tubérculo semilla que es producido en zonas con temperaturas bajas donde la enfermedad se mantiene latente en el tubérculo y se expresa al ser cultivado en zonas con temperaturas más cálidas (Martin y French 1985). La comercialización de semilla contaminada es el principal causante de la dispersión a nivel internacional de la enfermedad. Existe también el problema de la contaminación local de campos, provocada principalmente por la diseminación mediante herramientas contaminadas (Hayward, 1991). Por otro lado, dependiendo de la raza, el patógeno puede llegar a permanecer latente en los campos durante años, principalmente asociado a especies silvestres hospedadoras, restos de plantas infectadas y cursos de agua (Wenneker et al. 1999; Hayward 1991).

R. solanacearum tiene una gran diversidad y ha sido clasificada de diferentes maneras. Buddenhagen et al. (1962) clasificaron la especie en razas, dependiendo del rango de hospederos, y más adelante Hayward (1964) la clasificaron en biovares, basándose en sus diferentes capacidades para metabolizar azúcares y otros carbohidratos. En los últimos años se ha demostrado que esta clasificación fenotípica no es la más indicada para representar la diversidad existente. Esto llevó a clasificar la especie en filotipos basándose en análisis filogenéticos de las secuencias de la región ribosomal intergénica del 16S-23S y los genes de endoglucanasa y *mutS*. Según esta clasificación, *Ralstonia solanacearum* está dividida en 4 filotipos y cada filotipo está subdividido en secuevares. Los filotipos I y II abarcan las cepas originarias de América y Asia, el filotipo III las de África, y el IV las de Indonesia, Japón y Australia (Fegan y Prior 2005).

Tabla 1. Clasificación de *Ralstonia solanacearum* y comparaciones de las clasificaciones (Fegan y Prior, 2005).

<i>Filotipos</i>	Filotipo I			Filotipo II			Filotipo III		Filotipo IV				
<i>Biovares</i>	3	4	5	2T	1	2A	2T	1	2T	1	2	R. sy	BDB
<i>Razas</i>	1		4	5	1		2	3					

Siri et al. (2011) hicieron una caracterización de la diversidad existente en el país, y concluyeron que solo está presente la raza 3 biovar 2, perteneciente al filotipo II. La raza 3 biovar 2 causa daños severos en la producción de papa. Esta se encuentra ampliamente distribuida en Asia, África, América y Europa abarcando un total de 80 países. La superficie mundial afectada abarca 1,5 millones de hectáreas y las pérdidas económicas causadas se estima que rondan los 1000 millones de dólares al año (Champoiseau et al. 2009).

1.2.1. Control de la enfermedad

El control químico es prácticamente imposible de realizar, ya que los pesticidas y antibióticos estudiados han mostrado una muy baja efectividad. Otras estrategias han demostrado ser más efectivas. Una de ellas es el control biológico. Aunque solo a nivel de laboratorio, se han obtenidos buenos resultados con *Bacillus polymyxa* y *Pseudomonas fluorescens* (Smith et al. 1992). También se han obtenido buenos resultados mediante el intercalado de cultivos no susceptibles para evitar el contagio de raíz a raíz, y la rotación con cultivos no susceptibles (Smith et al. 1992). Además, es crucial la detección del patógeno en los tubérculos semilla y evitar su comercialización y consecuente diseminación (Hayward 1991). Esto implica la inhabilitación del campo donde se produce la semilla, lo que implica pérdidas económicas en muchos casos imposibles de afrontar para el productor.

La búsqueda de resistencia genética es una estrategia necesaria para el control de la enfermedad y probablemente sea la solución más práctica para el agricultor (Martin y French 1985). En un contexto ideal, un manejo integrado de todas estas prácticas junto con el uso de resistencia genética sería lo más indicado (Hayward 1991).

1.3. FUENTES DE RESISTENCIA GENÉTICA

La búsqueda de resistencia genética a *R. solanacearum* ha tenido buenos resultados en algunos cultivos como tabaco y maní (Hayward 1991). En tomate se han encontrado fuentes de resistencia y se han desarrollado cultivares como Hawaii, Venus, y Saturn, pero estos se comportan como susceptibles a temperaturas altas (Mew et al. 1977). Lacombe et al. (2010) realizando métodos de transgénesis reportan la obtención de plantas de tomate y tabaco resistentes -mediante la transferencia de un receptor de membrana EFR de *A. thaliana* que reconoce patrones conservados de patógenos en bacterias, *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Clavibacter michiganensis* spp. *michiganensis*, y *R. solanacearum*.

Aunque algunos cultivares muestran una resistencia moderada, no se han identificado cultivares resistentes en papa. El CIP desarrolló los cultivares resistentes Molinera y Caxamarca producto de la hibridación de *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* con clones resistentes de *S. phureja* (Sequeira, 1979). Estos cultivares mostraron una buena resistencia a las razas 1 y 3 a bajas temperaturas, pero se muestran susceptibles a temperaturas altas (Sequeira 1979; French y De Lindo 1982). Algo similar sucede con los cultivares Achat (de origen alemán, probablemente producto del cruce entre *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* y germoplasma silvestre) y Cruza 148 (de origen mexicano, probablemente producto de la hibridación *S. tuberosum* X *S. demissum*) (Martin 1979) los cuales muestran una resistencia parcial.

A pesar de los grandes esfuerzos por parte del CIP se han encontrado pocas fuentes de resistencia en las especies silvestres de papa. Además de la ya mencionada *S. phureja*, se seleccionaron las especies *S. chacoense*, *S. sparsipillum* y *S. multidissectum*, pero luego de varios años los materiales híbridos obtenidos aun conservan un contenido de glicoalcaloides relativamente alto (French et al. 1997).

1.4. *Solanum commersonii*

Solanum commersonii ($cmm=2n=2x=24$) es una especie tuberifera silvestre emparentada con *S. tuberosum* cuyo centro de origen primario es Uruguay, el litoral argentino y el sur de Brasil (Hawkes, 1990). Esta especie tiene varias características interesantes para el mejoramiento, como resistencia a frío, tolerancia a altas temperaturas (Chen et al. 1980; Palta et al. 1981), y resistencia a varios estreses bióticos como virus, nematodos y hongos (Laferriere et al. 1999). Además presenta resistencia a *R. solanacearum* (Laferriere et al. 1999).

Siri et al. (2009) hicieron una colecta en Uruguay de 30 accesiones de *S. commersonii* y evaluaron la diversidad genética y los grados de resistencia frente a la inoculación con una cepa de filotipo II secuevar 1-2 de *R. solanacearum*. Se observó una amplia diversidad genética y variabilidad en la resistencia, y se identificaron tanto genotipos susceptibles como asintomáticos frente a inoculación en hoja. Estas

características hacen de *S. commersonii* una especie muy promisoría en el mejoramiento de papa como fuente de variabilidad genética y especialmente como fuente de resistencia a *R. solanacearum*.

Se han realizado cruzamientos de *S. commersonii* x *S. tuberosum* con el fin de transferir estas propiedades de interés al germoplasma de papa, pero estos intentos han sido en base a una cantidad limitada de clones (Carputo et al. 1997; Laferriere et al. 1999). González realizó cruzamientos entre cmm y tbr haciendo uso de una diversidad genética más amplia que la anteriormente utilizada a partir del germoplasma local disponible (González, 2010).

1.5. BARRERAS REPRODUCTIVAS

El cruzamiento entre especies presenta varias barreras. Estas son clasificadas en barreras precigóticas y postcigóticas. Las barreras precigóticas se pueden producir debido a tiempos distintos de floración, atracción de polinizadores diferentes por parte de la flor, fallas en la adhesión del polen al estigma, y crecimiento anormal o interrupción en el crecimiento del tubo polínico. Las barreras post cigóticas se dan luego de la fertilización e implican el aborto del embrión o la producción de las generaciones subsiguientes estériles o con baja fertilidad (Bushell et al. 2003).

Frecuentemente ocurre que el cruce entre plantas con diferente ploidía se ve interrumpido por un desarrollo del endospermo defectuoso (Lin 1983). Un gran número de especies silvestres de papa presentan ploidías diferentes (principalmente diploides) a la papa cultivada (tetraploide), lo que dificulta la hibridación interespecífica. En el caso del cruce entre una especie $2n=2x=24$ con tbr $2n=4x=48$ existen algunas herramientas para superar la barrera de la ploidía, como la obtención de gametos no reducidos $2n$ a partir de la especie diploide o la producción de individuos haploides ($2n=2x=24$) a partir de tbr $4x$, lo que deriva en un híbrido diploide (Hanneman 1999).

Por otro lado una barrera muy común en el caso de las especies de *Solanum* es la falla en el desarrollo del endospermo (Carputo et al. 1997). Se han propuesto varias hipótesis para explicar por qué sucede esto. La más acertada parece ser la propuesta por Nishiyama e Inomata (1966), quienes propusieron que debe haber una razón 2:1 entre los cromosomas de origen materno y paterno en el mismo endospermo (Lin 1983). De todas maneras esta regla no se cumple en muchas especies. En el caso de las especies de *Solanum* algunos cruces interespecíficos violan la regla del 2:1. Un ejemplo es *Solanum acaule* ($2n=4x=48$) el cual no forma híbridos con otras especies tetraploides pero si lo hace al ser cruzada con especies diploides o haploides ($2n=2x=24$) (Hanneman 1999).

Johnston et al. (1980) propusieron la asignación de un Número de Balance de Endospermo (EBN) a cada especie de *Solanum*, y para que un cruce sea efectivo debe cumplir la razón entre EBN materno y paterno de 2:1. El EBN no necesariamente coincide con la ploidía. Existen especies diploides tanto con 1EBN como con 2EBN, triploides con 2EBN, tetraploides con 2EBN, tetraploides con 4EBN y hexaploides con 4EBN. Para que el cruce sea exitoso las especies deben tener un mismo número de EBN. Por ejemplo, no es posible cruzar una especie diploide 1EBN con otra diploide 2EBN, o una diploide 1EBN con tbr haploide (2EBN) (Carputo et al. 1997; Johnston et al. 1980).

1.6. HIBRIDACIÓN *S. commersonii* x *S. tuberosum*

González (2010) realizó cruzamientos entre *S. commersonii* y *S. tuberosum* utilizando como especie puente *S. phureja* y obtuvo híbridos con buenos niveles de resistencia a *R. solanacearum* manteniendo la base genética de *S. tuberosum*. *S. commersonii* es diploide y EBN=1 y *S. tuberosum* es tetraploide 4EBN, por lo que para realizar la hibridación fue necesario seguir una estrategia de cruzamientos

sexuales dirigidos aprovechando la formación de gametos maternos no reducidos $2n$ (figura 3).

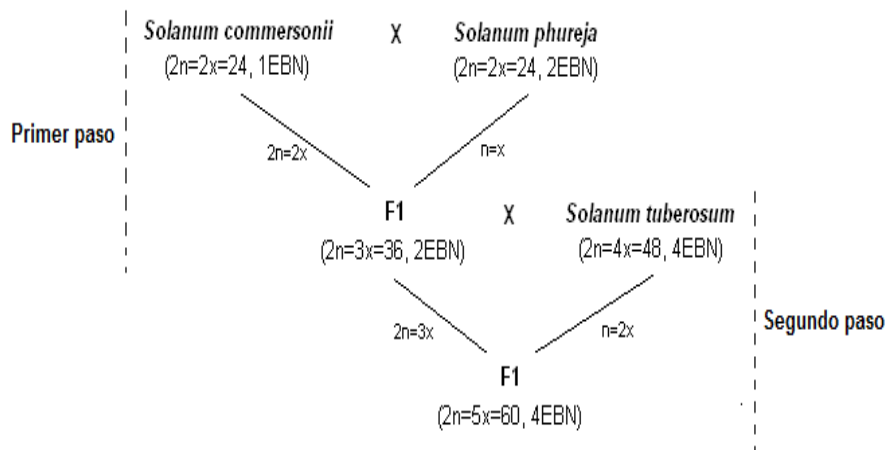


Figura 3. Estrategia de introgresión utilizada por González et al. (2010).

Se obtuvieron individuos del cruzamiento (cmm x phu) x tbr con buenos niveles de resistencia a *R. solanacearum*. La selección en base a resistencia a *R. solanacearum* se realizó en los sucesivos cruzamientos y se observó que la resistencia se mantuvo aun utilizando clones de *S. commersonii* que en un principio mostraban resistencia moderada.

1.7. MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS

Las plantas tienen diversas estrategias para defenderse frente al ataque de patógenos. Como primera estrategia, las plantas pueden defenderse mediante varias barreras que previenen el ingreso del patógeno a las células, como capas de cera, enzimas antimicrobianas, metabolitos secundarios y paredes celulares (Nürnberg et al. 2004).

Una vez que el patógeno supera estas barreras y el patógeno alcanza la célula, existen dos tipos de defensa en las plantas. En una primera instancia, el patógeno puede ser reconocido por receptores de membrana de la célula vegetal, llevando a una respuesta de defensa inducida. Estos receptores son conocidos como receptores de reconocimiento del perfil del patógeno (PRR, pattern recognition receptors) e interactúan con patrones moleculares de la superficie del patógeno (PAMPs, pathogen associated molecular patterns). Los PAMPs son consideradas moléculas irremplazables para la funcionalidad del microorganismo y no forman parte del hospedador. Esto propicia el reconocimiento de estos patrones como extraños a la planta delatando la presencia del patógeno e induciendo la defensa temprana. Este tipo de defensa es conocido también como inmunidad inducida por PAMPs, (PAMP triggered immunity, PTI). En ciertos casos, el patógeno produce efectores capaces de interrumpir la PTI, generando susceptibilidad en la planta. Frente a esto surge la defensa mediada por genes R. Estos receptores interactúan directa o indirectamente con efectores producidos por el patógeno, lo que conduce a una defensa inducida por efectores, (ETI, effector triggered immunity) (Dangl y Jones 2001; Chisholm et al. 2006; Jones y Dangl 2006).

1.7.1. Inmunidad disparada por PAMPs

La percepción del patógeno mediante PRRs por parte de la célula vegetal lleva a una cascada de señales mediada por MAP kinasas (mitogen-activated protein kinase), y ésta a la inducción de la expresión de genes involucrados en una respuesta de defensa, producción de especies reactivas del oxígeno, y fortalecimiento de las paredes celulares. La activación de estos procesos de defensa generalmente evita la entrada del patógeno a la planta (Boller y Felix 2009).

Las PRRs reconocen patrones de la superficie del patógeno altamente conservados (Figura 4). El receptor FLS2 de *Arabidopsis* constituido por motivos extracelulares ricos en leucina y un motivo quinasa, (LRR-RK, leucine rich repeat receptor kinase),

reconoce una zona N terminal conservada (flg22) de la subunidad del flagelo (flagelina). Se han descrito genes ortólogos del receptor FLS2 en varias plantas superiores como tabaco (Hann et al. 2007), tomate (Robatzek et al. 2007) y arroz (Takai et al. 2008). Otra PRR bien caracterizada es el receptor de EF-Tu (EFR) que reconoce el factor de elongación altamente conservado EF-Tu. Este receptor es similar en estructura al FLS2, y también forma parte de la familia de las LRR-RK (Boller y Felix 2009). El EFR ha sido descrito en especies de la familia de las crucíferas y posiblemente sea específico de esta familia. También es parte de este grupo el gen *Xa21* de arroz que confiere resistencia contra *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Este fue descrito en un principio como un gen R pero es de hecho una PRR ya que el gen bacteriano *avrXa21* reconocido por este receptor no sería un típico efector sino una molécula señal de *quorum sensing* (Lee et al. 2006). El *quorum sensing* es un mecanismo mediante el cual un conjunto de células independientes, bajo la generación de señales extracelulares, desarrolla comportamientos sociales coordinados. Cuando se alcanza una concentración umbral, esto indica que la población ha llegado al *quorum* y se empiezan a expresar una serie de genes, lo que desata acciones poblacionales concertadas (Whitehead et al. 2001).

Las PRRs no actúan independientemente. Para que estas proteínas actúen es necesaria la intervención de otro receptor LRR-RLK llamado BRI1-associated kinase 1 (BAK1). Se ha reportado a BAK1 como regulador positivo de FLS2 y EFR y la necesidad de la interacción del receptor FLS2 con el elicitor flg22. El silenciamiento de *BAK1* en *Nicotiana benthamiana* afecta la respuesta a flg22 y otros PAMPs cuyos receptores no han sido identificados. Esto sugiere que BAK1 interactúa con otros receptores de PAMP además de EFR y FLS2 (Zipfel, 2009; Boller y Felix 2009).

Se han caracterizado otro tipo de receptores de PAMPs. El receptor de soja que interacciona con el elicitor heptaglucano aislado del oomicete *Phytophthora megasperma*, b-glucan-binding protein (GBP) es una glucanasa extracelular y aún no se conoce el mecanismo por el cual se encuentra unida a la membrana plasmática (Umemoto et al. 1997). Tampoco se conoce el mecanismo por el cual GBP induce

una respuesta inmune. Otro receptor, EIX2, aislado a partir de tomate, reconoce el elicitor de xilanasas inducido por etileno (EIX, ethylene-inducing xylanase). Este ha sido caracterizado, y contiene un motivo extracelular rico en leucina (LRR), un dominio transmembrana, pero no tiene dominio quinasa intracelular (Ron y Avni 2004). Se ha propuesto que la defensa es inducida como consecuencia de la interacción entre el receptor y una quinasa intracelular (Muller et al. 2008). Se ha identificado otro receptor en arroz, CEBiP, el cual reconoce quitina que es un componente de la pared celular de hongos. Este receptor está formado por dominios extracelulares con motivos de lisina, un dominio transmembrana y una cola intracelular (Kaku et al. 2006).

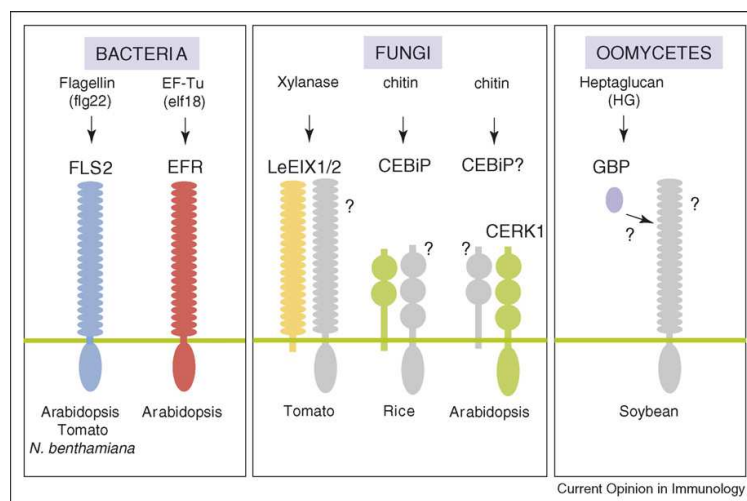


Figura 4. Receptores de PAMPs (PRR) identificados en plantas. Los PAMPs bacterianos flagelina y el factor de elongación EF-Tu son reconocidos por los efectores FLS2 y EFR respectivamente. Las PRRs LeEIX1 y LeEIX2 reconocen el PAMP xilanasas, y las PRRs CeBip de arroz y CERK1 de *Arabidopsis* reconocen quitina. El receptor GBP de soja reconoce un heptaglucono de oomicetes. Aún no se conocen los dominios señal que inician la respuesta en LeEIX, CeBip, y GBP (Zipfel 2009).

Hay muchos reportes de PAMPs cuyos receptores no han sido identificados o caracterizados aún. Se han aislado elicitores de origen proteico, como por ejemplo motivos de unión a ARN (RNP-1) de proteínas de choque térmico (Felix y Boller 2003), o la superóxido dismutasa bacteriana secretada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* y *E. coli* (Watt et al. 2006). También se han identificado elicitores

lipídicos como el ácido araquidónico de los oomicetes (Boller 1995) y el ergosterol (Granado et al. 1995) que inducen una respuesta de defensa en papa y tomate respectivamente. Varios componentes de la superficie de microorganismos actúan como elicitores. Entre estos están los peptidoglicanos que forman parte de la pared celular bacteriana (Gust et al. 2007), o lipooligosacáridos de las paredes de las bacterias gram-negativas (Silipo et al. 2005).

Existen además otros posibles PAMPs aún no confirmados. Señales de *quorum sensing* producidas por bacterias son candidatos. De hecho se ha observado que una de estas moléculas señal, una acil homoserina lactona, es un elicitador de una respuesta de defensa en tomate (Schuhegger et al. 2006). También se ha propuesto como PAMPs a los sideróforos, moléculas producidas por bacterias y hongos que actúan como quelantes de hierro. Por ejemplo, el sideróforo pseudobactina elicitador una respuesta sistémica inducida (ISR) en *Arabidopsis* (Meziane et al. 2005).

Se ha propuesto también la existencia de elicitores propios del hospedero que normalmente no se encuentran disponibles de ser reconocidas y que sólo se liberan luego de la infección microbiana. Estos elicitores se conocen como patrones moleculares asociados a daño, (DAMPs damage-associated molecular patterns, Lotze et al. 2007). Algunos son producidos a partir de la degradación de componentes estructurales de la planta mediante enzimas hidrolíticas producidas por el patógeno como fragmentos de paredes celulares (Darvill et al. 1984), y monómeros de cutina producidos por cutinasas (Kauss et al. 1999), otros son producidas frente a stress o daño como la hormona proteica sistemina (Lotze et al. 2007) y el péptido AtPep1 aislado de *Arabidopsis* (Huffaker et al. 2006).

La inducción por parte de PAMPs conduce a un rápido cambio en el flujo de iones H^+ y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y una consiguiente despolarización. Se induce además una rápida producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Estas moléculas actúan como antimicrobianos y fortalecen las paredes celulares. Se produce también un desencadenamiento de cascadas de señales dependientes de actividad quinásica, (MAPK mitogen activated kinases). Por ejemplo, el

reconocimiento de flg22 activa mediante FLS2 a las quinasas MAPK, AtMPK3 y AtMPK6. MAPK activadas por PAMPs entran en el núcleo y contribuyen a la activación de factores de transcripción WRKY, los cuales están involucrados en la transcripción de genes de defensa (Boller y Felix 2009; Nürnberger et al. 2004).

1.7.2. Inmunidad disparada por efectores

La generación de una PTI en las plantas llevó a los patógenos a evolucionar para evadir esta defensa y poder infectar a su hospedero (Figura 5). Para eso generaron efectores que actúan suprimiendo activamente los mecanismos de defensa disparados por PAMPs o los incluso la inmunidad disparada por efectores (ETI).

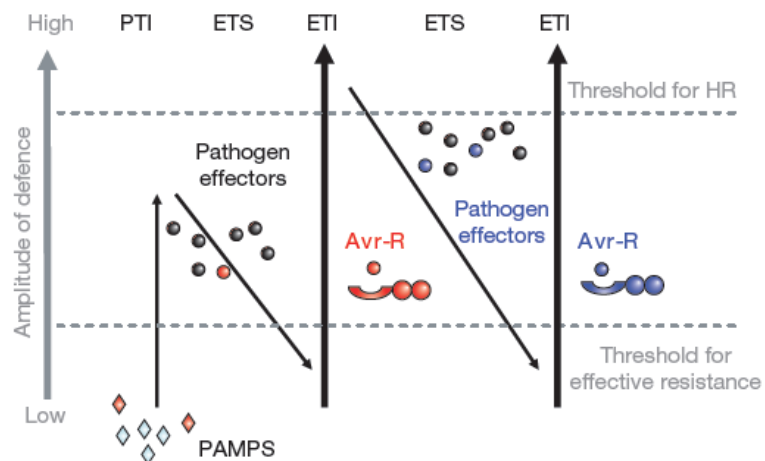


Figura 5. Modelo en zigzag de la defensa en plantas. Las plantas reconocen patrones moleculares conservados del patógeno (PAMPs) mediante receptores (PRRs) y desencadenan una inmunidad disparada por PAMPs (PTI). Algunos patógenos desarrollaron efectores que interrumpen la PTI produciendo susceptibilidad en su hospedador. Frente a esto las plantas generaron proteínas R que reconocen estos efectores y desencadenan una inmunidad disparada por efectores (ETI). Algunos patógenos generaron otros efectores que ayudan a suprimir la ETI. La selección favorece la aparición de nuevos genes R para reconocer los nuevos efectores producidos por el patógeno (Jones y Dangl 2006).

1.7.2.1. Efectores

Las bacterias gram-negativas desarrollaron un mecanismo altamente especializado, el sistema de secreción de tipo III (TTSS), mediante el cual inyectan sus efectores dentro de las células del hospedador. Muchos de los efectores de tipo III (secretados por el TTSS) suprimen la PTI (Figura 5). Estos fueron identificados por su capacidad de inducir una respuesta hipersensitiva (HR) en su hospedador (Mudgett 2005). La inducción de una HR conduce a la resistencia o a la ganancia de avirulencia por parte de la planta. Esto llevó a llamar a los efectores proteínas de avirulencia (Avr) (Alfano y Collmer 2004). En los últimos años se ha tenido un importante progreso en la identificación de nuevos efectores y sus funciones, especialmente debido al secuenciado de los genomas de varios patógenos (Mudgett 2005).

Gran parte de los efectores del TTSS actúan sobre componentes de la PTI (Figura 6) o sobre la ETI inhibiendo o simulando una función biológica de la planta. Por ejemplo, los efectores AvrPto y AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* DC3000 evitan la inducción a través del reconocimiento de la zona N terminal-flg22 de la flagelina actuando antes de las MAPKKK en la cascada de señales. Posiblemente AvrPto tiene acción a nivel del dominio quinasa del receptor FLS2 (Xiang et al. 2008) o sobre el co-receptor BAK1 que interacciona con FLS2 (Shan et al. 2008). AvrPtoB tiene un dominio E3 ligasa que sugiere una función en la degradación de alguna proteína del hospedador (Janjusevic et al. 2006).

Además de los mencionados, hay más efectores que actúan sobre las cascadas de señalización de las MAPK. El efector YOPj de *Yersinia* inhibe las cascadas de las MAP quininas al evitar la activación de las MAPK quininas (MAPKK), y HopAII de *Pseudomonas syringae* que deshidroxila un residuo de treonina de una MAPK y bloquea así la transducción de señales dependiente de MAPK (Zhang et al. 2007).

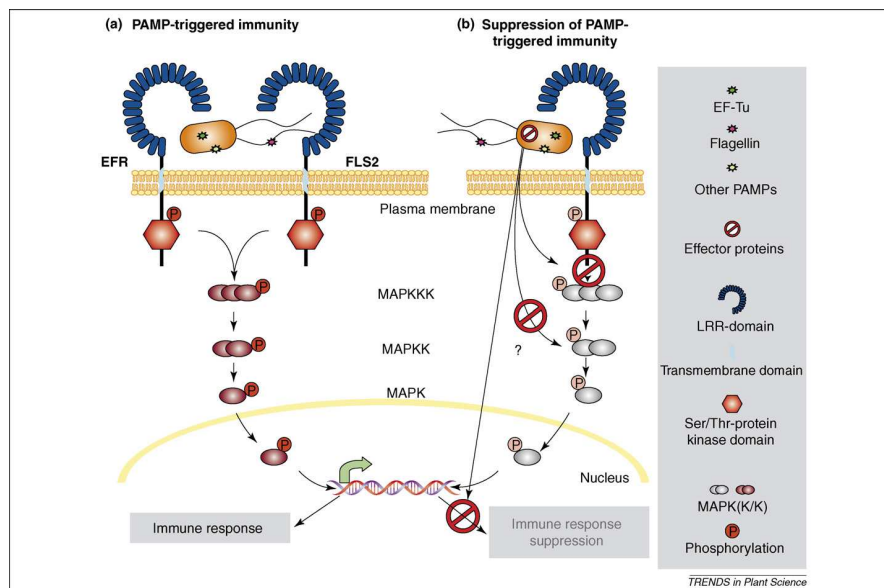


Figura 6. Supresión de la inmunidad disparada por PAMPs mediante efectores del patógeno. Los efectores pueden actuar a distintos niveles de la vía de las MAPK e incluso alterando la transcripción de genes de defensa (Nürnberg y Kemmerling 2006).

Uno de los resultados de la acción de AvrPto es la represión de la defensa basada en el fortalecimiento de la pared celular. También sucede esto con AvrRpt2 y AvrRpm1 (Hauck et al. 2003; Kim et al. 2005). Por otro lado, AvrPtoB inhibe la respuesta hipersensitiva (HR) y la expresión de la proteína PR1 en *N. benthamiana* (Mudget 2005). Esta inhibición de proteínas relacionadas con la patogénesis es muy relevante en respuesta tanto en infecciones de patógenos como en varios estreses abióticos y sido reportada en la interacción planta-patógeno bacterianos como fúngicos (El-Komy et al. 2010; Shapiro y Zhang 2001). También lo hacen AvrPphEpto, AvrPpiB1Pto, HopPtoE, y HopPtoF, todos efectores de *P. syringae* pv. *tomato*.

Algunos efectores, como AvrBs3, AvrXa10 y AvrXa7 de *Xanthomonas*, posiblemente actúan afectando la transcripción durante la infección. Estos tienen un sitio de localización celular (NLS) y un dominio de activación transcripcional (AAD) que apoya esta posible función (Chisholm et al. 2006).

Una compleja red de señales metabólicas inducidas por fitohormonas –tales como ácido salicílico (SA), etileno gaseoso (ET) y ácido jasmónico (JA)- regulan la

resistencia local y sistémica a patógenos invasores. Un diálogo entre diferentes sistemas hormonales permiten a la planta responder apropiadamente frente a un modo particular de patógeno y para integrar el estrés de estímulos bióticos y abióticos (Panstruga et al. 2009). Varios autores han observado que las vías de defensa hormonales del ácido salicílico y el ácido jasmónico involucradas en fenómenos de estrés y en ciertos casos como antagonistas (Pieterse et al. 2009). El ácido salicílico está directamente involucrado en una resistencia sistémica y local, por lo que la inhibición de esta vía conduce a la supresión de la respuesta de defensa de la planta. Existen efectores que aprovechan esto e inhiben la vía del salicílico mediante la inducción de la vía del ácido jasmónico. Por ejemplo la coronatina es una molécula similar al ácido jasmónico, y se ha propuesto que simula el JA endógeno y reprime la vía del SA (Mudget 2005).

El nivel de SA es sentido por el cofactor transcripcional NPR1 el cual ante cambios en el estado redox (Δ Redox), es activado y se mueve dentro del núcleo donde modula la expresión de genes antimicrobianos y vías secretoras necesarias para la resistencia sistémica. Por el contrario, la hormona derivada de lípidos JA y los conjugados JA cooperan con el ET para regular la resistencia en patógenos necróticos que matan las células del huésped cuando se reproducen (Panstruga et al. 2009).

Otros efectores evitan una respuesta mediada por proteínas R que reconocen específicamente efectores y disparan una defensa. Por ejemplo, se ha propuesto que el efector AvrRpt2 de *P. syringae* pv. *tomato* degrada RIN4, una proteína necesaria en la defensa mediada por una proteína R llamada RPS2. La interacción específica de RPS2 con su efector depende de la presencia de RIN4, y la degradación de esta proteína mediante AvrRpt2 evita la activación de RPS2 y por lo tanto no se induce la defensa (Mackey et al. 2002). De todas maneras, generalmente los efectores superan la ETI evitando ser reconocidos por las proteínas R (Tsuda et al. 2009).

1.7.2.2. Genes R

La evolución de los efectores de los patógenos trajo aparejada el desarrollo de un mecanismo de defensa más avanzado basado en la interacción específica directa o indirecta de proteínas de resistencia (proteínas R) con los efectores. Estas proteínas de resistencia frecuentemente son intracelulares y desencadenan la inmunidad disparada por efectores (ETI). Esta interacción es la que clásicamente se conoce como gen por gen, resistencia vertical o raza específica. Esta es la resistencia que ocurre en un cultivar de una especie que posee un gen R particular para un limitado número de razas patogénicas portadoras del efector de virulencia. La resistencia mediada por genes R es ampliamente empleada en programas de mejoramiento para el control de enfermedades. Este tipo de resistencia raramente confiere un amplio espectro de resistencia y es a menudo rápidamente superada por patógenos que evolucionan que pierden o mutan el efector de reconocimiento que no es esencial o que produce nuevos efectores para contrarrestar la ETI (Lacombe et al. 2010).

La mayoría de los genes R aislados (Figura 7) codifican proteínas con motivos ricos en leucina y sitios de unión a nucleótidos (NBS-LRR). Estas pueden ser subdivididas en (CC)NBS-LRR o (TIR)NBS-LRR dependiendo de si su extremo carboxilo terminal es coiled coil o Toll-interleukin-1 receptor. Dentro del grupo de las NBS-LRR están las proteínas RPS2, RPM1, y RPS5 de *Arabidopsis* que interactúan con los efectores AvrRpt2, AvrRpm1/AvrB, y AvrPphB de *P. syringae* (Chisholm et al. 2006).

Otro grupo de proteínas R son las proteínas con motivos LRR extracelulares (eLRR), las cuales están clasificadas en tres tipos: receptores tipo proteínas (RLP, receptor-like proteins) las cuales tienen un dominio LRR extracelular y un dominio transmembrana; receptores tipo quinasas (RLK, receptor-like kinases) con un dominio LRR extracelular, un dominio transmembrana y una quinasa citoplasmática, y una proteína inhibidora de poligalacturonasa, (PGIP, polygalacturonase inhibiting protein) (Fritz-Laylin et al. 2005). Un ejemplo de proteínas eLRR de clase RLKs son las Cf de tomate que confieren resistencia al hongo *Cladosporium fulvum* (Jones et al. 1994).

Existen otras clases de genes R además de las dos mencionadas. El gen R de *Arabidopsis* *RRS1-R* que reconoce el efector Pop2 de *R. solanacearum*. Este gen codifica una proteína TIR-NB-LRR que contiene además un dominio WRKY y un dominio carboxilo terminal de localización nuclear. *RRS-1* interactúa directamente con el efector PopP2 en el citoplasma y esta interacción propiciaría la traslocación de la proteína *RRS1* en el núcleo. Se propuso además que la unión de la proteína Avr al dominio LRR o a TIR activaría al dominio WRKY llevando a la interacción de este con zonas promotoras de genes de defensa induciendo su expresión (Deslandes et al. 2003).

Se ha aislado además una proteína R llamada *Xa27* de arroz que no presenta homología con las anteriormente mencionadas. Esta reconoce al efector *avrXa27* de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Es además la única proteína R reportada que al ser diferencialmente expresada produce exclusivamente un fenotipo de resistencia (Gu et al. 2005).

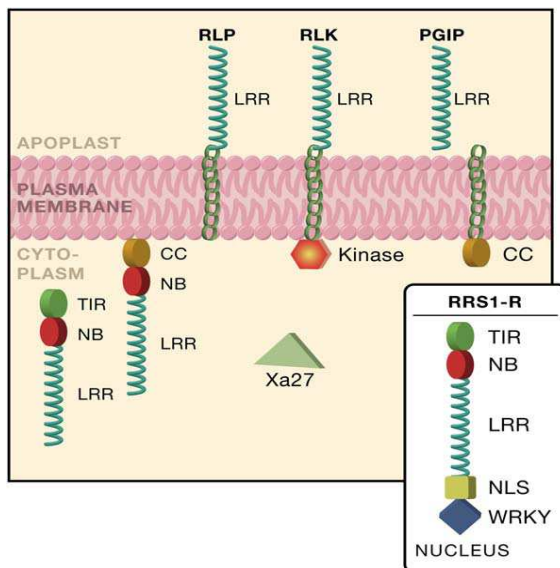


Figura 7. Proteínas R. La mayoría de los genes R codifican proteínas con sitios de unión a nucleótidos y motivos ricos en leucina (NB-LRR). Otro grupo son las proteínas con dominios LRR extracelulares (eLRR). También se ha reportado el gen *RRS1-R* que codifica una clase de proteína NB-LRR con un dominio con homología a factores de transcripción WRKY y un dominio carboxi-terminal señal de localización nuclear (NLS). También se aisló la proteína *Xa27*, que no tiene homología con otras proteínas R (Chisholm et al. 2006).

En el genoma de *Arabidopsis* se han anotado aproximadamente 100 loci de genes R. Este número parece bastante bajo para reconocer todas las proteínas Avr posibles. Como explicación se ha propuesto que las proteínas R reconocen más de un efector.

Hay algunos casos en los que esto ha sido comprobado. En *Arabidopsis*, en donde dos alelos del gen *RPP8/HRT* confieren resistencia a un oomicete y a un virus, y en *RPM1* que reconoce dos efectores no homólogos. También se observó esto en el gen *Mi* de tomate, el cual confiere tanto resistencia a un nematodo como a un áfido (Dangl y Jones 2001).

Como mencionado anteriormente, en varios casos se ha reportado que las proteínas R son receptores que interaccionan directamente con su efector. El modelo receptor-ligando se ha visto reforzado por el hecho de que los efectores son pequeños y se encuentran co-localizados con sus respectivas proteínas R. Sin embargo, en muchos casos no se ha podido observar la interacción directa entre el producto del gen R y su efector. Esto condujo a proponer un modelo en el cual la interacción entre R y su efector es indirecta (llamado modelo de Guarda). Este modelo plantea la existencia de una proteína blanco que interactúa específicamente con el efector. Esta proteína blanco es reconocida por la proteína R, y el cambio conformacional provocado por la interacción del efector con el blanco induce la proteína R y dispara la defensa en el hospedador (van der Hoorn y Kamoun 2009). El modelo de guarda fue propuesto en un principio para explicar el reconocimiento del efector AvrPto de *Pseudomonas syringae* mediante las proteínas Pto y Prf de tomate. En este caso el efector AvrPto interacciona con la proteína quinasa Pto de la planta. La proteína NB-LRR Prf detecta la acción de AvrPto sobre Pto e induce la defensa (Dangl y Jones 2001). El modelo de guarda proporciona una explicación a cómo varios efectores son reconocidos por una sola proteína R y la existencia de un bajo número de genes R para el amplio repertorio posible de patógenos y proteínas Avr (van der Hoorn y Kamoun 2009).

No obstante, el modelo de guarda presenta un problema. En ausencia de proteínas R funcionales, las proteínas blanco necesitan evolucionar para evitar ser reconocidas por su efector. En el caso de que en el hospedador exista una proteína R funcional que interacciona con su proteína blanco, esta última debe evolucionar para reconocer específicamente a los efectores producidos por el patógeno. Esto genera que existan

dos fuerzas evolutivas opuestas. Para explicar esta incongruencia se propuso el modelo “decoy” en el cual existe una molécula “señuelo” que tiene sólo la función de reconocer el efector pero que no tiene función en el desarrollo de resistencia o susceptibilidad (van der Hoorn y Kamoun 2009). De esta manera la presión selectiva favorece el reconocimiento de los efectores por parte de las proteínas blanco pero no existe tal presión en evadir el reconocimiento de estas proteínas por parte de los efectores (Collier y Moffet 2009).

Estos “señuelos” pueden ser producto de duplicaciones de las proteínas blanco o de una evolución independiente que genere proteínas que imitan las proteínas blanco (van der Hoorn y Kamoun 2009).

1.7.3. Vías de señalización posteriores a la percepción del patógeno

Se han reportado pocas diferencias entre los procesos que se observan como consecuencia de una PTI y una ETI. En ambos mecanismos de defensa se han observado cambios en los niveles de Ca^{2+} , la producción de ROS, así como una activación de las vías de señalización de las MAPK (Nürnberg et al. 2004), aunque generalmente la ETI es una respuesta más fuerte y rápida e involucra una HR (Dodds y Rathjen 2010).

Los patógenos reconocidos por genes R elicitán una acumulación de ROS en dos fases. Una primera fase temporal de baja amplitud seguida de una fase más sostenida y de mayor magnitud. Los patógenos que provocan susceptibilidad, inducen sólo la primera respuesta, lo que sugiere un rol muy importante de las ROS en la defensa. Se ha propuesto que estos actúan dañando directamente a los patógenos, y también a las mismas células del hospedador (causando una HR). Las ROS colaboran en el fortalecimiento de las paredes celulares mediante el entrecruzamiento de glicoproteínas. También se les ha asignado un rol de señalización en la activación de genes de defensa (Torres et al. 2006).

La defensa efectiva de la planta que se produce luego de los eventos de percepción del patógeno y la señalización temprana es dependiente de las fitohormonas. Una vez

que el patógeno supera las barreras primarias y es detectado localmente por los mecanismos de defensa, se induce una respuesta sistémica que llega a otras zonas distantes del sitio de infección para evitar la entrada del patógeno a zonas no dañadas. La respuesta sistémica adquirida se produce tanto frente a una PTI como a una ETI y está asociada a la producción de SA tanto localmente como en zonas alejadas a la infección y a la inducción de varias PR. En general, la vía del SA actúa de manera antagonista a la vía del JA/ET.

Los patógenos de plantas pueden ser clasificados en aquellos que matan el huésped y se alimentan de sus contenidos (necrótrofos) y aquellos que requieren un huésped vivo para completar su ciclo de vida (biótrofos). Los patógenos necrótrofos a menudo son acompañados por la producción de toxinas. Los virus son por excelencia biótrofos aunque en algunos casos la infección puede llevar a la muerte celular del huésped. Las bacterias y los hongos pueden adoptar ambos estilos de vida (Dangl y Jones 2001). En el mismo sentido, las respuestas de la planta pueden caracterizarse de acuerdo al tipo de patógeno que las afecta, por ejemplo, la respuesta de resistencia mediada por NB-LRR es efectiva contra patógenos que pueden crecer solamente en tejidos del huésped (biótrofos obligados) o hemibiótrofos pero no contra patógenos que pueden matar el tejido del huésped durante la colonización (necrótrofos), (Jones y Dangl 2006).

En general, los patógenos biótrofos son particularmente sensibles a la defensa regulada por SA, mientras que los necrotróficos son controlados mediante defensas que involucran JA y ET. También la respuesta a heridas está mediada por JA (Pieterse et al. 2009). Sin embargo, se ha observado que las vías de señalización del SA, el ET, y el JA pueden contribuir positivamente a la defensa tanto contra patógenos biótrofos como necrótrofos y actuar de forma sinérgica y superpuesta (Tsuda et al. 2009).

Las vías hormonales interactúan con diferentes actores; el SA es detectado por el cofactor NPR1, el cual es activado y entra en el núcleo para regular la expresión de

genes de defensa y activar vías necesarias en la respuesta sistémica. El ET interacciona con factores (ETRs) que inician cascadas de señalización que se traducen en la activación de factores de transcripción, como EIN3 o ERF (Panstruga et al. 2009).

En respuesta a infecciones locales con patógenos necrotizantes las plantas despliegan una inmunidad aumentada frente a otros sitios secundarios de infección (resistencia sistémica adquirida-SAR systemic acquired resistance). Se inducen una serie de genes denominados relacionados con la patogénesis (PR) tanto a nivel local en el tejido como a distancia, en paralelo a la inducción del SAR. La acumulación de ácido salicílico es necesaria para la inducción del SAR (El-Komy et al. 2010).

Los genes que codifican proteínas relacionadas con patogénesis se inducen frente a estrés biótico como abiótico. Estas proteínas PR son un grupo heterogéneo de bajo peso molecular, resistentes a la degradación proteolítica y se acumulan en forma predominante en los espacios intercelulares de la hoja frente a diversos estímulos bióticos y abióticos. Entre estas proteínas, PRP-2 es conocido por su actividad β -1,3-glucanasa, PRP-3 por su actividad quitinolítica y PRP-5 por su osmo-permeabilización de la membrana plasmática de hongos. El modo de acción de los miembros de la familia PRP-1 aún no está claro (Xiben Wang et al., 2005). Shapiro y Zhang (2001) sin embargo, en la interacción *Arabidopsis thaliana* – *Pseudomonas syringae* reportaron que están relacionados con la acumulación de SA involucrando las vías NPRI.

La importancia de las proteínas PR en la defensa de la planta se ha relacionado con: (A) la acumulación rápida y temprana a menudo asociada con la incompatibilidad, (b) su actividad antimicrobiana y (c) su capacidad para reducir el desarrollo de los síntomas (Xiben Wang et al. 2005).

2. INSIGHTS ON GENE EXPRESSION RESPONSE OF A CHARACTERIZED RESISTANT GENOTYPE OF *S. commersonii* Dun. AGAINST *Ralstonia solanacearum*.

Narancio R.^{1*}, Zorrilla P.², Robello C.², González M.³, Vilaró F.¹, Pritsch C.⁴, Dalla Rizza M.¹

1- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Las Brujas, Ruta 48 km 10, Rincón del Colorado, Uruguay.

*e-mail: marancio@inia.org.uy

Telephone Number: ++598 - 2367 7641

Fax: ++ 598- 2367 7609

2- Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo, Uruguay.

3- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Salto Grande, Salto, Uruguay.

4- Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780 Montevideo, Uruguay.

2.1. SUMMARY

Solanum commersonii is a wild species related to the cultivated potato. Some *S. commersonii* genotypes have been proven to be resistant to the pathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum*, which causes several damages in potato and other

economically important crops. Here an expression analysis[†] of the response of a resistant *S. commersonii* genotype against *R. solanacearum* was performed using microarrays. The aims of this work were to elucidate the molecular processes involved in the interaction, establish the timing of the response, and contribute to identify genes related to the resistance. The response to the treatment was already initiated at 6 hours post-inoculation (hpi) and was established at 24 hpi; during this period, a high number of genes were differentially expressed and several candidate genes for the resistance of *S. commersonii* to *R. solanacearum* were identified. At an early stage, the photosynthetic process was highly repressed and several genes encoding proteins related to reactive oxygen species (ROS) production were differentially expressed. The induction of *ERF* and *ACC-oxidase* genes related to the ethylene pathway and *PR1* related to the salicylic acid pathway suggested the induction of both pathways, and back up the previously reported hemibiotrophic nature of the pathogen. Four genes related to plant defense and observed to be differentially expressed at the first two time points were validated by real time PCR. This work supports that *S. commersonii* resistance has a genetic basis and potentiates the species as a valuable genetic source for potato breeding against bacterial wilt.

Key words: bacterial wilt, brown rot, microarrays, plant defense, potato breeding, wild genetic resource

[†] artículo enviado a European Journal of Plant Pathology

2.2. INTRODUCTION

The causal agent, *Ralstonia solanacearum*, is a gram-negative bacterium that is classified into five races according to its host range and six biovars according to its biochemical features (Poussier et al. 2000). This bacterium inhabits tropical and subtropical areas although it has been reported a recent spread of Phylotype II/ sequevar 1-2 (race 3 biovar 2) to temperate regions (Genin and Boucher 2004). The control of this pathogen is difficult because it can survive in plant debris or different weed hosts and may be spread through potato seeds (Wenneker et al. 1999). Breeding for resistance could be an advantageous way to control bacterial wilt as it may contribute to a decrease in the use of pesticides and therefore to make production cheaper and with lower impact to the environment.

However, this is difficult to practice in the case of the cultivated potato as very low or null resistance has been found (French and De lindo 1982). Breeders have exploited the use of wild species related to *Solanum tuberosum* as a source of variability in order to transfer genetic resistance against pathogens, and other valuable traits. For instance, resistance to *Phytophthora infestans* has been introgressed into cultivated potato from *S. demissum* (Malcolmson and Black 1966); *S. stoloniferum* has been used to transfer resistance to PVY virus (Hämäläinen et al. 1997; Dalla Rizza et al. 2006); and *S. vernei* has been used as a source of resistance to *Globodera rostochiensis* (Pavek and Corsini 2001; Bradshaw et al. 2006). *Solanum phureja* (Juz. & Buk) has been successfully used to confer resistance against races 1 and 3 of *R. solanacearum*, although this resistance can be suppressed

by high temperatures (French and De lindo 1982). *S. commersonii* is a wild, diploid, tuber-bearing relative of the cultivated potato *S. tuberosum*, native to Uruguay, east of Argentina and south of Brazil. This species has been proven to be a valuable source of genetic variability for potato breeding as it shows interesting traits such as frost tolerance and resistance to several fungal and bacterial pathogens, including high resistance to *R. solanacearum* (Laferriere et al. 1999).

S. commersonii is not cross compatible with *S. tuberosum* because of ploidy and different endosperm balance number (EBN) (Johnston et al. 1980). However, based on natural unreduced gametes of *S. commersonii* and using *S. phureja* (2x, EBN = 2) as a bridge species, it is possible to reach equal EBN between these species in order to introgress genome characteristics from *S. commersonii* (2x, EBN = 1) to *S. tuberosum* (4x, EBN = 4) (González 2010). Hybrids of *S. commersonii* x *S. tuberosum* have been obtained using different strategies for ploidy manipulation (Carputo et al. 1997; Kim-Lee et al. 2005; González 2010).

As a primary defense strategy from pathogen attack, plants have structural barriers and produce constitutive compounds, such as antimicrobial enzymes and glycoalkaloids (Hammond-Kosack and Jones 1996). Once the pathogen enters and is recognized by the plant, a defense response is induced. The inducible immune system of plants is generally classified into two different types. One is the defense mediated by receptors that recognize microbe-associated molecular patterns (PAMPs). These receptors are usually located in the plasma membrane and generally

have leucine rich repeats (LRR) and kinase function (Boller and Felix 2009; Lacombe et al. 2010). The other defense strategy is the gene-for-gene resistance, which is based on pathogen effector recognition by R proteins. Several of the R proteins characterized contain a nucleotide binding site (NBS) and a leucine-rich repeat (LRR) domain; both of which could interact with the pathogen effectors and also be involved in the signaling cascade, leading to a defense response (Chisholm et al. 2006; Jones and Dangl 2006).

There is scant knowledge about plant defense mechanisms involved in response to *R. solanacearum*. An *Arabidopsis thaliana* R gene, *RRS1-R*, which confers resistance to *R. solanacearum*, has been characterized (Deslandes et al. 2002; Lahaye 2002). This gene encodes a NBS-LRR protein with a WRKY domain and an N-terminus similar to a Toll-Interleukin-1 receptor (TIR). Pastuglia et al. (1997) described a receptor-like kinase, *SRK*, involved in the *Brassica oleracea* defense against *R. solanacearum*; while Carmeille et al. (2006) mapped four QTLs that explained resistance in tomato against race 3-phylo-type II, which showed that the resistance to *R. solanacearum* in tomato is quantitative. The mechanisms involved in the resistance of *S. commersonii* to *R. solanacearum* have not been characterized yet. High levels of glycoalkaloids reported in *S. commersonii* prompted us to think that resistance could be based on primary barriers. However, antimicrobial activity present in *S. commersonii* extracts against *R. solanacearum* was not associated with either glycoalkaloid or lectin content (Siri et al. 2004). This led us to think that there must be a genetic inducible component in the resistance. González's (2010) work

suggested that the resistance is quantitative and polygenic, but the processes and genes involved are not known. Thus, it is imperative to shed light into the defense mechanisms implicated in *S. commersonii* against *R. solanacearum*.

Several techniques are available to study differential gene expression. Some of the most used are serial analysis of gene expression (SAGE), cDNA-AFLP and microarrays. There are several examples in the literature of gene expression profiling in plant-pathogen interactions using microarrays. Important crops such as wheat (Fofana et al. 2007), rice (Mosquera et al. 2009) and soybean (Ibrahim et al. 2011) were studied using this technique. Microarray approaches were also employed by Binglin Wang et al. (2005) and Restrepo et al. (2005) to study incompatible and compatible *P. infestans*-potato interactions, respectively. Furthermore, gene expression profiling in response to *R. solanacearum* was evaluated in *Arabidopsis* (Hu et al. 2008) and tomato (Ghareeb et al. 2011). A 44K 60-mer oligo array (Potato Oligo Chip Initiative: POCI) was developed for gene expression analysis of potato. This is based on the Agilent 60-mer oligo synthesis technology (www.chem.agilent.com), which is the most complete and updated representation of the sequenced potato transcriptome; it comprises 44,290 features, 42,034 of which originated from potato. The ESTs were originally obtained from libraries derived from different potato tissues and plants that were in different developmental stages and physiological conditions (including exposure to common scab, *P. infestans*, as well as salt, cold, heat and drought stresses) (Kloosterman et al. 2008).

In this research, a previously characterized resistant plant of *S. commersonii* was chosen to investigate molecular processes related to resistance occurring in a *S. commersonii*-*R. solanacearum* interaction. A serial time-expression profiling experiment using the POCI array was carried out with resistant *S. commersonii* F100 genotype infected with a highly pathogenic strain of *R. solanacearum*. Phylogenetic studies in the genus *Solanum* showed that *S. commersonii* and *S. tuberosum* are closely related. This makes possible genetic recombination and the use of transferred markers (Barone et al. 2001); it also increases the possibilities to find high hybridization percentages with the POCI probes. Therefore, one challenge of this work was to monitor the degree of success using the POCI array in a wild genome species.

Our hypothesis of work was that in the time where the first symptoms of the disease take place on susceptible *S. commersonii* or cultivated varieties, some genetic changes occur in the resistant plants. Thereby, the aims of this research were to identify the moment at which the changes in gene expression start in the resistant *S. commersonii* plants in response to the *R. solanacearum* infection, to have an approximation to the underlying processes the resistance and to identify genes involved in the response that could be candidates for molecular marker development.

2.3. MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Plant materials and inoculation

S. commersonii F100 genotype expressing high level of resistance against *R. solanacearum* was selected within a progeny obtained from a cross between a resistant (05.02.6) and a susceptible genotype (04.203.4) (González 2010). Plantlets were propagated and maintained *in vitro*. After growing *in vitro* for 25 days, plants were transferred to 250 cm³ plastic pots containing a sterile mixture of soil:peat-based compost (1:1, v/v) in a greenhouse under 12-h day length, with a mean temperature of 28° C by day and 24° C by night. Plants were acclimated to this environment for 10 days before inoculation. Strain *UY036* of *R. solanacearum* corresponding to Phylotype II/ sequevar 1-2 (race 3 biovar 2) was used as inoculum, prepared as a suspension of bacteria as described by Siri et al. (2011). Plants were inoculated into damaged roots using 1 mL of bacteria suspension (10⁸ CFU/mL) or mock-inoculated with 1 mL of saline solution as control. Stem tissue samples surrounding crown areas were collected at 6 hours post-inoculation (hpi), 24 hpi, 48 hpi and 120 hpi. In the last timepoint (five days), susceptible *S. tuberosum* plants expressed the first symptoms (Siri et al. 2011). Three biological replicates were made at every timepoint for each treatment (inoculated and mock inoculated plants). Every replicate consisted of a pool of three plants. Once collected, samples were immediately frozen in liquid Nitrogen and stored at -80° C until the RNA extraction.

2.3.2. Sample preparation

Total RNA was isolated by phenol-chlorophorm as described by the manufacturer (Trizol, Invitrogen). RNA quality was evaluated by Bioanalyzer 2100 and RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) and quantification was determined using a NanoDrop 1000 Thermo Scientific spectrophotometer. Only RNA samples with RNA integrity number (RIN) values above 7 were used for the expression analysis. A 1 µg aliquot of total RNA was reverse-transcribed into cDNA and this cDNA was subsequently transcribed into cRNA and labeled using the Quick Amp Labeling Kit, 2 Color (Agilent Technologies). Labeled cRNA was purified using Illustra RNAspin mini Isolation kit (GE Healthcare). The quality of each cRNA sample was evaluated by total yield and specificity was calculated based on NanoDrop ND-1000 spectrophotometer measurement (NanoDrop Technologies).

Labeled RNAs were co-hybridized to the arrays. Arrays were incubated at 65°C for 17 h in Agilent's microarray hybridization chambers for hybridization. After hybridization, arrays were washed according to the Agilent protocol (www.chem.agilent.com). Glass slides were scanned with an Agilent G2565BA microarray scanner using default settings for all parameters.

2.3.3. Microarray analysis

For the hybridizations, three independent biological replicates for each timepoint were performed, with the exception of 120 hours post-inoculation, where only two

biological replicates were done (one of the three arrays was discarded due to poor array quality). In total, eleven hybridizations were performed in this study.

Intensity quantification, data filtering and normalization were performed with Agilent's Feature Extraction software (v 9.5.1). This software automatically normalized within arrays and flags any outlier spots caused by saturation or non-uniformity. Further details can be obtained from the Feature Extraction user guide <http://www.chem.agilent.com>. Array quality was assessed by Agilent control features as well as spike-in controls (Agilent 2-Color Spike-in Kit for RNA experiment).

Statistical analyses were done with Multi experiment viewer (MEV) V4.5.1 program (Saeed Al et al. 2003). Genes significantly up and down-regulated were identified by *t*-test analysis based on *t* distribution with a *p*-value of 0.05, comparing the inoculated and control samples from the same timepoint. Those genes that showed more than a 2-fold expression were selected as up-regulated and the ones that showed values below 0.5-fold were selected as down-regulated. We also used the Mapman program (mapman.gabipd.org) in order to have an orientation on the either induced or repressed signaling pathways.

2.3.4. Real time PCR validation

To validate microarray profiling results, four genes showing differential expression were selected for further analysis by real time PCR. Validation of selected genes was

done by comparing levels of gene expression of the resistant genotype in the presence/absence of bacteria. Expression levels of elongation factor-1 alpha (EF-1 α) gene were used as an internal control (housekeeping gene) (Nicot et al. 2005). Levels of gene expression were calculated by the relative delta delta Ct method (Schmittgen and Livak 2008). Three independent biological replicates per sample were performed. The RNA used in the experiments was previously treated with DNase I (Fermentas) and the cDNA was synthesized using reverse transcriptase II (Invitrogen). PCR reactions were performed in a total volume of 25 μ L and 0.3 μ M of primers using the QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen). The reaction conditions were one step of denaturation at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of one step at 94°C for 15 s followed by one step at 60°C for 60 s. A melting step was added in order to detect non-specific PCR products.

2.4. RESULTS

Based on the Agilent quality control reports, we could conclude that the hybridization performed successfully. Hence, this work showed that POCI array was useful to analyze the expression in an interaction involving the potato-related species *S. commersoni* and *R. solanacearum*. However, it should be noted that, as the array was designed using *S. tuberosum* ESTs, it may thus have missed *S. commersonii*-specific disease resistance genes which were not represented on the chip.

To identify differentially expressed genes, expression intensity ratios between the infected and mock inoculated samples were analyzed within a five-day period after inoculation. A gene was considered to be differentially expressed when the fold change was over 2 and the associated *p*-values lower than 0.05 from Student's *t*-test. The analysis showed that 1501 genes, which comprised approximately 3.6% of the genes represented on the array, were differentially expressed in one timepoint at least. In the evaluated period, a total of 395 genes (approximately 0.9% of the array) and 1106 (2.6%) were shown to be up-regulated and down-regulated, respectively.

At 6 hpi, the number of down-regulated genes was more than twice the number of up-regulated genes. The same tendency was observed at 48 hpi (Figure 1). However, at 24 hpi, dramatically fewer genes showed significant changes in their expression (which could be due to high variability between replicates). Moreover, at this timepoint, the number of significantly up-regulated genes was higher than the number of significantly down-regulated genes. Similar results were observed at 120 hpi (Figure 1).

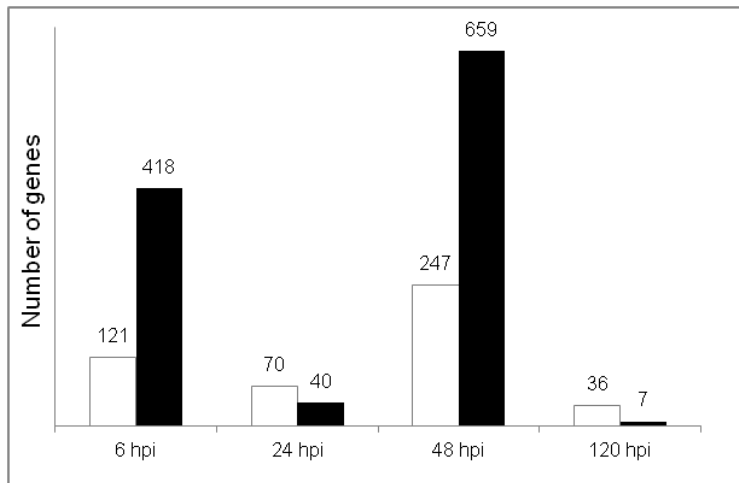


Fig. 1 Number of *S. commersonii* differentially expressed genes at different hours post inoculation with *R. solanacearum*. White bars represent up-regulated genes and black bars represent down-regulated genes. Only genes showing a significant 2-fold change and *p*-values lower than 0.05 were considered

The annotations of up-regulated and down-regulated genes were downloaded from the POCI page (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci>). To complement this information, a search by BLASTx at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database, using the Blast2go program, was performed (Conesa et al. 2005). The genes that showed E-values $<1e10^{-10}$ were considered as highly homologous. Blast2go program was also used to get gene ontology terms associated with each blast hit as well as their corresponding functional associated terms. Significant matches were found for 1167 out of the 1501 differentially expressed genes. The remaining 334 genes had unknown function. Some of the genes with unknown function were highly up-regulated. For example, expression levels of MICRO.13072.C1 probe were induced 28.4-fold at 6 hpi and 43.3-fold at 48 hpi, of

MICRO.6562.C1 probe 21.9-fold at 6 hpi and of MICRO.9272.C1 probe 4.1-fold at 24 hpi.

Some signaling pathways characteristic of plant defense were activated. The ethylene pathway seemed to be already activated at 6 hpi when the gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase enzyme (ACC oxidase), which is directly involved in the ethylene synthesis, was induced. In addition, a gene related to the ethylene pathway (probe MICRO.13456.C1) was up-regulated 6.7-fold at 24 hpi. This gene encodes an ethylene-response transcription factor (ERF) from the subfamily B-4 of ERF/AP2. Moreover, two *PR-4-like* genes (probes MICRO.11296.C1 and bf_suspxxxx_0020H12.t3m.scf), which have been reported to be responsive to ethylene signaling (Hirsch et al. 2002), were induced at 120h. On the other hand, three genes encoding EIN3-Binding F box proteins (EFB1) were repressed at 48 h. EFB1 proteins mediate down regulation of ethylene signaling cascade through proteasome degradation of EIN3, a key ethylene transcription factor (An et al. 2010).

Up-regulation of several *PR1* (pathogenesis related protein 1) genes was observed. A *PR1* gene identified with the MICRO.5426.C4 probe name was up-regulated 14.6-fold at 24 hpi. Another *PR1* (MICRO.16957.C1) was up-regulated 3.5-fold at 48 hpi. The PR1 protein has been reported as a marker of the activation of the salicylic acid signaling pathway (Schenk et al. 2000; Laird et al. 2004). Induction of a gene encoding a putative pathogenesis related protein (MICRO.15316.C1) was also found at 48 hpi. An OBP3-responsive gene 1 (ORG1) (probe MICRO.15909.C1) was

induced 2.5 and 2.6-fold at 6 and 48 hpi, respectively. Although the function of this gene is unknown, expression of ORG1 is known to be induced by salicylic acid. This gene has been shown to be a direct target for OBF-binding protein 3 (OBP-3), a one finger (Dof) transcription factor, which is also salicylic acid responsive (Kang et al. 2003).

Both, salicylic acid signaling and expression of pathogenesis related proteins are associated with an oxidative burst. A high proportion of proteins related to reactive oxygen species (ROS) production was differentially expressed (Figure 2). For example, genes encoding a superoxide dismutase (MICRO.1819.C1) and an oxidoreductase (bf_mxflxxxx_0014e02.t3m.scf) were induced at 6 hpi, and several *peroxidase* genes were differentially expressed at all analyzed timepoints (some of these were up and others down-regulated).

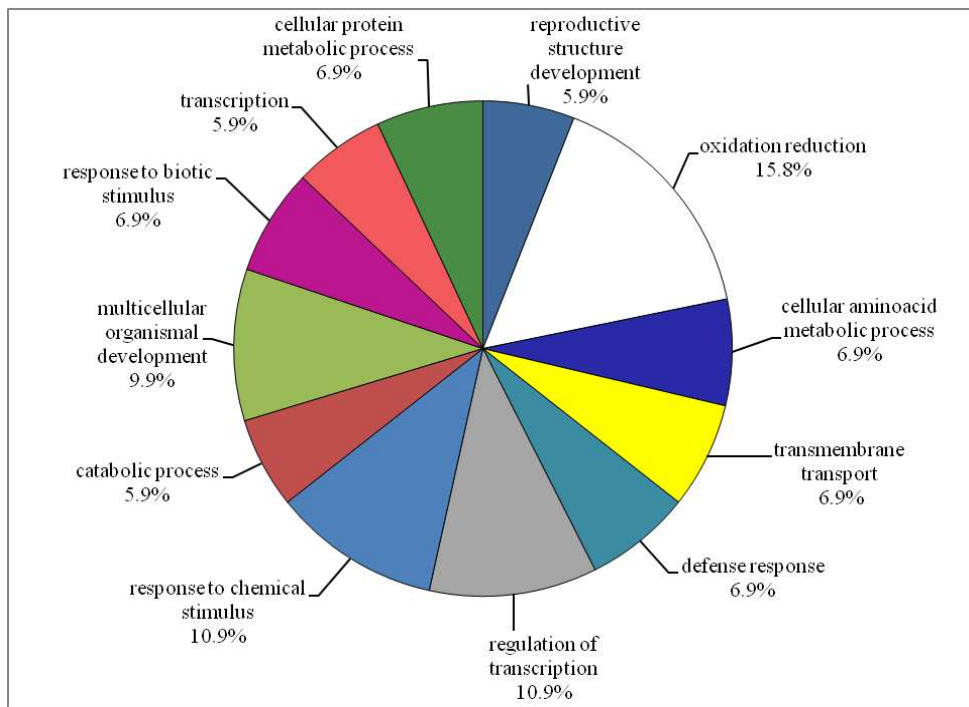


Fig. 2 Multi-Level pie chart representing the proportion of gene processes according to the Gene Ontology website up-regulated in the response at 6 hours post-inoculation (hpi)

There was also differential expression of other genes encoding proteins generally involved in plant defense response. A *lipoxigenase* gene (MICRO.6663.C8), which was down-regulated at 6 hpi, was induced at 24 hpi and another one (STMMH23TH) was induced at 120 hpi. These enzymes are involved in plant defense probably by the synthesis of compounds with signaling functions and they also have been associated with a hypersensitive response (Hammond-Kosack and Jones 1996; Porta and Rocha-Sosa 2002). Sixteen genes encoding protease inhibitors from the kunitz-type family were highly down-regulated at 6 hpi. Five of these sixteen genes were induced at 48 hpi, although no differential expression was detected at 24 hpi.

Protease inhibitors are expressed in plants for defense from proteases secreted by the pathogens (Habib and Fazili 2007). Additionally, an *osmotin-like protein* gene (also called PR5 or thaumatin-like protein) (probe MICRO.1588.C8) was highly induced (5.9-fold) at 6 hpi. These proteins have been reported to be induced in response to pathogens and water stress conditions (Zhu et al. 1995). Six *P450 cytochrome* genes were up-regulated and nine down-regulated at 6 hpi, four were up-regulated and three down-regulated at 48 hpi, and one was up-regulated and one down-regulated at 24 hpi and 120 hpi, respectively. In addition, a *chitinase* gene (probe MICRO.11279.C2) was induced 3.2-fold at 6 hpi.

Some genes encoding transcription factors generally involved in plant defense were induced and others repressed. For example, two *bzip* transcription factor genes were up-regulated (MICRO.3357.C1 7.1-fold and MICRO.8139.C3 2.6-fold) and three *WRKY* transcription factor genes were down-regulated at 6 hpi. These down-regulated *WRKY* have similarity to *WRKY18*, *WRKY60* and *WRKY70* genes (probes MICRO.189.C9, MICRO.189.C1 and MICRO.4091.C1, respectively). There was also induction of other transcription factors at the earliest timepoint. Some belong to the myb family (cSTS27I8TH and MICRO.8992.C at 6 hpi), others codify for nac-like transcription factors (MICRO.12856.C1 4-fold and bf_mxlfxxxx_0059g04.t3m.scf 3-fold). In addition, several ap2 domain-containing transcription factor genes were down-regulated at this timepoint. As it was previously mentioned, an ethylene response factor with an ap2 domain was highly up-regulated at 24 hpi.

Up-regulation of three genes similar to *R* genes was detected at 24 hpi. A putative gene encoding a CC-NBS-LRR class protein (MICRO.12677.C1) was up-regulated 3.1-fold, a gene similar to an *Arabidopsis RPP8* gene, which recognizes *Peronospora parasitica* (020E06AF.esd), was up-regulated 2.4-fold and another gene similar to a *BS2* gene (probe MICRO.4851.C1) was up-regulated 2-fold. The repression of several genes with putative similarity to *R* genes was observed at 48 hpi. There was also a 2.5-fold induction of a gene encoding kinase family protein similar to an *S*-locus lectin at 6 hpi.

The Mapman analysis showed that the photosynthetic process was highly repressed at 6 hpi. This agrees with the observed expression of photosynthesis-related genes, since genes encoding Rubisco, Chlorophyll a/b binding proteins and many compounds of the photosystems I and II, such as subunits D1, D2, CP47, CP43, were down-regulated. The phosphoenolpyruvate carboxylase kinase gene (probe MICRO.712.C30), which has an important role in metabolism, was also down-regulated. No significant differential expression for these genes was detected at the subsequent evaluated timepoints. In relation to metabolism, a gene similar to a cell wall invertase (probe MICRO.10700.C1) was downregulated at 6 hpi and induced 3.8-fold at 24 hpi. The function of cell wall invertases is to cleave sucrose in the apoplast into glucose and fructose, thus providing sugars to tissues (Berger et al. 2007).

2.4.1. Cluster analysis

A *k*-means clustering analysis was performed in order to evaluate the group behavior of the studied genes. Only genes with significant expression at 6 hpi were selected for clustering. Clusters were classified in 14 groups. The most prominent gene changes were observed in clusters 1, 2, 3, 8, 9 and 10. Cluster 1 included 32 genes induced at the timepoints 6, 48 and 120 hpi. Some of these have similarity to defense related genes generally induced early in a response, such as *cytochrome p450* genes, *PR10*, and the previously mentioned Osmotin-like protein (Figure 3 a). Cluster 2 included genes that were highly repressed at 6 hpi and highly induced at 48 hpi (Figure 3 b), and that were similar, almost exclusively, to protease inhibitors. Cluster 3 showed a high number of genes related to photosynthesis (Figure 3 c) and also included oxidoreductases and peroxidases. These genes were highly repressed at 6 hpi, increased their expression levels after 24 hpi and were highly induced at 48 and 120 hpi. Genes in cluster 8 had a similar behavior, although not as accentuated, to those in cluster 3; and similarly to cluster 3, a high number of genes in cluster 8 were related to photosynthesis. Down-regulated genes at all timepoints were included in cluster 4. In cluster 10, genes were down-regulated at 6 hpi and moderately induced at 24 hpi and 48 hpi. Some genes encoding transcription factors were identified in this cluster, such as WRKY60, two basic helix-loop-helix (bHLH) family proteins and a MADS-box transcription factor. In addition, three possible R genes were included: a gene encoding a disease resistance-responsive family protein, a gene with similarity to *Cf-9* from tomato and a gene encoding an NBS motif.

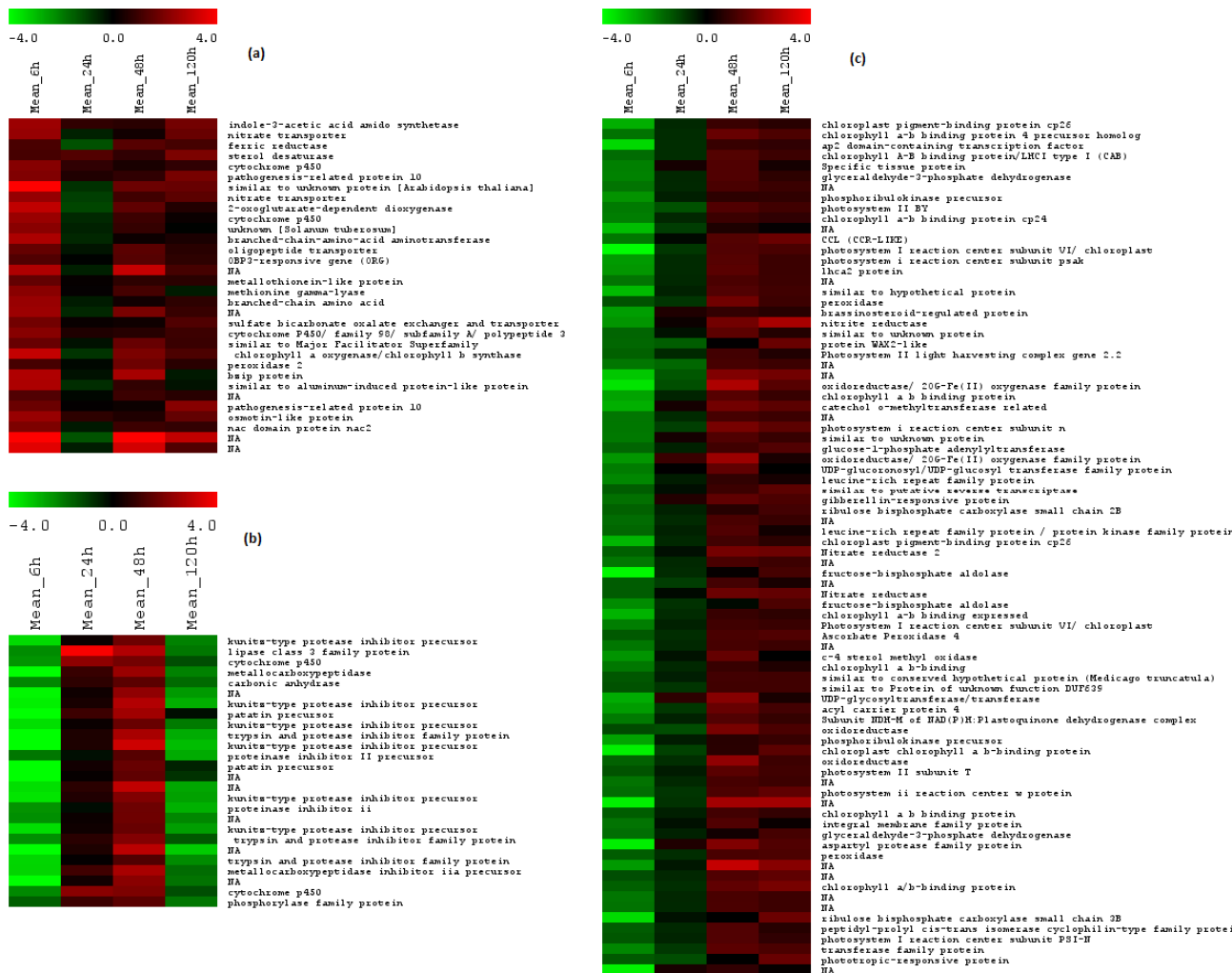


Fig. 3 Clustering analysis showing the behavior of genes during response to *Ralstonia solanacearum*. (A) Cluster 1 (B) Cluster 2 (C) Cluster 3. NA: no annotation founded

2.4.2. Real time PCR validation

Four genes were selected to confirm the reliability of microarray results. The expression level of the evaluated genes was compared against the housekeeping gene *ef1 α* . The expression stability between samples of the *ef1 α* gene was checked in the microarray results and confirmed by real time PCR. One gene induced and one repressed at 6hpi and other two up-regulated at 24 hpi were selected based on their putative role in defense response. An osmotin gene (probe MICRO.1588.C8) observed to be induced by microarrays and a WRKY transcription factor gene observed to be down-regulated by microarrays were chosen from the 6 hpi timepoint (probe MICRO.189.C9). The osmotin proteins were previously reported as having *in vitro* antimicrobial activity towards *Phytophthora infestans* and are also induced in *Arabidopsis* response against *R. solanacearum*. It is known that WRKY transcription factors are also implicated in plant defense and therefore the *WRKY18* gene that was highly repressed (5.7-fold) at 6 hpi was selected. In addition, the differential expression of a gene encoding a putative ethylene response factor (ERF) (MICRO.13456.C1) and *PRI* (MICRO.5426.C4) at 24 hpi was confirmed (Figure 4).

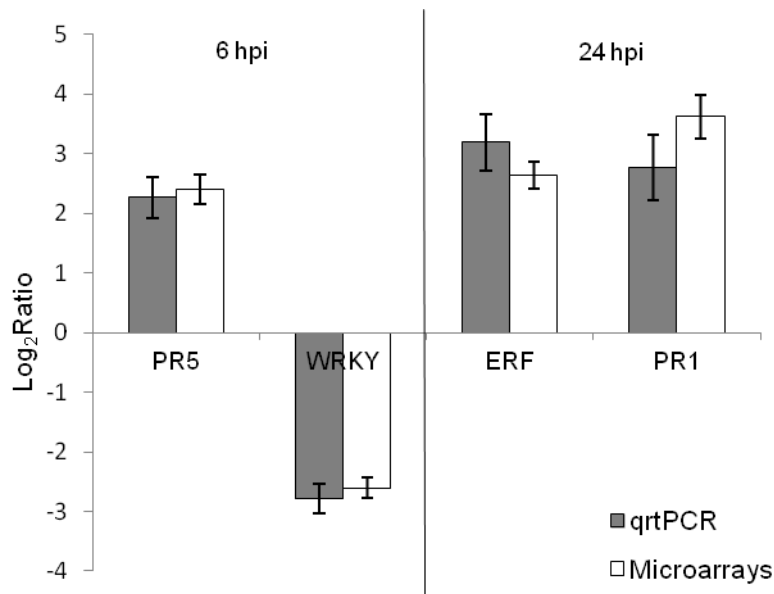


Fig. 4 qrtPCR validation. The expression levels obtained by real time PCR are represented in grey bars, while microarrays results are represented in white bars. Lines with slashed ends represent standard errors. The expression levels are showed in Log₂ ratios at 6 hours post inoculation (hpi) (left quadrant) and 24 hpi (right quadrant). PR5: Pathogenesis related protein 5. Expression of repressed gene WRKY is represented by negative value of the inverse ratio. WRKY: WRKY transcription factor. ERF: ethylene response factor. PR1: Pathogenesis related protein 1

2.5. DISCUSSION

To our knowledge, this is the first work that evaluates a time course response in a potato relative to a pathogen attack. The resistance of *S. commersonii* in response to *R. solanacearum* was shown to be inducible; thus, resistance is not caused solely by a primary defense (e.g. structural barriers or toxic molecules like glycoalkaloids).

This inducible resistance feature supports the use of *S. commersonii* as a genetic source for resistance against *R. solanacearum*.

Based on the global changes of expression patterns, the starting moment of the response was determined at 6 hpi or earlier. At 6 hpi, differential expression of several genes involved in a plant defense was observed. It is important to remark the induction of *PR10* and *PR5* genes at the first timepoint. The induction of *PR* gene expression has been associated to the initiation and duration of systemic acquired resistance (SAR) (Xiben Wang et al. 2005). *PR10* is induced in several plant species in response to biotic stress (Mcgee et al. 2001), whereas the induction of *PR5* was associated to an early response in incompatible interactions between potato and *P. infestans* (Binglin Wang et al. 2005). In addition, these proteins were reported to be induced in response to water stress. One remarkable characteristic of *R. solanacearum* virulence is the exopolysaccharide (EPS) production inside xylem vessels, which causes host wilting probably because of lack of water. Therefore, we propose the induction of *PR10* and *PR5* as a sign of activation of a surveillance alarm against the entering bacteria.

Many of the genes induced at 6 hpi have similarity to transcription factors from the WRKY, bzip and nac-like families. DNA binding proteins with WRKY domains could have redundant, antagonistic and/or synergistic functions, and can interact physically and regulate a defense response either positively or negatively (Eulgem and Somssich 2007). Xu et al. (2006) found that *A. thaliana wrky18/wrky40* and

wrky18/wrky60 double mutants are more resistant to *Pseudomonas syringae* DC3000 and proposed that these transcription factors function as negative regulators of a plant resistance. Interestingly, two of the three WRKY genes repressed in our experiment have similarity to *WRKY18* and *WRKY40* genes, which support an important role of these transcription factors in *S. commersonii* resistance towards *R. solanacearum*, probably by being inactivated as suppressors of the resistance.

It is important to remark the high number of genes that were already differentially expressed at 6 hpi. This result is different to that observed by Hu et al. (2008) in an *Arabidopsis* expression analysis towards *R. solanacearum*, in which samples were taken from leaves. In this case the number of differentially expressed genes at the first timepoints (6, 12 and 24 hpi) was very low. This supports the fact that the genes involved in an early response against *R. solanacearum* are expressed in roots first. It also supports that, despite the symptoms appearing in susceptible plants approximately the fifth day (120 hpi), the entrance of *R. solanacearum* to the plant occurs 6 hours after inoculation or earlier. However, this should be confirmed in further experiments.

There is an induction of some important genes involved in the salicylic acid-mediated response, for example two *PRI* at 24 and 48 hpi and the *ORG-1* gene was up-regulated at 6 and 48 hpi. This is different from what Hirsch et al. (2002) found for an *Arabidopsis* *RRS1-R*-mediated resistance, in which the salicylic acid seems not to be part of the response. This suggests that the genes involved in the *S.*

commersonii resistance are different from the *RRS1-R*-mediated resistance from *Arabidopsis*. The systemic acquired resistance (SAR) involves salicylic acid signalling and induction of PR1 expression, and is generally associated to resistance against biotrophic pathogens. There also exists another kind of response called induced systemic resistance (ISR). This response involves ethylene and jasmonic acid signalling. The ethylene/jasmonic acid pathway has been reported independent of the salicylic acid pathway and is generally induced in response to necrotrophic pathogens (Feys and Parker 2000). We found in our study, the induction of a gene similar to an ERF protein. According to Zhang et al. (2004), these proteins generally interact with GCC boxes and modulate the expression of PR proteins; they also reported an ERF protein, called TSRF1, responsive to ethylene and salicylic acid, which is expressed in tomato in response to *R. solanacearum*. In addition, Hirsch et al. (2002) proved that ethylene signalling is crucial in the *Arabidopsis* response against this pathogen. Chen et al. (2009) also observed the induction of both, ethylene and salicylic pathways, in a defense response of a resistant tomato cultivar against *R. solanacearum*. In line with this, we gathered evidence supporting that the salicylic and the ethylene signalling pathways are activated in resistant plants of *S. commersonii*. This duality in the response supports the hemibiotrophic nature of *R. solanacearum*. Furthermore, it has been stated that the ethylene/jasmonic acid and the salicylic acid pathways are not necessarily antagonistic (Schenk et al. 2000; Tsuda et al. 2009).

R genes may constitutively express proteins that interact with pathogen effectors (initiating a signaling cascade); this could be one reason why the differential expression of these genes is not common. Moreover, R genes usually show very low transcript levels and the microarray technique is not always sensitive enough to detect their expression (Wang et al. 2002). However, in this work we found differential expression of *R*-like genes. We also found at the different times analyzed, the production of several peroxidases, superoxide dismutases and oxidoreductases, all of which support the induction of an hypersensitive response (HR); these proteins form part of an antioxidant system for protection of important biomolecules like DNA, lipids or carbohydrates from damage caused by H₂O₂ produced in an oxidative burst (Torres et al. 2006). The expression of some genes with similarity to *R* genes, proteins related to a ROS burst and enzymes like lipoxygenases suggest an R mediated response. However, in some cases a PAMP triggered immunity (PTI) has similar actors, especially in downstream signaling, which makes it difficult to determine which kind of resistance is taking place here. Although there are not many genes characterized as PAMP receptors, there are several receptor-like kinases (RLK) that are candidates for this function (Montesano et al. 2003). Two genes that encode proteins with similarity to RLKs, a thaumatin-like protein (PR5) and a kinase family protein similar to an S-locus receptor like kinase were induced at the first timepoint. Further studies to elucidate the possible involvement of these proteins in a PTI should be carried out.

Repression of photosynthesis genes was observed at the first timepoint. This is consistent with the reports of Gibly et al. (2004) and Schenk et al. (2000) for incompatible interactions and Restrepo et al. (2005) for a compatible interaction. The shutdown of photosynthesis could be explained by the need of the host to reallocate resources for other processes necessary for defense, such as respiration (Berger et al. 2007). Furthermore, in some cases the requirement for assimilates could cause a conversion of source tissue into sink tissue during plant–pathogen interactions. This could be detected by the induction of cell wall invertase activity (Berger et al. 2007). The observed induction of an invertase gene at 24 hpi in our research supports the conversion of source tissue into sink tissue at the crown of plants.

Three hundred and thirty-four novel genes with unknown function were identified and some of them were extremely highly expressed, like MICRO.13072.C1, which was induced 28.4-fold at 6 hpi and 43.3-fold at 48 hpi. These genes could play an important role in the *S. commersonni* defense response; therefore, further work needs to be done to elucidate the function of these genes.

The inoculation method used to simulate field conditions may not be the most adequate for microarray analysis as very high variability between replicates was observed. This could explain why several genes were significantly expressed at only one timepoint. Despite this, the reliability of the microarray experiment was confirmed by validation using real time PCR for some of the differentially expressed genes. It is important to emphasize that the use of the POCI array designed for potato

performed successfully with its relative species *S. commersonii*. This supports the application of this technology in other potato related species.

2.6. ACKNOWLEDGMENTS:

We would like to thank María Inés Siri, Analía Sanabria and Maria Julia Pianzzola who provided us with the virulent strain *UY036* of bacteria. We wish to thank Silvia Restrepo who helped us in the design of the experiment, and Glenn Bryan, Pete Hedley, Salomé Prat and Roland Schafleitner for the invaluable advices and support in the result analysis. The project was financed by FAO (International treaty on plant genetic resources for food and agriculture). Rafael Narancio was financed by a Master assistantship of the “Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) of Uruguay”. This research was carried out in the context of a CYTED program.

2.7. REFERENCES

An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., Zhang, C., Han, Y., He, W., Liu, Y., Zhang, S., Ecker, J.R. and Guo, H. (2010). Ethylene-Induced Stabilization of Ethylene insensitive 3 and EIN3-Like1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding f-box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22, 2384–2401.

Barone, A., Sebastiano, A., Carputo, D., Della Rocca, F., and Frusciante, L. (2001). Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into the cultivated *S. tuberosum* gene pool. *Theoretical and Applied Genetics*, *102*, 900-907.

Berger, S., Sinha, A.K. and Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, *58*, 4019–4026.

Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and danger signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Reviews of Plant Biology*, *60*, 379–406.

Bradshaw, J.E., Bryan, G.J. and Ramsay, G. (2006). Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilisation in potato breeding. *Potato Research*, *49*, 49-65.

Carmeille, A., Caranta, C., Dintinger, J., Prior, P., Luisetti, J. and Besse, P. (2006). Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, *113*, 110-121.

Carputo, D., Aversano, R., Barone, A., Di Matteo, A., Iorizzo, M., Sigillo, L., Zoina, A. and Frusciante, L. (2009). Resistance to *Ralstonia solanacearum* of sexual

hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *American Journal of Potato Research*, 86, 196–202.

Carputo, D., Barone, A., Cardi, T., Sebastiano, A., Frusciante, L. and Peloquin, S.J. (1997). Endosperm balance number manipulation for direct *in vivo* germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 12013–12017.

Chen, Y.Y., Lin, Y.M., Chao, T.C., Wang, J.F., Liu, A.C., Ho, F.I. and Cheng, C.P. (2009). Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiologia Plantarum*, 136, 324–335.

Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124, 803–814.

Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon M. and Robles M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21, 3674-3676.

Dalla Rizza, M., Vilaró, F., Torres, D. and Maeso, D. (2006). Detection of PVY extreme resistance genes in potato germplasm from the Uruguayan breeding program. *American Journal of Potato Research*, 83, 75-82.

Deslandes, L., Olivier, J., Theulières, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J. and Marco, Y. (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 2404-2409.

Eulgem, T. and Somssich, I.E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 366–371.

Feys, B.J. and Parker, J.E. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics*, 16, 449-455.

Fofana, B., T.W. Banks, B. McCallum, E.S. Strelkov, and S. Cloutier (2007). Temporal gene expression profiling of the wheat leaf rust pathosystem using cDNA microarray reveals differences in compatible and incompatible defence pathways. *International Journal of Plant Genomics*, doi:10.1155/2007/17542

French, D.R. and De lindo, L. (1982). Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in Potato: Specificity and Temperature Sensitivity. *Phytopathology*, 72, 1408-1411.

Ghareeb, H., Bozsó, Z., Ott, P.G., Repenning, C., Stahl, F., Wydra, K. (2011). Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates priming effect. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75, 83-89.

Genin, S., and Boucher, C. (2004). Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Reviews of Phytopathology*, 42, 107–34.

Gibly, A., Bonshtien, A., Balaji, V., Debbie, P., Martin, G.B. and Sessa, G. (2004). Identification and expression profiling of tomato genes differentially regulated during a resistance response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 17, 1212–1222.

González, M. (2010). La resistencia a la marchitez bacteriana de *Solanum commersonii* Dun. y su utilización en el mejoramiento genético de papa. Master Thesis, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Habib, H. and Fazili, K. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2, 68-85.

Hämäläinen, J.H., Watanabe, K.N., Valkonen, J.P.T., Arihata, A., Plaisted, R.L., Pehu, E., Miller, L. and Slack, S.A. (1997). Mapping and marker-assisted selection

for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theoretical and Applied Genetics*, 94, 192–197.

Hammond-Kosack, K.E. and Jones, D.G.J. (1996). Resistance Gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8, 1773-1791.

Hirsch, J., Deslandes, L., Feng, D.X., Balagué, C. and Marco, Y. (2002). Delayed symptom development in *ein2-1*, an *Arabidopsis* ethylene-insensitive mutant, in response to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, 92, 1142–1148.

Hu, J., Barlet, X., Deslandes, L., Hirsch, J., Feng, D.X., Somssich, I. and Marco, Y. (2008). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. *PLoS One*, 3, e2589.

Johnston, S.A., T.P.M. den Nijs, S.J. Peloquin and R.E. Hannieman Jr.. (1980): The significance of genetic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and Applied Genetics*, 57, 5-9.

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

Kang, H.G., Foley, R.C., Oñate-Sanchez, L., Lin, C. and Singh, K.B. (2003). Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, includes novel basic helix-loop- helix domain proteins inducible by salicylic acid. *The Plant Journal*, 35, 362-372.

Kim -Lee, H., Moon, J.S., Hong, Y.J., Kim, M.S., and Cho, H.M. (2005). Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *American Journal of Potato Research*, 82, 129-137.

Kloosterman, B., De Koeijer, D., Griffiths, R., Flinn, B., Steuernagel, B., Scholz, U., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Bryan, G.J., Prat, S., Bánfalvi, Z., Hammond, J.P., Geigenberger, P., Nielsen, K.L., Visser, R.G.F. and Bachem, C.W.B. (2008). Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptional changes using the POCI array. *Functional and Integrative Genomics*, 8, 329-340.

Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., van Esse, P., Smoker, M., Rallapalli, G., Thomma, B.P.H.J., Staskawicz, B., Jones, J.D.G. and Zipfel, C. (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature Biotechnology* doi:10.1038/nbt.1613.

Laferriere, L.T., Helgeson, J.P. and Allen, C. (1999). Fertile *S.tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 1272-1278.

Lahaye, T. (2002). The *Arabidopsis* *RRS1-R* disease resistance gene – uncovering the plant's nucleus as the new battlefield of plant defense? *Trends in Plant Science* 7, 425-427.

Laird, J., Armengaud, P., Giuntini, P., Laval, V. and Milner J.J. (2004). Inappropriate annotation of a key defence marker in *Arabidopsis*: will the real PR-1 please stand up? *Planta*, 219, 1089-1092.

Malcolmson, JF and Black W. (1966). New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica*, 15, 199–203.

McGee, J.D., Hamer, J.E. and Hodges, T.K. (2001). Characterization of *PR-10* pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 14, 877–886.

Montesano, M., Brader, G. and Palva, E.T. (2003). Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, 4, 73–79.

Mosquera, G., Giraldo, M.C., Khang, C.H., Coughlan, S. and Valent, B. (2009). Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as

biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. *Plant Cell*, 21, 1273–1290.

Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L., and Evers., D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56, 2907-2914.

Pastuglia, M., Roby, D., Dumas, C. and Cock., J.M. (1997). Rapid induction by wounding and bacterial infection of an S gene family receptor-like kinase gene in *Brassica oleracea*. *Plant Cell*, 9, 49-60.

Pavek, J. J. and Corsini, D. L. (2001). Utilization of potato genetic resources in variety development. *American Journal of Potato Research*, 78, 433-441.

Porta, H., and Rocha-Sosa, M. (2002). Plant lipoxygenases: physiological and molecular features. *Plant Physiology*, 130, 15–21.

Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Vandewalle, P., Goffinet, B., Luisetti, J. and Trigalet., A. (2000). Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology*, 146, 1679–1692.

Restrepo, S., Myers, K. L., del Pozo, O., Martin, G. B., Hart, A.L., Buell, C. R., Fry, W. E. and Smart, C. D. (2005). Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 18, 913–922.

Saeed, A. I., Sharov, V. White, J. Li, J. Liang, W. Bhagabati, N. Braisted, J. Klapa, M. Currier, T. and Thiagarajan., M. (2003). TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 34, 374–378.

Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. and Manners, J.M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Acadademy of Sciences*, 97, 11655-11660.

Siri, M.I., Sanabria, A. and Pianzola., M.J. (2011). Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. *Plant Diseases*, 95, 1292-1301.

Siri, M.I., Villanueva, P., Pianzolla, M.J., Franco Fraguas, L., Galvan, G., Acosta, M. and F. Ferreira. (2004). In vitro antimicrobial activity of different accessions of *Solanum commersonii* Dun. from Uruguay. *Potato Research*, 47, 127-138.

Torres, M.A., Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, *141*, 373–378.

Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J. and Katagiri, F. (2009). Network properties of robust immunity in plants. *PLoS. Genetics*, *5*, e1000772

Wang, B., Liu, J., Tian, Z., Song, B. and Xie, C. (2005). Monitoring the expression patterns of potato genes associated with quantitative resistance to late blight during *Phytophthora infestans* infection using cDNA microarrays. *Plant Science*, *169*, 1155–1167.

Wang, K.L.C., Hai, L. and Ecker, J.R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, *14*, 131-151.

Wang, X., El Hadrami, A., Adam, L.R. and Daayf, F. (2005). Local and distal gene expression of *PR-1* and *PR-5* in potato leaves inoculated with isolates from the old (US-1) and the new (US-8) genotypes of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Environmental Experimental Botany*, *57*, 1–11.

Wenneker, M., Verdel, M.S.W., Groeneveld, R.M.W., Kempenaar, C., van Beuningen A.R. and Janse, J.D. (1999). *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: First report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology*, *105*, 307-315.

Zhu, B., Chen, T.H.H. and Li, P.H. (1995). Activation of two Osmotin-like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants. *Plant Physiology*, 108, 929-937.

3. CONCLUSIONES

A las 6 hpi la respuesta de *S. commersonii* frente al patógeno *R. solanacearum* ya se encuentra inducida. En un estadio temprano, la fotosíntesis se vio altamente reprimida y varios genes que codifican para proteínas relacionadas con las especies reactivas del oxígeno fueron expresados diferencialmente. En este momento se expresan diferencialmente varios genes que codifican proteínas involucradas en la defensa en plantas, como PR, factores de transcripción WRKY, y enzimas relacionadas con la producción de especies reactivas del oxígeno, entre otras. Las proteínas relacionadas con la patogénesis PR5 y PR10 así como los factores de transcripción WRKY 18 y WRKY 40 surgen como genes candidatos importantes en momentos tempranos de la interacción. El alto número de genes diferencialmente expresados a las 6 hpi nos lleva a suponer que la respuesta se indujo quizás antes, y que en un futuro sea necesario analizar la expresión a tiempos más tempranos con el fin de detectar los genes que encargados de iniciar la respuesta.

Muchos trabajos se enfocan en la búsqueda de genes *R* (van der Linden et al. 2004; Soriano et al. 2005). En este trabajo se identificaron algunos genes putativos similares a genes *R* inducidos a las 24 hpi. De todas maneras, es importante destacar que mediante nuestro enfoque se nos escapan los genes que se encuentran

constitutivamente expresados. Muchos de los genes R no se observan inducidos en análisis de expresión, o su expresión es muy baja como para ser detectada.

Existen muy pocas PRR identificadas y caracterizadas, y por lo tanto hay pocos trabajos enfocados en la búsqueda de estas proteínas. En este trabajo no se observó la inducción de genes que codifican proteínas PRR. Sin embargo, algunas genes inducidos codifican proteínas con características que las hacen candidatas a tener una función de PRR. Debido a su estructura y al alto número y diversidad de RLKs observado en *Arabidopsis*, se ha propuesto a estos receptores como posibles receptores involucrados en la percepción de PAMPs. En el grupo de la RLKs se encuentran las ya mencionadas Osmotin-like protein (PR5) y una proteína similar a una S locus lectin protein. Genes que codifican proteínas similares a estas se observaron inducidas en este trabajo.

Además de la búsqueda de genes R se ha propuesto a genes que codifican para factores de transcripción WRKY como objetivos en la búsqueda de polimorfismos de secuencia y el diseño de marcadores que apoyen la introgresión de resistencia en papa (Trognitz et al. 2002; Vleeshouwers et al. 2000). El apoyo por parte de trabajos anteriores y la identificación del momento y los genes posiblemente involucrados en la resistencia, lleva a proponer a los genes identificados como candidatos en la búsqueda de polimorfismos para el diseño de marcadores moleculares. Para esto, serán necesarios estudios que impliquen comparar expresión de estos genes entre genotipos resistentes y susceptibles de *S. commersonii*, y aislar y secuenciar tanto exones como zonas reguladoras de los genes candidatos con el fin de compararlas en la búsqueda de polimorfismos.

La inducción de la vía del etileno ha sido observada en tomate y en *Arabidopsis* en respuesta a *R. solanacearum*. Este trabajo también demuestra que esta vía se induce en *S. commersonii*. También se observó la inducción de algunos genes que sugieren la activación de la vía del ácido salicílico. La inducción de estas dos vías es en un principio llamativa, ya que la característica antagonista de estas dos vías ha sido

ampliamente reportada (Pieterse et al. 2009). Sin embargo varios trabajos proponen una interrelación más compleja entre estas dos vías. Por ejemplo, el factor de transcripción TSRF1 de tomate que promueve la expresión de varias PR, es inducido tanto por ácido salicílico como por etileno en respuesta a *R. solanacearum* (Zhang et al. 2004). Es importante resaltar que la activación de estas dos vías sostiene la posible característica hemibiotrófica del patógeno en esta interacción.

4. BIBLIOGRAFÍA

- An, F., Zhao Q., Ji Y., Li W., Jiang Z., Yu X., Zhang C., Han Y., He W., Liu Y., Zhang S., Ecker J.R. y Guo H. 2010. Ethylene-Induced Stabilization of Ethylene insensitive 3 and EIN3-Like1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding f-box 1 and 2 that requires EIN2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22: 2384–2401.
- Alfano, J. R., y Collmer A. 2004. Type II secretion system effector proteins: Double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Reviews of Phytopathology*, 42: 385–414.
- Axtell, M.J. y Staskawicz B.J. 2003. Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell*, 112: 369–77.
- Barone, A., Sebastiano A., Carputo D., Della Rocca F. y Frusciante L. 2001. Molecular marker-assisted introgression of the wild *Solanum commersonii* genome into the cultivated *S. tuberosum* gene pool. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 900-907.
- Berger, S., Sinha A.K. y Roitsch T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, 58: 4019–4026.
- Boller, T., y Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and danger signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 379–406.
- Boller, T. 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46: 189–214.
- Bradshaw, J. E., Bryan G. J. y Ramsay G. 2006. Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilization in potato breeding. *Potato Research*, 49: 49–65.
- Buddenhagen, I., Sequeira L., y Kelman A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 52: 726.
- Bushell, C., Spielman M., y Scott R.J. 2003. The basis of natural and artificial postzygotic hybridization barriers in *Arabidopsis* species. *The Plant Cell*, 15: 1430–1442.

- Carmeille, A., Caranta C., Dintinger J., Prior P., Luisetti J., y Besse P. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 113: 110-121.
- Carputo, D., Aversano R., Barone A., Di Matteo A., Iorizzo M., Sigillo L., Zoina A. y Frusciante L. 2009. Resistance to *Ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *American Journal of Potato Research* 86: 196–202.
- Carputo, D., Barone A., Cardi T., Sebastiano A., Frusciante L. y Peloquin S.J. 1997. Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 12013–12017.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 2011. Potato (en línea). 3 de diciembre 2011. <http://cipotato.org/potato>
- Champoiseau, P. G., Jones J. B., y Allen C. 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. *Plant Health Progress*, doi:10.1094/PHP-2009-0313-01-RV.
- Chen, H.H. y Li P. H. 1980. Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species. *Plant Physiology*, 65: 1146-1148.
- Chen, Y.Y., Lin Y.M., Chao T.C., Wang J.F., Liu A.C., Ho F.I. y Cheng C.P. 2009. Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiologia Plantarum*, 136: 324–335.
- Chisholm, S.T., Coaker G., Day B., y Staskawicz B.J. 2006. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124: 803–14.
- Collier, S. M., y Moffett P. 2009. NB-LRRs work a ‘‘bait and switch’’ on pathogens. *Trends in Plant Science*, 14: 521-529.
- Conesa, A., Gotz S., Garcia-Gomez J.M., Terol J., Talon M.y Robles M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21: 3674-3676.
- Dalla Rizza, M., Vilaró F., Torres D. y Maeso D. 2006. Detection of PVY extreme resistance genes in potato germplasm from the Uruguayan breeding program. *American Journal of Potato Research*, 83: 75-82.
- Dangl, J. L. y Jones J.D.G. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411: 826–833.

- Darvill, A.G., y Albersheim P. 1984. Phytoalexins and their elicitors—a defense against microbial infection in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 35: 243–75.
- Deslandes, L., Olivier J., Peeters N., Feng D.X., y Khounlotham M. 2003. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 8024–29.
- Deslandes, L., Olivier J., Theulières F., Hirsch J., Feng D.X., Bittner-Eddy P., Beynon J. and Marco, Y. 2002. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 2404-2409.
- Dodds, P.N. y Rathjen J.P. 2010. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews of Genetics*, 11: 539-548.
- El-Komy, M.H. Abou-Taleb, E.M. Aboshosha, S.M.y El-Sherif, E.M. Differential Expression of potato pathogenesis-related proteins upon infection with late blight pathogen: A case Study expression of potato osmotin-like protein *International Journal of Agriculture and Biology* 12: 179–186.
- Eulgem, T. y Somssich I.E. 2007. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 366–371.
- Fegan, M., y Prior P. 2005. How Complex is the “*Ralstonia solanacearum* Species Complex”? In: *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. Allen, C.; Prior, P.; Hayward, A.C .eds. Minnesota, USA. 449-462, APS Press.
- Felix, G. y Boller T. 2003. Molecular sensing of bacteria in plants—the highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 6201–8.
- Feys, B.J. y Parker J.E. 2000. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics*, 16: 449-455.
- Fofana, B., Banks T.W., McCallum B., Strelkov E.S., y Cloutier S. 2007. Temporal gene expression profiling of the wheat leaf rust pathosystem using cDNA microarray reveals differences in compatible and incompatible defence pathways. *International Journal of Plant Genomics*, doi:10.1155/2007/17542

- French, E.R., Anguiz R., y Aley F.P. 1997. The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum* for the integrated control of bacterial wilt. In: Prior P, Allen C, Elphinstone J (eds) Bacterial wilt disease molecular and ecological aspects. Springer Verlag, Berlin
- French, E.R. y De lindo L. 1982. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in Potato: Specificity and Temperature Sensitivity. *Phytopathology*, 72: 1408-1411.
- Fritz-Laylin, L.K., Krishnamurthy N., Tor M., Sjolander K.V., y Jones J.D. 2005. Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138: 611–623.
- Genin, S. 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist* 187: 920–928.
- Genin, S., y Boucher C. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annual Reviews of Phytopathology* 42: 107–34.
- Ghareeb, H., Bozsó Z., Ott P.G., Repenning C., Stahl F., y Wydra K. 2011. Transcriptome of silicon-induced resistance against *Ralstonia solanacearum* in the silicon non-accumulator tomato implicates priming effect. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 75: 83-89.
- Gibly, A., Bonshtien A., Balaji V., Debbie P., Martin G.B. y Sessa G. 2004. Identification and expression profiling of tomato genes differentially regulated during a resistance response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 17: 1212–1222.
- Gomes, A.M.A., Mariano R.L.R., Michereff S.J., y de Franca J.G.E. 1998. Breeding for resistance to bacterial wilt of potatoes in Brazil. 277-287 Bacterial wilt disease. Prior, P.H., Allen, C.
- González, M. 2010. La resistencia a la marchitez bacteriana de *Solanum commersonii* Dun. y su utilización en el mejoramiento genético de papa. Master Thesis, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Granado, J., Felix G., y Boller T. 1995. Perception of fungal sterols in plants (subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalization in tomato cells). *Plant Physiology* 107: 485–90.
- Gu, K., Yang B., Tian D., Wu L., Wang D., Sreekala C., Yang F., Chu Z., Wang G.L., White F.F., y Yin Z. 2005. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature* 435: 1122–1125.

- Gust, A.A., Biswas R., Lenz H.D., Rauhut T., Ranf S., Kemmerling B., Götz F., Glawischnig E., Lee J., Felix G. y Nürnberger T. 2007. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *Journal Biological Chemistry* 282: 32338–48.
- Habib, H. y Fazili K. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2: 68-85.
- Hämäläinen, J.H., Watanabe K.N., Valkonen J.P.T., Arihata A., Plaisted R.L., Pehu E., Miller L. y Slack S.A. 1997. Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 192–197.
- Hammond-Kosack, K.E. y Jones D.G.J. 1996. Resistance Gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791.
- Hann, D.R. y J.P. Rathjen. 2007. Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant Journal* 49: 607–18.
- Hanneman, R. E. Jr. 1999. The reproductive biology of the potato and its implication for breeding. *Potato Research* 42: 283-312
- Hauck, P., Thilmony R., y He S.Y. 2003. A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 8577–82.
- Hawkes, J. G. 1994. Origin of the cultivated potato and species relationship. En: *Potato Genetics*. Bradshaw J.E.; Mackay G.R. ed. Wallingford, UK. CAB International. pp 3-42.
- Hawkes, J.G. 1990. *The potato: evolution diversity and genetic resources*. Belhaven Press, London.
- Hayward, A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29: 65-87.
- Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology* 27:265-277.
- Hirsch, J., Deslandes L., Feng D.X., Balagué C., y Marco Y. 2002. Delayed symptom development in ein2-1, an *Arabidopsis* ethylene-insensitive mutant, in response to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 92: 1142–1148.

- Hu, J., Barlet X., Deslandes L., Hirsch J., Feng D.X., Somssich I. y Marco Y. 2008. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* during wilt disease caused by the soil-borne phytopathogenic bacterium, *Ralstonia solanacearum*. PLoS One 3: e2589.
- Huamán, Z. y Spooner H.D. 2002. Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* section Petota). American Journal of Botany 89: 947–965.
- Huffaker, A., Pearce G., y Ryan C.A. 2006. An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 10098–103.
- Janjusevic, R., Abramovitch R.B., Martin G.B. y Stebbins C.E. 2006. A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. Science 311: 222–226.
- Johnston, S. A., den Nijs T.M., Peloquin S.J., y Jr. Hanneman R.E. 1980. The significance of genic balance to endosperm development in interespecific crosses. Theoretical and Applied Genetics 57: 5–9.
- Jones, J.D., y J.L. Dangl. 2006. The plant immune system. Nature 444: 323–329.
- Jones, D.A., Thomas C.M., Hammond-Kosack K.E., Balint-Kurti P.J., y Jones J.D. 1994. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. Science 266: 789–793.
- Juzepczuk, S.W. y Bukasov S.M. 1929. A contribution to the question of the origin of the potato. Proc. USSR Congr. Genet. Plant and Animal Breeding 3: 592–611.
- Kang, H.G., Foley R.C., Oñate-Sanchez L., Lin C.y Singh K.B. 2003. Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, includes novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. The Plant Journal 35: 362–372.
- Kaku, H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiyama C., Dohmae N., Takio K., Minami E., y Shibuya N. 2006. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 11086–91.
- Kauss, H., Fauth M., Merten A., y Jeblick W. 1999. Cucumber hypocotyls respond to cutin monomers via both an inducible and a constitutive H₂O₂-generating system. Plant Physiology 120:1175–82.

- Kim -Lee, H., Moon J.S., Hong Y.J., Kim M.S., y Cho H.M. 2005. Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *American Journal of Potato Research* 82: 129-137.
- Kloosterman, B., De Koeyer D., Griffiths R., Flinn B., Steuernagel B., Scholz U., Sonnewald S., Sonnewald U., Bryan G.J., Prat S., Bánfalvi Z., Hammond J.P., Geigenberger P., Nielsen K.L., Visser R.G.F. y Bachem C.W.B. 2008. Genes driving potato tuber initiation and growth: identification based on transcriptional changes using the POCI array. *Functional and Integrative Genomics* 8: 329-340.
- Lacombe, S., Rougon-Cardoso A., Sherwood E., Peeters N., Dahlbeck D., van Esse P., Smoker M., Rallapalli G., Thomma B.P.H.J., Staskawicz B., Jones J.D.G., y Zipfel C. 2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature biotechnology* doi:10.1038/nbt.1613
- Laferriere, L.T., Helgeson J.P., y Allen C. 1999. Fertile *S. tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*. *Theoretical Applied Genetics* 98: 1272-1278.
- Lahaye, T. 2002. The *Arabidopsis* RRS1-R disease resistance gene – uncovering the plant's nucleus as the new battlefield of plant defense? *Trends in Plant Science* 7: 425-427.
- Laird, J., P. Armengaud, P. Giuntini, V. Laval y J.J. Milner. 2004. Inappropriate annotation of a key defence marker in *Arabidopsis*: will the real PR-1 please stand up? *Planta* 219: 1089-1092.
- Lee, S.W., Han S.W., Bartley L.E., y Ronald P.C. 2006. Unique characteristics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* AvrXa21 and implications for plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18395–400.
- Lin, B. Y. 1983. Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics* 107: 103-115.
- Lotze, M.T., Zeh H.J., Rubartelli A., Sparvero L.J., Amoscato A.A., Washburn N.R., DeVera M.E., Liang X., Tör M., Billiar T. 2007. The grateful dead: damage associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunology Reviews* 220: 60–81.
- Mackey, D., Holt B.F., Wiig A., y Dangl J.L. 2002. RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108: 743–54.

- Malcolmson, JF y Black W. 1966. New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica* 15: 199–203.
- McGee, J.D., Hamer J.E. y Hodges T.K. 2001. Characterization of PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant–Microbe Interaction* 14: 877–886.
- Martin, C. y French E. R. 1985. La marchitez bacteriana de la papa *Pseudomonas solanacearum*. Lima, Centro Internacional de la Papa (CIP). 13.
- Martin, C. 1979. Sources of resistance to *Pseudomonas solanacearum* 49-54 *Developments in control of potato bacterial diseases*. CIP, Lima-Perú.
- Mew, T. W. y Ho W. C. 1977. Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. *Phytopathology* 69: 909-911.
- Meziane, H., Van Der Sluis I., Van Loon L.C., Hofte M., Bakker P. 2005. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology* 6: 177–85.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA) 2010. Caracterización de la producción de papa- Encuesta 2010. <http://www.mgap.gub.uy/Diea/Encuestas/default.htm>. Accedido en 2010.
- Montesano, M., Brader G.y Palva E.T. 2003. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology* 4: 73–79.
- Mosquera, G., Giraldo M.C., Khang C.H., Coughlan S.y Valent B. 2009. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease. *Plant Cell* 21: 1273–1290.
- Mudgett, M. B. 2005. New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annual Reviews of Plant Biology* 56: 509–531.
- Mukherjee, S., Keitany G., Li Y., Wang Y., Ball H.L., Goldsmith E.J. y Orth K. 2006. *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* 312:1211–1214.
- Muller, R., A. Bleckmann, y R. Simon. 2008. The receptor kinase CORYNE of *Arabidopsis* transmits the stem cell-limiting signal CLAVATA3 independently of CLAVATA1. *Plant Cell* 20: 934–46.
- Nishiyama I. y Inomata N. 1966. Embryological studies on cross incompatibility between 2x and 4x in *Brassica*. *Japanese Journal of Genetics* 41: 27-42.

- Nürnbergger, T. y Kemmerling B. 2006. Receptor protein kinases--pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends in Plant Science* 11: 519–522.
- Nürnbergger, T., Brunner F., Kemmerling B., y Piater L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198: 249–266.
- Oldroyd, G. E. D. y Staskawicz B. J. 1998. Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 10300–10305.
- Palta, J.P, Chen H.H., y Li P.H. 1981. Relationship between heat and frost resistance of tuber bearing *Solanum* species. *Botanical Gazette* 142: 311-315.
- Panstruga, R., Parker J.E., y Schulze-Lefert P. 2009. SnapShot: Plant immune response pathways. *Cell* 136: 978
- Pastuglia, M., Roby D., Dumas C., y Cock J.M. 1997. Rapid induction by wounding and bacterial infection of an S gene family receptor-like kinase gene in *Brassica oleracea*. *Plant Cell* 9: 49-60.
- Pavek, J. J. y Corsini D. L. 2001. Utilization of potato genetic resources in variety development. *American Journal of Potato Research* 78: 433-441.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes A., Van der Ent S.y Saskia Van Wees C.M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5: 308-316.
- Porta, H., y Rocha-Sosa M. 2002. Plant lipoxygenases: physiological and molecular features. *Plant Physiology* 130: 15–21.
- Poussier, S., Trigalet-Demery D., Vandewalle P., Goffinet B., Luisetti J. y Trigalet A. 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the hrp gene region, AFLP and 16S rRNA sequence analysis, and identification of an African subdivision. *Microbiology* 146: 1679–1692.
- Raker C. M. y Spooner D.M. 2002. Chilean tetraploid cultivated potato, *Solanum tuberosum*, is distinct from the andean populations: Microsatellite Data. *Crop Science* 42:1451–1458.
- Restrepo, S., Myers K. L., del Pozo O., Martin G. B., Hart A.L., Buell C. R., Fry W. E. y Smart C. D. 2005. Gene profiling of a compatible interaction between *Phytophthora infestans* and *Solanum tuberosum* suggests a role for carbonic anhydrase. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 18: 913–922.

- Robatzek, S., Bittel P., Chinchilla D., Köchner P., Felix G., Shiu S.H. y Boller T. 2007. Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of Arabidopsis FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant Molecular Biology* 64: 539–47.
- Ron, M., y Avni A. 2004. The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* 16: 1604–15.
- Saeed, A. I., Sharov V., White J., Li J., Liang W., Bhagabati N., Braisted J., Klapa M., Currier T., y Thiagarajan M. 2003. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques* 34: 374–378.
- Schenk, P.M., Kazan K., Wilson I., Anderson J.P., Richmond T., Somerville S.C. y Manners J.M. 2000. Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 11655-11660.
- Schuhegger, R., Ihring A., Gantner S., Bahnweg G., Knappe C., Vogg G., Hutzler P., Schid M., Van Breusegem F., Eberl L., Hartmann A. y Langebartels C. 2006. Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell and Environment* 29: 909–18.
- Sequeira, L. 1979. Development of resistance to bacterial wilt derived from *Solanum phureja*. pp 55-62. *Developments in control of potato bacterial diseases*. International potato center, Lima, Perú.
- Shapiro, A.D., y Zhang C. 2001. The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127: 1089–1101.
- Silipo, A., Molinaro A., Sturiale L., Dow J.M., Erbs G., Lanzetta R., Newman M.A. y Parrilliet M. 2005. The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. *Journal of Biological Chemistry* 280: 33660–68.
- Simmonds, N.W. 1995. Potatoes. En: Smartt J, Simmonds NW (eds) *Evolution of crop plants*, 2nd edn. Longman Scientific and Technical, Harlow, pp 466–471
- Siri M.I., Galván G.A., Quirici L., Silvera E., Villanueva P., Ferreira F., Franco Fraguas L., Pianzola M. J. 2009. Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica* 165: 371–382.

- Siri, M.I., Sanabria A., y Pianzola M.J. 2011. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. Plant Disease doi: 10.1094/PDIS-09-10-0626.
- Siri, M.I., Villanueva P., Pianzola M.J., Franco Fraguas L., Galvan G., Acosta M., y Ferreira F. 2004. In vitro antimicrobial activity of different accessions of *Solanum commersonii* Dun. from Uruguay. Potato Research 47: 127-138.
- Shan, L., He P., Li J., Heese A., Peck S.C., Nürnberger T., Martin G.B., Sheenet J. 2008. Bacterial effectors target BAK1 to disrupt MAMP receptor signaling complexes and impede plant innate immunity. Cell Host Microbe 4: 17–27.
- Smith, I. M., McNamara D. G., et al., Eds. (1992). Quarantine pests of Europe. Cambridge, CUVE. CAB International; European and Mediterranean Plant Protection Organization.
- Soriano, J.M., Vilanova S., Romero C., Llácer G. y Badenes M. L. 2005. Characterization and mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in apricot (*Prunus armeniaca* L.) 110: 980-989
- Spooner, D.M., McLean K., Ramsay G., Waugh R., y Bryan G. J. 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 14694–14699.
- Takai, R., Isogai A., Seiji S., y Che F.S. 2008. Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice. Molecular Plant-Microbe Interactions 12: 1635–42.
- Torres, M.A., Jones J.D.G., y Dangl J.L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. Plant Physiology 141: 373–378.
- Trognitz, F., Manosalva P., Gysin R., Niño-Liu D., Simon R., Herrera M., Trognitz B., Ghislain M., y Nelson R. 2002. Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* × dihaploid *S. tuberosum* hybrids. Molecular Plant-Microbe Interactions 6: 587–597.
- Tsuda, K., Sato M., Stoddard T., Glazebrook J. y Katagiri F. 2009. Network properties of robust immunity in plants. PLoS Genetics 5:e1000772
- Umemoto, N., Kakitani M., Iwamatsu A., Yoshikawa M., Yamaoka N., e Ishida I. 1997. The structure and function of a soybean β -glucan-elicitor-binding protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 1029–34.

- Van der Hoorn R.A.L., y Kamoun S. 2009. From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell* 20: 2009–2017.
- Van der Linden, C.G., Wouters D.C.A.E., Mihalka V., Kochieva E.Z., Smulders M.J.M., y Vosman B. 2004. Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 384–393.
- Vilaró, F., Rodríguez G., y Pereyra G. 2000. Jornada sobre mejoramiento de papa. Serie Actividades de Difusión Nro. 221 Programa de hortifruticultura.
- Vleeshouwers, V.G.A.A , Van Dooijeweert W. , Govers F., y Kamou S. 2000. Does basal *PR* gene expression in *Solanum* species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 35-42.
- Wang, B., Liu J., Tian Z., Song B., y Xie C. 2005. Monitoring the expression patterns of potato genes associated with quantitative resistance to late blight during *Phytophthora infestans* infection using cDNA microarrays. *Plant Science* 169: 1155–1167.
- Wang, K.L.C., Hai L. y Ecker J.R. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14: 131-151.
- Wang, X., El Hadrami A., Adam L.R. y Daayf F. 2005. Local and distal gene expression of PR-1 and PR-5 in potato leaves inoculated with isolates from the old (US-1) and the new (US-8) genotypes of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Environmental Experimental Botany* 57: 1–11.
- Watt, S.A., Tellstrom V., Patschkowski T., y Niehaus K. 2006. Identification of the bacterial superoxide dismutase (SodM) as plant-inducible elicitor of an oxidative burst reaction in tobacco cell suspension cultures. *Journal of Biotechnology* 126: 78–86.
- Wenneker, M., Verdel M. S. W., Groeneveld R.M.W., Kempenaar C., van Beuningen A.R. y Janse J.D. 1999. *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: First report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology* 105: 307-315.
- Whitehead, N.A., Barnard A.M.L., Slater H., Simpson N.J.L., y Salmond G.P.C. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 365-404.
- Xiang, T., N. Zong, Y. Zou, Y. Wu, J. Zhang, W. Xing, Y. Li, X. Tang, L. Zhu, J. Chai, y J.M. Zhou. 2008. *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current Biology* 18: 74–80.

- Zhang, J., F. Shao, H. Cui, L.J. Chen, H.T. Li, Y. Zou, C. Long, L. Lan, J. Chai, S. Chen, X. Tang, y J.M. Zhou. 2007. A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* 1: 175–85.
- Zhang, H., D. Zhang, J. Chen, Y. Yang, Z. Huang, D. Huang, X.C. Wang y R. Huang. 2004. Tomato stress-responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant Molecular Biology* 5: 825–834.
- Zhu, B., T.H.H. Chen y P.H. Li. 1995. Activation of two Osmotin-like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants. *Plant Physiology* 108: 929-937.
- Zipfel C. 2009. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 20: 10–16.