



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**El receptor tipo quinasa COK-4 de *Phaseolus vulgaris*
L. es requerido para la activación temprana de
mecanismos de defensa contra la raza 7 de
*Colletotrichum lindemuthianum***

Marlene Carolina Pedroza Padilla

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá D.C, Colombia
2019

**El receptor tipo quinasa COK-4 de *Phaseolus vulgaris*
L. es requerido para la activación temprana de
mecanismos de defensa contra la raza 7 de
*Colletotrichum lindemuthianum***

Marlene Carolina Pedroza Padilla

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias

Directora

Ph.D., Adriana González Almario

Codirectora

Ph.D., Linda Rincón Rivera

Línea de Investigación:

Fitopatología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá D.C, Colombia

2019

*Encomienda a Jehová tus obras,
y tus pensamientos serán afirmados.*

Proverbios 16: 3

Agradecimientos

A mi Dios, por su amor y fidelidad, por sostenerme y guiarme siempre. Mi Padre celestial, mi amigo, mi Refugio y Torre Fuerte.

A mis padres, Hermenegildo Pedroza González y Marlene Padilla Vásquez, mi inspiración, mi ejemplo a seguir. A mis hermanos, a cada uno de ellos gracias por su amor y apoyo.

Al amor de mi vida, amigo y motivación, Hugo Perea Gómez, por su amor incondicional, apoyo, tiempo y paciencia.

A mi directora Ph.D Adriana González Almario. Una mujer especial, de ejemplo, la cual considero un excelente ser humano y profesora. Gracias por haber creído en mí, por sus conocimientos, apoyo y tiempo dedicado.

A mi co-directora Ph.D Linda Rincón Rivera, por su gran calidad humana, apoyo y aporte a este trabajo

A la División de Investigación de la sede Bogotá (DIB), de la Universidad Nacional de Colombia y al Banco de la República, por el financiamiento aportado para la ejecución y desarrollo de esta investigación.

A los profesores Ph.D María Isabel Chacón y Ph.D Gustavo Ligarreto, por la invaluable contribución a este trabajo.

A Kevin Alejandro Rodríguez Arévalo, por su amistad, apoyo y compañerismo durante esta investigación.

A los integrantes e investigadores de los Laboratorios de Sanidad Vegetal y Biotecnología “Antonio Angarita Zerda” de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia. Gracias por su amistad, colaboración y compañía durante este proceso.

Al Laboratorio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia y a la profesora Ph.D Ibonne Garcia Romero por su acompañamiento en los ensayos de PCR en tiempo real.

A la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, administrativos y docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias y Departamento de Biología, que contribuyeron ampliamente a mi formación profesional.

A todos aquellos que me respaldaron para poder llevar a término esta etapa de mi vida.

Resumen

Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Magnus) es un hongo fitopatógono que provoca la antracnosis, enfermedad limitante que se manifiesta con el desarrollo de lesiones necróticas en vainas, hojas, peciolo y tallos, afectando la calidad de semillas y productos comerciables de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Dentro de las medidas de manejo se halla el uso de cultivares de frijol, obtenidos de programas de mejoramiento a los cuales se les han introgresado los loci *Co-4*² y *Co-5*, conocidos por conferir resistencia a varias razas de *C. lindemuthianum*. Sin embargo, el papel de estos genes en la activación temprana de la inmunidad vegetal en cultivares como Serranía y Sutagao, no se había evaluado. Por tal motivo, se plantearon como objetivos relacionar la presencia de los genes *Co* con cambios en la activación y en el tiempo de respuesta de algunos mecanismos de defensa en presencia de la raza 7 del patógeno, a través del uso de marcadores moleculares, pruebas histoquímicas y expresión diferencial de genes. Entre los resultados, se pudo comprobar que *Co-4*² y *Co-5* están presentes en el cultivar Serranía, mientras que en Sutagao solo *Co-4*² el cual presentó una delección en el gen *COK-4* que codifica para un receptor tipo quinasa (RLK). En ensayos de patogenicidad se determinó que el frijol Sutagao fue susceptible al hongo, en contraste a Serranía que fue resistente. Los ensayos histoquímicos con azul de anilina y 3,3'-diaminobencidina, revelaron que el frijol Serranía indujo tempranamente mayores deposiciones de calosa y especies reactivas de oxígeno en los sitios de intento de penetración del patógeno, lo cual también fue favorecido por la expresión de genes relacionados con defensa como *PR-1* y peroxidasas, en contraste al cultivar Sutagao que activó tardíamente dichos mecanismos. Esto indica que, el receptor *COK-4* y el locus *Co-5* podrían estar participando en la inducción temprana de mecanismos de defensa durante la interacción *P. vulgaris* L. – *C. lindemuthianum*.

Palabras clave: SAS13, *COK-4*, resistencia, H₂O₂, PTI, *PRs*, ácido salicílico.

Abstract

Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Magnus) is a phytopathogenic fungus that causes anthracnose, a limiting disease characterized by the presence of necrotic lesions in pods, leaves, petiole and stems, affecting the quality of seeds and commercial common bean products (*Phaseolus vulgaris* L.). Among the management measures is the use of bean cultivars that have *Co-4²* and *Co-5* loci, transferred by breeding programs and confer resistance to several races of *C. lindemuthianum*. However, the role of these genes in the early activation of plant immunity in cultivars such as Serranía and Sutagao, has not been evaluated. For this reason, the objectives were to relate the presence of *Co* genes with changes in the activation and response time of some defense mechanisms in the presence of race 7 of the pathogen, through the use of molecular markers, histochemical tests and differential gene expression. Among the results, it was found that *Co-4²* and *Co-5* are present in Serrania cultivar, while in Sutagao a deletion was found in *Co-4²*, specifically in the *COK-4* gene that codes for a Receptor-like Kinase (RLK). In pathogenicity tests Sutagao was susceptible to the fungus, in contrast to Serranía that was resistant. Histochemical tests with aniline blue and 3,3'-diaminobenzidine, revealed that Serrania early induced more depositions of callose and reactive oxygen species at sites of attempted penetration of pathogen, which was also favored by the expression of defense-related genes such as *PR-1* and peroxidases, in contrast to Sutagao that delayed such mechanisms. This indicates that, the COK-4 receptor and locus *Co-5* are required for the early induction of defense mechanisms during the *P. vulgaris* L. - *C. lindemuthianum* interaction.

Keywords: SAS13, *COK-4*, resistance, H₂O₂, PTI, *PRs*, *PvPOD*, salicylic acid.

	Pág.
Tabla de contenido	
Resumen	XI
Abstract	XII
Introducción	1
1. El cultivar Sutagao presenta una mutación en el gen COK-4 que codifica para receptores tipo quinasa, RLK.....	5
1.1 Resumen.....	5
1.2 Introducción.....	6
1.3 Materiales y métodos	9
1.3.1 Material Vegetal y extracción de ADN	9
1.3.2 Amplificaciones de los genes de resistencia <i>Co-4</i> ² y <i>Co-5</i>	9
1.3.3 Secuenciación de los productos amplificados	10
1.3.4 Análisis de las secuencias obtenidas	10
1.4 Resultados	11
1.4.1 El cultivar Sutagao no presenta el SCAR asociado al gen de resistencia <i>Co-5</i>	11
1.4.2 Análisis de las regiones amplificadas con SAS13 y SAB3.....	13
1.4.2.1 El marcador molecular SAS13 es homólogo al gen <i>COK-4</i> de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	13
1.4.2.2 Análisis de las secuencias del marcador molecular SAB3.....	23
1.5 Discusión	23
1.6 Referencia bibliográfica.....	29
1.7 Material suplementario	35
2. Deleción en <i>COK-4</i> suprime la activación de respuestas tempranas de defensa contra <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>.....	41
2.1 Resumen.....	41
2.2 Introducción.....	42
2.3 Materiales y métodos	46
2.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento de las plantas de frijol.....	46
2.3.2 Incremento de la raza 7 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	46
2.3.3 Inoculación de la raza 7 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> en hojas de frijol común.....	46
2.3.4 Evaluación de severidad de la raza 7 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> en plantas de frijol inoculadas	47
2.3.5 Detección de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) en hojas frijol común inoculadas con la raza 7 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	48
2.3.6 Detección de depósitos de calosa en hojas frijol común inoculadas con la raza 7 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	49
2.4 Resultados	50
2.4.1 El cultivar Sutagao es susceptible a la raza 7 de <i>Colletotrichum lindemuthinum</i>	50
2.4.2 Relación entre el proceso de infección de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> y la acumulación de H ₂ O ₂ en <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	59
2.4.2.1 Proceso de infección de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> en frijol común.....	59

2.4.2.2	El H ₂ O ₂ se acumula debajo de las estructuras de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> como una reacción temprana de defensa vegetal.....	62
2.4.3	El cultivar Sutagao disminuye las deposiciones de calosa durante su interacción con <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	69
2.5	Discusión	75
2.6	Referencia bibliográfica.....	79
2.7	Material suplementario.....	83
3.	La resistencia a la raza 7 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> está mediada por la inducción temprana de genes de defensa en <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	84
3.1	Resumen	84
3.2	Introducción	85
3.3	Materiales y métodos.....	88
3.3.1	Material vegetal e inoculación de la raza 7 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> en hojas de frijol común.....	88
3.3.2	Extracción de ARN de hojas de frijol común inoculadas con la raza 7 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	88
3.3.3	Síntesis de ADNc de variedades de frijol común inoculadas con la raza 7 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	89
3.3.4	Expresión genes de defensa en <i>Phaseolus vulgaris</i> L. durante la interacción con la raza 7 de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	90
3.3.4.1	Eficiencia de amplificación de los genes vinculados con defensa en <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	90
3.3.4.2	Análisis de expresión diferencial de genes relacionados con defensa en frijol común.....	91
3.4	Resultados.....	92
3.4.1	Eficiencia de las amplificaciones de los genes vinculados con defensa en <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	92
3.4.2	Los genes <i>PR-3</i> y <i>PvPOD</i> se inducen tempranamente para evitar el progreso de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> en <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	92
3.5	Discusión	98
3.6	Referencia bibliográfica.....	101
3.7	Material suplementario.....	105
4.	Discusión final	106
5.	Conclusiones y recomendaciones	111
5.1	Conclusiones	112
5.2	Recomendaciones	112
5.3	Referencia bibliográfica.....	113

Lista de figuras

Capítulo 1

Pág.

Figura 1-1 Confirmación del gen *Co-4*² en los cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. utilizando el marcador molecular SCAR: SAS13. **a.** Mp 1Kb, marcador de peso; diferencial G2333; parentales comerciales Cabrera y Cargamanto. **b.** Parental Cabrera; cultivar Serranía; cultivar Sutagao..... 11

Figura 1-2 Confirmación del marcador molecular SAB3 asociado al gen de resistencia *Co-5* en los cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. Mp 1Kb, marcador de peso; diferencial G2333; parentales comerciales Cabrera y Cargamanto; cultivar Serranía; cultivar Sutagao..... 12

Figura 1-3 Gráfica del alineamiento de las secuencias de SAS13 con el gen *COK-4* de *Phaseolus vulgaris* L. La barra gris superior corresponde a la accesión AF153441.1, la barra verde al gen *COK-4*, la barra roja una STK homóloga a *COK-4* (accesión AAF98554.1), las negras a los dominios catalíticos de proteínas quinasas (aminoácidos 50 al 335) y a los sitios de unión de ATP (aminoácidos 53 a 187). Las barras grises inferiores corresponden a las secuencias consenso de los frijoles G2333, Cargamanto y de los cultivares Serranía y Sutagao. La gráfica fue obtenida del BLAST realizado por la base de datos del GenBank 19

Capítulo 2

Figura 2-1 Evaluación de desarrollo de síntomas de antracnosis en hojas primarias del diferencial G2333 previamente inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Las imágenes superiores corresponden a la cara adaxial de la hoja de frijol y las inferiores muestran la cara abaxial. Evaluación realizada durante nueve días posteriores a la inoculación (dpi). Los valores en la escala de severidad son asignados de acuerdo a Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987)..... 50

Figura 2-2 Evaluación de desarrollo de síntomas de antracnosis en hojas primarias del parental Cabrera previamente inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Las imágenes superiores corresponden a la cara adaxial de la hoja de frijol y las inferiores muestran la cara abaxial. Evaluación realizada durante nueve días posteriores a la inoculación (dpi). Los valores en la escala de severidad son asignados de acuerdo a Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987)..... 52

Figura 2-3 Evaluación de desarrollo de síntomas de antracnosis en hojas primarias del parental Cargamanto previamente inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Las imágenes superiores corresponden a la cara adaxial de la hoja de frijol y las inferiores muestran la cara abaxial. Evaluación realizada durante nueve días posteriores a la

inoculación (dpi). Los valores en la escala de severidad son asignados de acuerdo a Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987) 53

Figura 2-4 Evaluación de desarrollo de síntomas de antracnosis en hojas primarias del cultivar Serranía previamente inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Las imágenes superiores corresponden a la cara adaxial de la hoja de frijol y las inferiores muestran la cara abaxial. Evaluación realizada durante nueve días posteriores a la inoculación (dpi). Los valores en la escala de severidad son asignados de acuerdo a Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987) 55

Figura 2-5 Evaluación de desarrollo de síntomas de antracnosis en hojas primarias del cultivar Sutagao previamente inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Las imágenes superiores corresponden a la cara adaxial de la hoja de frijol y las inferiores muestran la cara abaxial. Evaluación realizada durante nueve días posteriores a la inoculación (dpi). Los valores en la escala de severidad son asignados de acuerdo a Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987) 56

Figura 2-6 Proceso de infección de *Colletotrichum lindemuthianum* en materiales de frijol común inoculados con la raza 7 del patógeno. **a.** Conidia (6 hpi); **b.** conidia y tubo germinativo (6 hpi); **c.** apresorio no melanizado (16 hpi); **d.** conidias y apresorios melanizados (16 hpi); **e.** apresorio con puntilla de penetración visible (recuadro) (16 hpi); **f.** presión del apresorio en el sitio de intento de penetración (16 hpi); **g.** y **h.** desarrollo de la vesícula infectiva e hifas primarias (24 hpi y 3 dpi), nótese el septo de división (recuadro en h.); **i-j.** desarrollo de hifas secundarias (5 dpi); **k.** invasión intracelular en tejido necrosado (7 dpi). Las puntas sólidas señalan: negras, conidias; rojas, apresorios; azules, vesículas de infección; blancas, hifas primarias; verdes, hifas secundarias e invasión intracelular en regiones con lesiones necróticas. Las imágenes fueron tomadas en microscopio compuesto bajo un aumento de 40X 59

Figura 2-7 Acumulación de H_2O_2 durante la interacción entre el frijol parental resistente G2333 y la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. **a.** Conidia sin germinar; **b.** conidia y apresorio no melanizado; **c, d** y **e.** producción de H_2O_2 debajo de los sitios de intento de penetración; **f.** respuesta de hipersensibilidad; **g.** degradación de conidias y tubos germinativos; **h.** señal de H_2O_2 en apoplasto y citosol; **i-j.** reducción en la producción de H_2O_2 y en el tamaño de los apresorios. Las puntas sólidas señalan: negras, conidias; rojas, apresorios; amarillas, H_2O_2 . Las imágenes fueron tomadas en microscopio compuesto bajo un aumento de 40X 62

Figura 2-8 Acumulación de H_2O_2 durante la interacción entre el parental de frijol Cabrera y la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. **a.** Conidia; **b.** conidia y apresorio melanizado; **c** y **d.** apresorios en los sitios de intento de penetración; **e.** producción de H_2O_2 en sitios de reforzamiento de la pared celular; **f-g.** desarrollo de la vesícula de infección debajo del apresorio; **h.** desarrollo de HS en célula invadida sin evidencia de producción de H_2O_2 ; **i-j.** invasión intracelular por HS con fuerte acumulación de H_2O_2 . Las

puntas sólidas señalan: negras, conidias; rojas, apresorios; amarillas, H₂O₂; azules, vesícula de infección; verdes, hifas secundarias (HS) e invasión intracelular. Las imágenes fueron tomadas en microscopio compuesto bajo un aumento de 40X..... 63

Figura 2-9 Acumulación de H₂O₂ durante la interacción entre el frijol comercial Cargamanto y la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. **a.** Conidia; **b.** apresorio melanizado; **c.** apresorio en el sitio de intento de penetración; **d-e.** producción de H₂O₂ en sitios de intento de penetración; **f.** apresorio sin evidencia de inducción de H₂O₂; **g.** producción de H₂O₂ en regiones con vesículas de infección; **h.** reducción en la producción de H₂O₂, degradación y reducción en el tamaño de apresorios; **i.** señal de H₂O₂ en regiones del apoplasto y citosol; **j.** emersión de hifas por los estomas. Las puntas sólidas señalan: negras, conidias; rojas, apresorios; amarillas, H₂O₂; azules, vesículas de infección; verdes, hifas. Las imágenes fueron tomadas en microscopio compuesto bajo un aumento de 40X 64

Figura 2-10 Acumulación de H₂O₂ durante la interacción entre el cultivar de frijol Serranía y la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. **a.** Conidia y apresorio no melanizado; **b.** conidia y apresorio melanizado; **c.** apresorio en el sitio de intento de penetración; **d.** movimiento del núcleo celular debajo del apresorio; **e.** producción de H₂O₂ y reforzamiento de la pared celular; **f.** producción de H₂O₂ en regiones del apoplasto; **g.** degradación de conidias y reducción en el tamaño del apresorio; **h.** y **j.** señal de H₂O₂ debajo de apresorios; **i.** reducción en la producción de H₂O₂ y en el tamaño de los apresorios. Las puntas sólidas señalan: negras, conidias; rojas, apresorios; amarillas, H₂O₂; rosado, núcleo celular. Las imágenes fueron tomadas en microscopio compuesto bajo un aumento de 40X 65

Figura 2-11 Acumulación de H₂O₂ durante la interacción entre el cultivar de frijol Sutagao y la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. **a.** Conidia; **b.** conidia y apresorio melanizado; **c.** y **d.** apresorios en los sitios de intento de penetración; **e.** desarrollo de vesícula de infección debajo del apresorio; **f.** ingreso del patógeno por el estoma, sin evidencia de producción de H₂O₂; **g.** vesículas de infección e HP; **h.** señal de H₂O₂ debajo de apresorios; **i.** invasión en la célula por HS, fuerte acumulación de H₂O₂; **j.** producción de H₂O₂ en regiones con invasión intracelular del patógeno. Las puntas sólidas señalan: negras, conidias; rojas, apresorios; amarillas, H₂O₂; azules, vesícula de infección; blancas, hifas primarias (HP); verdes, hifas secundarias (HS) e invasión intracelular. Las imágenes fueron tomadas en microscopio bajo un aumento de 40X.... 66

Figura 2-12 Inducción de deposiciones de calosa en *Phaseolus vulgaris* L. durante la interacción con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. **a.** y **b.** Diferencial mesoamericano G2333; **c.** y **d.** cultivar Serranía. La luz fluorescente revela depósitos de calosa debajo de apresorios (b), al alrededor de la vesícula de infección y de la puntilla de penetración (d). Puntas sólidas: amarillas, papilas; rojas, vesícula infectiva; negra, apresorio. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con filtro UV a un aumento de 40x. La escala en todas las imágenes es de 20 µm 68

Figura 2-13 Promedio total de deposiciones de calosa ($1,8 \text{ mm}^2$) en materiales de frijol común 3, 5 y 7 dpi con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Los valores promedios representan dos repeticiones independientes. $n=30$, las barras de error indican SD. Los asteriscos sobre las barras expresan diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$). G23, diferencial G2333; Cab, comercial Cabrera; Car, comercial Cargamanto; Ser, cultivar Serranía y Su, cultivar Sutagao 69

Figura 2-14 Acumulación de depósitos de calosa a los 3 dpi en materiales de frijol común inoculados con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum* y teñidos con azul de anilina. **a.** Control; **b, c, d, e** y **f.** plantas inoculadas. **b.** parental resistente G2333, **c.** parental comercial Cabrera, **d.** parental comercial Cargamanto, **e.** cultivar Serranía y **f.** cultivar Sutagao. La fluorescencia verde corresponde a depósitos de calosa. Los puntos negros señalados por la flecha roja muestran los apresorios del patógeno. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con filtro UV a un aumento de 10x. La escala para todas las imágenes es de $50 \mu\text{m}$ 70

Figura 2-15 Acumulación de depósitos de calosa a los 5 dpi en materiales de frijol común inoculados con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum* y teñidos con azul de anilina. **a.** Control; **b, c, d, e** y **f.** plantas inoculadas. **b.** parental resistente G2333, **c.** parental comercial Cabrera, **d.** parental comercial Cargamanto, **e.** cultivar Serranía y **f.** cultivar Sutagao. La fluorescencia verde corresponde a depósitos de calosa, a excepción de los tricomas. Las flechas rojas señalan los apresorios, las amarillas lesiones necróticas y las blancas, estomas. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con filtro UV a un aumento de 10x. La escala para todas las imágenes es de $50 \mu\text{m}$ 71

Figura 2-16 Acumulación de depósitos de calosa a los 7 dpi en materiales de frijol común inoculados con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum* y teñidos con azul de anilina. **a.** Control; **b, c, d, e** y **f.** plantas inoculadas. **b.** parental resistente G2333, **c.** parental comercial Cabrera, **d.** parental comercial Cargamanto, **e.** cultivar Serranía y **f.** cultivar Sutagao. La fluorescencia verde corresponde a depósitos de calosa, a excepción de los tricomas. Las flechas rojas señalan los apresorios, las amarillas lesiones necróticas y las blancas, estomas. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con filtro UV a un aumento de 10x. La escala para todas las imágenes es de $50 \mu\text{m}$ 72

Capítulo 3

Figura 3-1 Expresión relativa de los genes *PR-1* y *PvPOD* de *Phaseolus vulgaris* L. en los frijoles G2333, Serranía y Sutagao durante su interacción con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. El análisis de expresión se llevó a cabo realizando una qPCR en tiempo real. El gen *PvEF1- α* de *P. vulgaris* L. fue usado como gen de referencia. Las hojas fueron colectadas a las 0 y 24 hpi y a los 3, 5 y 7 dpi. Las barras de error representan la media SD de $n=3$. Los asteriscos indican las diferencias significativas ($P \leq 0.05$ por Tukey) 94

Figura 3-2 Expresión relativa del gen PR-3 de *Phaseolus vulgaris* L. en los frijoles G2333, Serranía y Sutagao durante su interacción con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. El análisis de expresión se llevó a cabo realizando una qPCR en tiempo real. El gen *PvEF1- α* de *P. vulgaris* L. fue usado como gen de referencia. Las hojas fueron colectadas a las 0 y 24 hpi y a los 3, 5 y 7 dpi. Las barras de error representan la media SD de n=3. Los asteriscos indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$ por Tukey).. 96

Figura 3-3 Expresión relativa de los genes *PR-4* y *PV-EFT* de *Phaseolus vulgaris* L., en los frijoles G2333, Serranía y Sutagao durante su interacción con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. El análisis de expresión se llevó a cabo realizando una qPCR en tiempo real. El gen *PvEF1- α* de *P. vulgaris* L. fue usado como gen de referencia. Las hojas fueron colectadas a las 0 y 24 hpi y a los 3, 5 y 7 dpi. Las barras de error representan la media SD de $n=3$. Los asteriscos indican las diferencias significativas ($P \leq 0.05$ por Tukey)..... 98

Capítulo 4

Figura 4-1 Modelo de detección e inducción de respuestas tempranas de defensa durante la interacción *Phaseolus vulgaris* – *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de las 24 horas posteriores a la inoculación en una planta resistente..... 108

Figura 4-2 Modelo de penetración y establecimiento de la fase biótrofa de *Colletotrichum lindemuthianum* en plantas susceptibles de *Phaseolus vulgaris* L 70

Lista de tablas

Capítulo 1

Pág.

Tabla 1-1 Análisis de las secuencias nucleotídicas del fragmento de 950 pb amplificado con el marcador molecular SAS13 15

Tabla 1-2 Análisis de las secuencias aminoacídicas obtenidas del producto amplificado por el marcador molecular SAS13 en los materiales de frijol común 17

Tabla 1-3 Análisis de las secuencias nucleotídicas del fragmento de 400 pb obtenidas por el marcador molecular SAS13 en los materiales de frijol común 21

Tabla 1-4 Análisis de las secuencias aminoacídicas del fragmento de 400 pb por el marcador molecular SAS13 en los materiales de frijol común..... 22

Tabla 2-1: Descripción y categoría de los valores de severidad en hojas de frijol común infectadas con *Colletotrichum lindemuthianum*

Capítulo 2

Tabla 2-1 Descripción y categoría de los valores de severidad en hojas de frijol común infectadas con *Colletotrichum lindemuthianum* 47

Capítulo 3

Tabla 3-1 Eficiencia de amplificación de genes de *Phaseolus vulgaris* L. evaluados durante el análisis por PCR en tiempo real 92

Lista de material suplementario

Pág.

Capítulo 1

Figura suplementaria 1-1 CLUSTALW BioEdit de las secuencias amplificadas en *Phaseolus vulgaris* L. con el marcador molecular asociado al gen de resistencia *Co-4²*, SAS13. A la izquierda los frijoles que amplificaron SAS13 y el tamaño de la secuencia obtenida en pb. A la derecha secuencias consensos de cada variedad de frijol común. La regla superior y los valores laterales indican el número de la base. Los asteriscos representan la secuencia consenso del alineamiento múltiple (clustal consenso) 36

Figura suplementaria 1-2 CLUSTAL MUSCLE de las secuencias amplificadas con el marcador molecular SAS13 asociado al gen de resistencia *Co-4²*. A la izquierda los frijoles que amplificaron SAS13 y el tamaño de la secuencia obtenida en pb. A la derecha secuencias consensos de cada variedad de frijol común. Los asteriscos representan la secuencia consenso del alineamiento múltiple (match), sin asterisco regiones sin similitud (mismatch). Los puntos en la secuencia consenso representan gaps. Nótese la delección entre las bases 307 y 705 del SCAR SAS13, flechas rojas 37

Información suplementaria 1-3 Secuencias consenso de los materiales de frijol común que amplificaron el marcador molecular SAS13 asociado al gen de resistencia *Co-4²*, banda 950 pb 38

Información suplementaria 1-4 Secuencias consenso de los materiales de frijol común que amplificaron el marcador molecular SAS13 asociado al gen de resistencia *Co-4²*, banda 400 pb 39

Información suplementaria 1-5 Secuencias consenso de los materiales de frijol común que amplificaron el marcador molecular SAB3 asociado al gen de resistencia *Co-5*, banda 400 pb 40

Capítulo 2

Figura suplementaria 2-1 Desarrollo de síntomas severos de antracnosis en el cultivar susceptible Sutagao durante su interacción con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Evaluación 9 días posteriores a la inoculación 83

Capítulo 3

Tabla suplementaria 3-1 Oligonucleótidos de *Phaseolus vulgaris* L. utilizados para el análisis de PCR en tiempo real 105

Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), perteneciente al género *Phaseolus*, subtribu *Phaseolinae*, tribu *Phaseoleae*, subfamilia *Papilionoideae* y a la familia *Fabaceae*, es la leguminosa de mayor importancia económica en el país, aproximadamente 53.657,67 toneladas de grano seco fueron producidos para el año 2017 (Agronet, 2018). Es considerado una fuente primaria de proteínas, carbohidratos y minerales como hierro y zinc, rico en fibra, tiamina, folatos y fitoquímicos que presentan propiedades analgésicas y neuroprotectoras (Castro et al., 2016).

Mediante análisis moleculares se ha sugerido que *P. vulgaris* L. presenta un acervo mesoamericano y andino. El primero corresponde a México central, en donde evidencias indican que el frijol común fue domesticado en el área geográfica del Valle de Oaxaca. Así mismo, para el acervo genético andino, la domesticación se produjo en el sur de Bolivia y al norte de Argentina (Bitocchi et al., 2013). En Colombia, la siembra de esta leguminosa se concentra especialmente en la región andina, en el departamento de Antioquia, en donde predominan las variedades Cargamantos rojos, blancos, ombligo amarillo, Radicales y Nima Calima. Así mismo, es sembrado en Cundinamarca, Boyacá y Santander en donde sobresalen los cultivos de las variedades Bolones, Bolas rojas, Radicales y Cargamantos rojos. El frijol común es sembrado entre los 900 a 2700 metros sobre el nivel del mar (msnm), a temperaturas que van de 15 a 27 °C, humedad relativa del 60 al 75% y precipitaciones superiores a los 500 mm/año (Fenalce, 2013). No obstante, *P. vulgaris* L. es afectado por varios fitopatógenos que reducen la calidad de la semilla, entre éstos, el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus), agente causal de la antracnosis, patógeno que presenta alrededor de 182 razas documentadas (Boersma et al., 2013; Padder et al., 2017). En un estudio realizado por Rincón (2007), se determinó la presencia de al menos 35 razas de *C. lindemuthianum* en Colombia, provenientes de Cundinamarca, Boyacá, Santander, Antioquia, Cauca y Valle, de las cuales la raza 3 estuvo en todos los departamentos. Así mismo, se identificaron las razas 0, 1, 7, 13, 133, 137, 139, 521 y 645 presentes en dos o más departamentos del país.

C. lindemuthianum genera pérdidas cercanas al 100% en variedades susceptibles, en condiciones de bajas temperaturas, 13 a 26 °C donde el óptimo es 17 °C y humedad relativa alta, especialmente en regiones de América Latina y África (Rodrigues et al., 2012; Amin, 2013; Padder et al., 2017). La antracnosis se evidencia por el desarrollo de lesiones necróticas en hojas, peciolo, tallos y vainas (Pastor-Corrales, 1989). En las hojas los síntomas aparecen inicialmente en el envés, ubicados en las venas como lesiones hendidas de color marrón oscuro que pueden llegar a extenderse sobre las nervaduras de la hoja y evidenciarse en casos severos en el haz. Durante esta etapa las hifas se propagan a través de las células, paredes y espacios intercelulares, lo cual es favorecido, por la secreción de enzimas hidrolíticas que degradan polímeros de la planta, contribuyendo al crecimiento necrófito de este patógeno. Finalmente los conidióforos rompen la cutícula del hospedero para formar acérvulos sobre el tejido de *P. vulgaris* L. y facilitar su dispersión (Amin, 2013). Entre las estrategias de manejo para minimizar los efectos del hongo en la producción de frijol común, se encuentran prácticas culturales, control químico, biológico, métodos físicos (solarización del suelo), uso de semillas certificadas y de cultivares resistentes (Basavaraju et al., 2008; Amin, 2013; Padder et al., 2017). Estos cultivares son obtenidos por mejoramiento genético, el cual se ha convertido en una alternativa viable, económica y amigable con el medio ambiente ya que reduce la aplicación de agroquímicos (Miklas et al., 2006; Schmutz et al., 2014). El Programa de Leguminosas de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, desarrolló cultivares resistentes a varias razas de *C. lindemuthianum*, entre éstos Serranía y Sutagao (Garzón et al., 2007), los cuales son productos de cruces entre una fuente resistencia, como lo es el frijol mesoamericano G2333 portador de *Co-4²*, *Co-5* y *Co-7*, con variedades andinas susceptibles de tipo comercial tales como Cargamanto y Bola Roja. Los cultivares son sometidos a ensayos de patogenicidad para evaluar su resistencia a diferentes razas del patógeno para su posterior clasificación y liberación (Schoonhoven y Corrales, 1987). Los genes *Co* han sido descritos como genes de resistencia a antracnosis, por presentar regiones que codifican para proteínas vinculadas con defensa tipo NB-LRR (Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat) y receptores de tipo quinasas (Receptor-like Kinase, ó RLK) (Chen et al., 2017).

La resistencia es referida como un conjunto de estrategias que presentan algunas plantas en reconocer y detener el crecimiento de un patógeno en el tejido vegetal, mediante la activación de mecanismos de defensa que incluyen modificaciones

estructurales como reforzamiento por lignina, deposiciones de calosa y establecimiento de barreras químicas por la producción de especies reactivas de oxígeno, secreción de compuestos antimicrobianos, enzimas hidrolíticas y respuestas de hipersensibilidad, para evitar el desarrollo de la enfermedad (Giraldo y Valent, 2013).

En un estudio realizado por Garzón et al. (2007), se confirmó la presencia de *Co-4*² y *Co-5* en los cultivares Serranía y Sutagao perteneciente al RC₁F₁. Sin embargo, no se había verificado presencia de estos genes en poblaciones posteriores al RC₁F₁ y evaluado su papel en la activación de mecanismos de defensa contra la infección de *C. lindemuthianum*. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo relacionar la presencia o ausencia de los loci *Co-4*² y *Co-5* con la activación de respuestas de defensa en los cultivares Serranía y Sutagao al ser sometidos a la infección de la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Los resultados obtenidos son de utilidad para aproximarnos a comprender el papel de estos genes en la resistencia a la antracnosis y de esta forma, entender la importancia de su mantenimiento en cultivares liberados en campo.

1. El cultivar Sutagao presenta una mutación en el gen *COK-4* que codifica para receptores tipo quinasa, RLK

1.1 Resumen

La producción del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es limitada por fitopatógenos como *Colletotrichum lindemuthianum* agente causal de la antracnosis, enfermedad que puede llegar a provocar pérdidas cercanas al 100%. Como estrategia de manejo a esta enfermedad, programas de mejoramiento genético han realizado cruzamientos entre variedades comerciales susceptibles como Cabrera y Cargamanto con frijoles resistentes a varias razas de *C. lindemuthianum*, entre éstos el diferencial G2333 portador de los loci de resistencia *Co-4*², *Co-5* y *Co-7*. A partir de estos cruces se obtuvieron los cultivares Sutagao y Serranía que evidenciaron en estudios previos la presencia de ambos genes *Co* en la población perteneciente al RC₁F₁. Sin embargo, aún no se había confirmado el mantenimiento de estos genes en generaciones posteriores al retrocruzamiento. El objetivo de este estudio fue determinar mediante el uso de marcadores moleculares SCAR: SAS13 y SAB3, si los loci *Co-4*² y *Co-5* seguían presentes en los cultivares Sutagao y Serranía que actualmente se siembran en campo. Los resultados comprobaron que ambos genes *Co* están presentes en el cultivar Serranía, mientras que el cultivar Sutagao solo amplificó el marcador SAS13 asociado al alelo *Co-4*². El análisis de las secuencias de SAS13 indicó que dicha región es homóloga al gen *COK-4*, el cual codifica para receptores quinasa (Receptor-Like Kinases, RLK), proteínas estrechamente vinculadas en la detección de patógenos. No obstante, el análisis reveló que el cultivar Sutagao además de no amplificar el marcador asociado al locus *Co-5*, presentó una delección en la región que codifica para dominios catalíticos del gen *COK-4*.

Palabras claves: SAS13, SAB3, *COK-4*, STK y delección.

1.2 Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), es considerado uno de los principales pilares de la economía mundial debido a su elevado consumo en regiones tropicales, ya que es fuente de proteínas, carbohidratos, fibras y minerales como hierro y zinc (Castro-Guerrero et al., 2016). Sin embargo, la gran mayoría de los frijoles comerciales son susceptibles a patógenos que reducen el rendimiento y la calidad de la semilla, entre los cuales se encuentra *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus), anamorfo de *Glomerella cingulata* f.sp *phaseoli*, agente causal de la antracnosis, y que hace parte de los diez principales hongos patogénicos que provocan enfermedades en plantas de importancia económica (Garzón, et al., 2007; Rodrigues et al., 2012; Fontenelle et al., 2017). No obstante, se han reportado variedades de frijol que evidencian resistencia a determinadas razas de *C. lindemuthinum*, entre éstas se encuentran doce diferenciales de frijol que han sido utilizados en programas de mejoramiento por portar genes con alta resistencia a la antracnosis, denominados genes *Co* (Pastor-Corrales, et al., 1989). A la fecha se conocen aproximadamente 23 de ellos los cuales han sido diferenciados numérica o alfabéticamente como *Co-1* a *Co-7*, *co-8*, *Co-9* a *Co-15*, *Co-16*, *Co-17*, *Co-u* a *Co-z*, *CoPv02c* y *CoPv09*, y adicionalmente algunos presentan más de un alelo como *Co-1*, *Co-3* y *Co-4* (Chen et al., 2017).

De acuerdo a su origen geográfico los genes *Co-1*, *Co-x* y *Co-w* son del acervo andino, mientras que los restantes son del acervo mesoamericano (Kelly y Vallejo, 2004; Garzón, 2012; Boersma et al., 2013; Chen et al., 2017). Los genes *Co* están organizados en grupos o clúster de genes de resistencia con diferentes modos de acción, ubicados en regiones cromosómicas específicas (Campa et al., 2014). Un ejemplo de ello es el gen dominante *Co-2* identificado en el diferencial de frijol Cornell 49242 que confiere resistencia a las razas alfa, beta y gamma de *C. lindemuthianum*. Dentro del grupo del gen *Co-2*, se encuentran dos genes de resistencia complementarios designados como *Co-2c*^{453-C} y *CoPv09c*^{453-C} los cuales confieren resistencia a la raza 453 del patógeno. Campa et al. (2014), encontraron mediante el uso marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia *Co-2c*^{453-C} y *CoPv09c*^{453-C}, la existencia de al menos cuatro regiones que codifican proteínas tipo NB-LRR (Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeat, NL) y otras cuatro que codifican para proteínas quinasas, sugiriendo que más de un gen podría estar implicado en las respuestas de resistencia frente a una raza.

Las proteínas tipo NB-LRR se han dividido en dos subclases de acuerdo a su secuencia amino terminal, la primera presenta un dominio de homología con el receptor Toll/Interleucina-1 (TIR-NB-LRR, ó TNL), y la otra un motivo N-terminal *Coiled-Coil* (CC-NB-LRR, ó CNL) (Dubey y Singh, 2018). Ambas subclases se han encontrado en grupos de genes *Co*, sin embargo, casos atípicos como *Co-1*, *Co-1²*, *Co-1³*, *Co-1⁴*, *Co-1⁵*, *Co-x* y *Co-w* han evidenciado no presentar genes que codifiquen para proteínas con dominios NB-LRR, en contraste se han comprobado regiones que codifican para proteínas pertenecientes a la familia de receptores de tipo quinasas (Receptor-like Kinase, ó RLK) y que han sido vinculadas con defensa y desarrollo vegetal. Además, se han descrito genes candidatos que contienen motivos CGTCA, elementos reguladores de actuación en *Cis* involucrados en la inducción de ácido jasmónico (AJ) y metil-jasmonatos (MeJA) (Chen et al., 2017), un volátil derivado del AJ que es producido bajo condiciones de estrés biótico (Thorpe et al., 2007; Okada et al., 2015).

Los loci *Co-1*, *Co-3* y *Co-4* presentan variantes alélicas que han sido propuestas a partir de las diferencias observadas en el espectro de resistencia entre diferentes genotipos de frijol (Trabanco et al., 2015). El locus *Co-4* se encuentra en el cromosoma PV08 y es considerado como una región multi-alélica capaz de controlar el 97% de las razas conocidas de *C. lindemuthianum* (Burt et al., 2015). El alelo *Co-4²* ha sido reportado como uno de los genes de resistencia de amplio espectro a varias razas del patógeno, codifica para proteínas con dominio Serina-Treonina quinasa, las cuales han sido asociadas con resistencia a patógenos, biosíntesis de fitohormonas y señales de transducción (Trabanco et al., 2015). Rodrigues et al. (2015), haciendo uso de marcadores tipo SCAR (Secuence Characterized Amplified Region) como SAS13, reportaron que en el loci *Co-4* se hallan regiones que codifican proteínas con dominios quinasa, factores putativos de transcripción tipo Myb, SRF (Serum Response Factor) y proteínas NB-LRR, los cuales podrían estar regulando respuestas de inmunidad en la planta. Otro de los loci evaluados es el locus de resistencia *Co-5* el cual se ubica en el grupo B7 del mapa genético de *P. vulgaris* L., y fue inicialmente descrito en el diferencial TU. Este locus presenta un clúster de genes que confieren resistencia específica a un amplio espectro de razas de *C. lindemuthianum* entre estas las razas 3, 6, 7, 31, 38, 39, 102 y 449 (Campa et al., 2009).

La antracnosis es una de las enfermedades más severas en los cultivos de frijol común, es responsable de pérdidas totales en la producción de los sembrados del grano y en la reducción de la calidad comercial de vainas y semillas. Entre las principales estrategias de manejo a la antracnosis se halla el desarrollo de cultivares obtenidos por mejoramiento genético, el cual tiene como fin introgresar genes de resistencia en frijoles comerciales susceptibles por cruzamientos con diferenciales resistentes (Pastor-Corrales, et al., 1989; Rodrigues et al., 2015). Los cultivares obtenidos de dichos cruces al ser sometidos a diferentes razas de *C. lindemuthianum* se les otorga un valor de acuerdo a una escala de evaluación de la enfermedad para evaluar su resistencia al patógeno (Young et al., 1998; Alzate-Marín, et al., 2001). El genotipo G2333, es uno de los diferenciales que presenta resistencia a varias razas de *C. lindemuthianum* debido a la presencia de tres loci *Co-4²*, *Co-5* y *Co-7* (Young et al., 1998; Alzate-Marín, et al., 2001; Boersma et al., 2013). En estudios previos de Garzón et al. (2007), se realizaron cruces entre el diferencial G2333 con frijoles comerciales susceptibles tales como tipo Bola roja (variedad Cabrera) y Cargamanto obteniendo los cultivares mejorados Sutagao y Serranía, respectivamente. Mediante el uso de marcadores moleculares SCAR, comprobaron hasta la RC_1F_1 la presencia de los loci *Co-4²* y *Co-5* en ambos cultivares. No obstante, no se había confirmado el mantenimiento de estos genes en generaciones posteriores al retrocruzamiento. Es por ello, que uno de los objetivos del presente estudio fue determinar si *Co-4²* y *Co-5* seguían presentes en los cultivares Sutagao y Serranía que actualmente se siembran en campo. Para determinar la presencia de dichos loci se utilizaron los marcadores moleculares SCAR: SAS13 asociado al alelo *Co-4²* y SAB3 al locus *Co-5*, ya que para *Co-7* aún no se han reportado marcadores (Boersma et al., 2013). La amplificación de los marcadores SAS13 y SAB3 pudo determinar que ambos loci se hallan en el cultivar Serranía, mientras que en el cultivar Sutagao solo se obtuvo el marcador SAS13. Las secuencias amplificadas por los SCAR fueron comparadas mediante herramientas bioinformáticas como los algoritmos BLASTN y BLASTX contra las bases de datos disponibles, Phytozome y GenBank. Los resultados indicaron que SAS13 el cual hace parte de una región que codifica para proteínas tipo Serina-Treonina-Quinasa, se encontró mutado en el cultivar Sutagao.

1.3 Materiales y métodos

1.3.1 Material Vegetal y extracción de ADN

Los cultivares Serranía y Sutagao y sus parentales el diferencial G2333 y la variedad Cabrera pertenecientes a la colección de germoplasma de frijol fueron suministrados por el Laboratorio de Recursos Genéticos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia y el frijol Cargamanto fue obtenido de manera comercial. Una vez adquirido el material vegetal, las semillas fueron dispuestas en bandejas de crecimiento, sembradas en suelo estéril y mantenidas en invernadero a una temperatura promedio de 18 °C y humedad relativa del 71%.

La extracción del ADN se realizó a partir de hojas de plantas de 15 días de edad. El material vegetal fue macerado con nitrógeno líquido y la extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Miklas et al., (1996). Para este procedimiento se tomaron 5 réplicas técnicas por variedad de frijol, repitiéndose este ensayo tres veces.

1.3.2 Amplificaciones de los genes de resistencia *Co-4²* y *Co-5*

Para la amplificación de los marcadores asociados a *Co-4²* y *Co-5* se usaron los SCARs: SAS13 para el alelo *Co-4²* (Forward: CACGGACCGAATAAGCCACCAACA; Reverse: CACGGACCGAGGATACAGTGAAAG), y SAB3 para el locus *Co-5* (Forward: TGGGGCACACATAAGTTCTCACGG; Reverse: TGGCGCACACCATCAAAAAGGTT) previamente reportados por Miklas y Kelly (2002), y Vallejo y Kelly (2001), respectivamente. Las reacciones fueron llevadas a un volumen final de 15 µL que contenía 1X de buffer (500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl (pH 9.1 at 20 °C) y 0.1% Triton™ X-100), 2,5 mM de MgCl₂, 1U de Taq ADN-polimerasa (Vivantis Technologies sdn, BHD), 0,25 mM de dNTPs, 0,1 µM de cada uno de los cebadores y 2 µL de ADN. La amplificación para SAS13 se realizó bajo el siguiente perfil térmico: 94 °C durante 1 min, seguido de 34 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 67 °C por 2:24 min y 72 °C por 2 min, finalmente una extensión de 72 °C por 5 min. Para SAB3 las condiciones fueron: 94 °C durante 1 min, seguido de 34 ciclos de 94 °C por 10 segundos, 67 °C durante 40 segundos, 72 °C por 2 min y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos obtenidos de cada amplificación fueron corridos por electroforesis a 80V en un gel de agarosa al 1,5%, usando el marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus (DNA Ladder

Vivantis), la tinción se realizó con bromuro de etidio y para su visualización se utilizó el sistema de imagen de Bio-Rad Laboratories' ChemiDoc MP.

1.3.3 Secuenciación de los productos amplificados

Las amplificaciones obtenidas con los marcadores SCAR: SAS13 y SAB3 asociados a los loci *Co-4* y *Co-5* en los cultivares Serranía y Sutagao y en sus parentales G2333, Cabrera y Cargamanto, fueron secuenciadas utilizando el método Sanger en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, SSiGMol. Cada una de las secuencias obtenidas fueron comparadas con el genoma de referencia de *P. vulgaris* disponible en Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>) y en el GenBank.

1.3.4 Análisis de las secuencias obtenidas

El análisis de las secuencias de los productos amplificados con los marcadores SCAR SAS13 y SAB3 en los diferentes materiales de frijol común, se realizó usando la herramienta BLASTN y BLASTX siguiendo los parámetros E-value $<1 \times 10^{-5}$ y una identidad mayor al 90% y 70%, respectivamente. Las secuencias amplificadas del genoma de *P. vulgaris* fueron comparadas con el genoma de referencia G19833 disponible en Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) y analizadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La función ontológica (GO) de los transcritos fue consultada en las bases de datos mencionadas.

1.4 Resultados

1.4.1 El cultivar Sutagao no presenta el SCAR asociado al gen de resistencia *Co-5*

Con el objetivo de confirmar la presencia de los loci *Co-4²* y *Co-5* introgresados por el diferencial G2333 en los cultivares Sutagao y Serranía, se realizaron ampliificaciones de los genes *Co* con los marcadores moleculares tipos SCAR: SAS13 y SAB3. Entre los resultados se obtuvo que bajo las condiciones de amplificación del marcador SAS13 para el alelo *Co-4²*, se evidenció una banda de un tamaño aproximado a 950 pb en los cultivares Serranía y Sutagao, coincidiendo con el parental G2333, sin embargo, el frijol comercial Cargamanto también presentó la banda del mismo tamaño. El parental susceptible Cabrera no amplificó la banda de 950 pb sin embargo reveló una de 400 pb, la cual fue evidenciada en todos los materiales de frijol a excepción del diferencial G2333 (Figura 1-1 a y b).

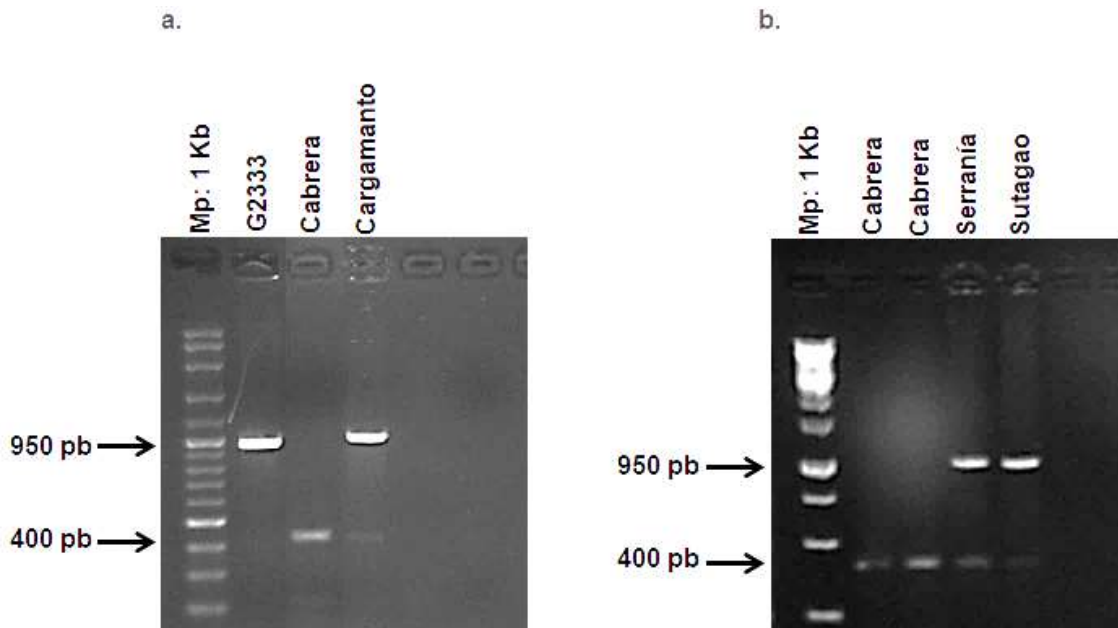


Figura 1-1: Confirmación del alelo *Co-4²* en los cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. utilizando el marcador molecular SCAR: SAS13. **a.** Mp 1Kb, marcador de peso; diferencial G2333; parentales comerciales Cabrera y Cargamanto. **b.** Parental Cabrera; cultivar Serranía; cultivar Sutagao. Se evidencia una banda de un tamaño aproximado a 950 pb en el diferencial resistente G2333, en los cultivares Serranía, Sutagao y en el comercial Cargamanto. En los dos geles se evidencia una banda de 400 pb en todas las variedades y cultivares a excepción del diferencial G2333.

Para las condiciones de amplificación del marcador molecular SAB3 asociado al locus de resistencia *Co-5*, se obtuvo una banda de 400 pb (Vallejo y Kelly, 2001; Garzón et al., 2007), en el cultivar Serranía y en el parental resistente G2333, siendo ausente en el cultivar Sutagao y en las variedades comerciales Cabrera y Cargamanto (Figura 2-2).

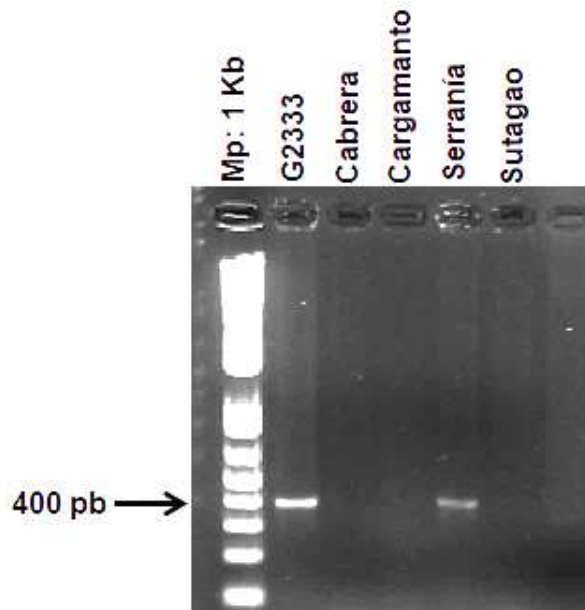


Figura 1-2: Confirmación del marcador molecular SAB3 asociado al locus de resistencia *Co-5* en los cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. Mp 1Kb, marcador de peso; diferencial G2333; parentales comerciales Cabrera y Cargamanto; cultivar Serranía; cultivar Sutagao. Se observa una banda de 400 pb en el diferencial G2333 y en el cultivar Serranía, siendo ausente en los frijoles Cabrera, Cargamanto y Sutagao.

La amplificación con los marcadores SCAR, SAS13 y SAB3 asociados a los loci *Co-4²* y *Co-5* respectivamente, permitió confirmar que dichos loci de resistencia se encuentran en el cultivar Serranía y en el parental resistente G2333, sin embargo, el cultivar Sutagao no amplificó el marcador asociado al locus *Co-5*. La variedad comercial Cargamanto, inesperadamente amplificó una región de 950 pb mostrando la presencia del alelo *Co-4²*, mientras que en el parental susceptible Cabrera ambos loci estuvieron ausentes.

1.4.2 Análisis de las regiones amplificadas con SAS13 y SAB3

1.4.2.1 El marcador molecular SAS13 es homólogo al gen *COK-4* de *Phaseolus vulgaris* L.

De acuerdo al análisis obtenido por BLASTN del GenBank las secuencias de 950 bp del marcador SAS13 asociado al alelo *Co-4²* amplificado en los parentales G2333, Cargamanto y en los cultivares de frijol común Serranía y Sutagao, son homólogas al gen *COK-4* del genoma de *P. vulgaris* L., el cual codifica para proteínas tipo Serina-Treonina quinasas. La identidad para cada uno de los materiales de frijol fue del 97, 96, 95 y 94% respectivamente (accesión AF153441.1; BLASTN E-value ≤ 0). De igual modo, estas secuencias también mostraron homología con una región del cromosoma artificial bacteriano BAC 78L₁₇ del cultivar de frijol Sprite (accesión AY341443.1; BLAST E-value ≤ 0). La identidad respectiva con el BAC 78L₁₇ en cada uno de los materiales de frijol fue del 95, 97, 96 y 96% (Tabla 1-1). El frijol comercial Cargamanto que amplificó la banda de 950 pb, también presenta el alelo de resistencia *Co-4²* ya que de acuerdo a los análisis realizados, la localización y la homología de sus secuencias coinciden con los resultados obtenidos en el diferencial mesoamericano G2333 (Tabla 1-1, Tabla 1-2).

Así mismo, el resultado obtenido mediante BLASTX, realizado en la base de datos Phytozome, reveló que las secuencias del producto de 950 pb encontrada en los parentales G2333, Cargamanto y en los cultivares de frijol común Serranía y Sutagao, son similares a proteínas Serina-Treonina-quinasa/Proteína quinasa específica de Treonina (STK) y a la Interleuquina-1 Receptor asociado a quinasa-1 (IRAK1). La STK es identificada como el transcrito Phvul.008G028400.2 y la proteína IRAK1 como Phvul.008G028500.1. La ubicación de las secuencias codificantes para ambas proteínas quinasas están localizadas en el cromosoma PV08 de *P. vulgaris* L. La identidad y cobertura entre las proteínas STK e IRAK1 fue del 89 y 97.9%, así mismo estos transcritos mostraron homología con otras STKs e IRAKs de frijol común y de *Glycine max* (Tabla 1-2).

Tabla 1-1: Análisis de las secuencias nucleotídicas del fragmento de 950 pb amplificado con el marcador molecular SAS13

SCAR	Tamaño (pb)	Cromosoma ^a	Frijol ^b	BLASTN ^c					
				<i>COK4</i>			BAC 78L ₁₇		
				E-value	Identidad > 90%	Cobertura (%)	E-value	Identidad > 90%	Cobertura (%)
SAS13	950	PV08	G2333	0	97	100	0	95	97
			Cargamanto	0	96	100	0	97	96
			Serranía	0	95	99	0	96	96
			Sutagao	0	94	98	0	96	91

^a La ubicación en el cromosoma fue determinada con la herramienta BLAST de la base de datos Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>)

^b Materiales de frijol común que amplificaron la banda de 950 pb.

^c Las regiones homólogas de *P. vulgaris* L. fueron obtenidas realizando el análisis BLASTN, comparando las secuencias genómicas amplificadas con el marcador SCAR con las bases de datos del GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

Tabla 1-2: Análisis de las secuencias aminoacídicas obtenidas del producto amplificado por el marcador molecular SAS13 en los materiales de frijol común

SCAR	Tamaño (pb)	Cromosoma	BLASTX ^a , Nombre del transcrito	Localización ^b	Proteínas homólogas	E-value	Identidad > 70 %	Cobertura (%)
SAS13	950	PV08	STK	Chr08:2288306..2288962	Phvul.008G028500.1	1e-130	89	97.9
					Phvul.008G028400.2	1e-130	88.5	97.9
					Phvul.008G028600.1	1e-105	77.5	97.9
					Phvul.008G028300.1	0	90.8	99.7
					Phvul.008G028500.1	0	84.1	98
					Glyma.18G271400.1	0	70	96.8

^a El análisis BLASTX fue realizado comparando las secuencias genómicas amplificadas con el marcador SCAR en los materiales de frijol evaluados, con las bases de datos de proteínas de *P. vulgaris* v2.1 de Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>).

^b Localización de las secuencias codificantes en el cromosoma PV08 de *P. vulgaris* L.

Durante el análisis BLASTX de Phytozome también se realizaron alineamientos con otros genomas de referencia, entre éstos el de *Arabidopsis thaliana* y el de *Oryza sativa*. Los resultados obtenidos indicaron que los transcritos Phvul.008G028400.2 (STK) y Phvul.008G028500.1 (IRAK1) tienen similitud con proteínas que pertenecen a una superfamilia de proteínas quinasa de *A. thaliana* (Protein kinase superfamily protein, ID 875341.177370) e igualmente con la proteína RLK denominada FER Malectina o FERONIA (ID 875341.167948, Malectin/receptor-like protein kinase family proteincon, RLKs). Además, este transcrito también fue similar a la proteína TKL_IRAK_CrRLK1L-1.3 (CrRLK1L, *Catharanthus roseus* RLK1-Receptor like kinases), de *O. sativa*, la cual corresponde a la subfamilia CrRLK1L-1.

Encontrada la homología del marcador SAS13 con el gen *COK-4* y STKs de *P. vulgaris* L., se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias amplificadas en los frijoles G2333, Cargamanto, Serranía y Sutagao mediante las herramientas CLUSTALW del programa BioEdit y CLUSTAL MUSCLE (MULTiple Sequence Comparison by Log-Expectation) del European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Entre los resultados se pudo evidenciar que los parentales G2333 y Cargamanto al igual que el cultivar Serranía presentaron secuencias de un tamaño aproximado a 889, 897 y 900 pb, respectivamente, mientras que el cultivar Sutagao reveló una secuencia más corta de 510 pb. Dicha longitud en el cultivar Sutagao se puede asociar a una delección en la región comprendida entre la base 307 a la 705 del alineamiento (Figura Suplementaria 1-1 y 1-2). Por lo tanto, la mutación en el cultivar Sutagao está localizada en la región codificante del gen *COK-4* del cultivar Sprite específicamente en las secuencias que codifican los dominios catalíticos y sitios de unión de ATP de la proteína quinasa (Figura 1-3).

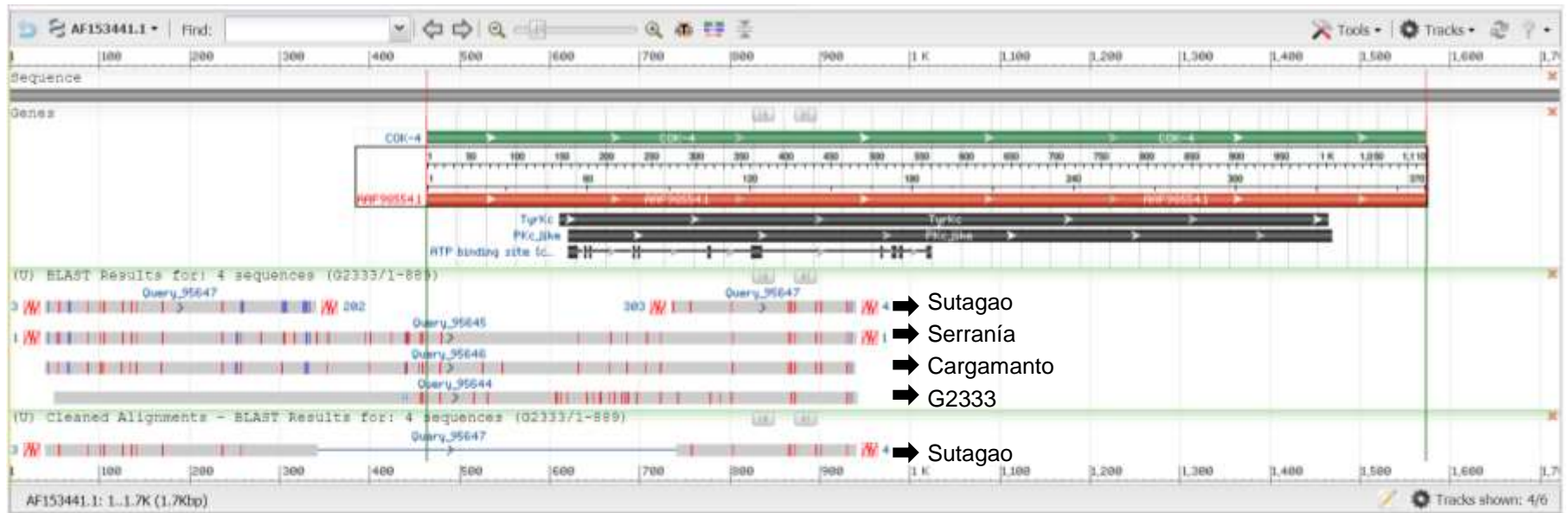


Figura 1-3: Gráfica del alineamiento de las secuencias de SAS13 con el gen *COK-4* de *Phaseolus vulgaris* L. La barra gris superior corresponde a la accesión AF153441.1, la verde al gen *COK-4*, la banda roja es una STK homóloga a *COK-4* (accesión AAF98554.1) y las negras a los dominios catalíticos de proteínas quinasa (aminoácidos 50 al 335) y a los sitios de unión de ATP (aminoácidos 53 a 187). Las barras grises inferiores corresponden a las secuencias consenso de los frijoles G2333, Cargamanto y de los cultivares Serranía y Sutagao. La secuencia del cultivar Sutagao inicia desde la base 40 a la 341 y de la base 741 a la 939. La delección en Sutagao está localizada en la región codificante del gen *COK-4*, específicamente desde el aminoácido 1 hasta el 93 abarcando regiones de los dominios catalíticos y sitios de unión de ATP. La gráfica fue obtenida a partir del BLASTN realizado en el GenBank.

Sin embargo, durante la amplificación del marcador molecular SAS13 también se obtuvo una banda de 400 pb en la parental Cabrera, el frijol comercial Cargamanto y en los cultivares Serranía y Sutagao, siendo ausente en el parental resistente G2333 (Figura 1-1). El análisis BLASTN de dichas secuencias mostró homología con el gen *COK-4* (accesión AF153441.1) y el BAC 78L₁₇ de *P. vulgaris* L. (accesión AY341443.1) (Tabla 1-3). Así mismo, el BLASTX mostró que estas regiones presentan identidad con las proteínas *COK-4* (accesión AAF98554.1) y STKs (accesión: AAR13311.1) de *P. vulgaris* L., y además con receptores quinasa FERONIA (Receptor-Like protein Kinase FERONIA, *Vigna radiata* var. *radiata*) (Tabla 1-4). Las regiones amplificadas también se encuentran en el cromosoma PV08 de *P. vulgaris* de acuerdo a la base de datos Phytozome.

La secuencia del producto de 400 pb en el parental andino comercial Cabrera, se ubica en la región codificante del gen *COK-4* entre los nucleótidos 587 y 979, mientras que la secuencia de 950 pb de G2333 se ubica entre las bases 44 y 946 de la accesión AF153441.1. Este resultado muestra que las secuencias de SAS13 tanto en el parental mesoamericano G2333 como en el comercial andino Cabrera hacen parte del gen *COK-4*, pudiendo esto indicar que dicho marcador estaría asociado a regiones conservadas en *P. vulgaris* L. y las cuales estarían vinculadas en la activación de mecanismos de defensa frente al ataque de una raza de origen andino o mesoamericano.

Tabla 1-3: Análisis de las secuencias nucleotídicas del fragmento de 400 pb obtenidas por el marcador molecular SAS13 en los materiales de frijol común

SCAR	Tamaño (pb)	Cromosoma ^a	Frijol ^b	BLASTN ^c					
				<i>COK-4</i> ^d			BAC 78L ₁₇ ^e		
				E-value	Identidad > 90%	Cobertura (%)	E-value	Identidad > 90%	Cobertura (%)
SAS13	400	PV08	Cabrera	0	99	95	0	99	95
			Cargamanto	0	98	95	0	98	95
			Serranía	0	97	97	0	98	97
			Sutagao	0	97	97	0	98	97

^a La ubicación en el cromosoma fue determinada con la herramienta BLAST de la base de datos Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>)

^b Materiales de frijol común que amplificaron la banda de 400 pb usando el marcador molecular SAS13.

^c Las regiones homólogas de *P. vulgaris* L. fueron obtenidas realizando el análisis BLASTN, comparando las secuencias genómicas amplificadas con el SCAR con las bases de datos del GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>).

^{d,e} Acciones AF153441.1 y AY341443.1, respectivamente.

Tabla 1-4: Análisis de las secuencias aminoacídicas del fragmento de 400 pb por el marcador molecular SAS13 en los materiales de frijol común

SCAR	Tamaño (pb)	Cromosoma ^a	Frijol ^b	BLASTX ^c								
				STK AAR13311.1 ^d			COK4 AAF98554.1 ^d			FERONIA XP_014496888.1 ^d		
				E-value	Id. > 70%	Cob. (%)	E-value	Id. > 70%	Cob. (%)	E-value	Id. > 70%	Cob. (%)
SAS13	400	PV08	Cabrera	3e-91	99	95	1e-89	98	95	1e-73	84	94
			Cargamanto	6e-60	73	96	2e-59	73	96	7e-54	84	94
			Serranía	7e-88	97	96	2e-86	96	96	6e-72	84	96
			Sutagao	1e-64	95	96	1e-63	95	96	8e-53	83	96

^a La ubicación en el cromosoma fue determinada con la herramienta BLAST de la base de datos Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>)

^b Materiales de frijol común que amplificaron la banda de 400 pb usando el marcador molecular SAS13.

^c Las proteínas homólogas de *P. vulgaris* L. fueron arrojadas realizando el análisis BLASTX, comparando las secuencias genómicas amplificadas con el marcador SCAR con las bases de datos del GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>). Id. identidad y Cob. cobertura.

^d Código de acceso de la proteína homóloga.

1.4.2.2 Análisis de las secuencias del marcador molecular SAB3

El análisis BLASTN de la NCBI no arrojó información existente en sus bases de datos acerca de las secuencias de 400 pb amplificadas con el SCAR: SAB3 asociado al locus *Co-5*. La base de datos Phytozome reveló que dichas secuencias (Figura 1-2), se encuentran localizadas en el cromosoma PV10 de *P. vulgaris*, mostrando valores E-value = 1.8×10^{-124} (Localización Chr10:2602105..2603538), no obstante, tampoco se han reportado transcritos, ni proteínas asociadas al locus *Co-5*.

1.5 Discusión

Muchos de los mecanismos moleculares de las plantas están involucrados en la inmunidad vegetal y este es el principio que promueve el desarrollo de cultivares resistentes a potenciales fitopatógenos. En el presente estudio se determinó mediante el uso de marcadores moleculares tipo SCAR la presencia y/o ausencia de los loci de resistencia *Co-4²* y *Co-5* en los cultivares de frijol común Serranía y Sutagao pertenecientes a generaciones posteriores al RC₁F₁. Las regiones amplificadas con los SCARs fueron secuenciadas y comparadas mediante herramientas bioinformáticas como los algoritmos BLASTN y BLASTX contra bases de datos disponibles. Los análisis mostraron que dichas secuencias son similares a proteínas quinasas de *P. vulgaris* L., vinculadas en desarrollo vegetal y en defensa contra patógenos.

Los marcadores moleculares SAS13 y SAB3 están vinculados a genes de resistencia a *C. lindemuthianum*, SAS13 al locus *Co-4* (Rodrigues et al., 2015) y al alelo *Co-4²* (Young et al., 1998; Miklas y Kelly, 2002), mientras que SAB3 a *Co-5* (Vallejo y Kelly, 2001). Ambos marcadores permitieron determinar la presencia de los genes *Co-4²* y *Co-5* en el cultivar Serranía, no obstante, SAB3 asociado al locus *Co-5*, no estuvo presente en el cultivar Sutagao, cabe señalar que este SCAR se halla a una distancia de 12.98 cM del locus (Garzón et al., 2007). Las bandas obtenidas en las amplificaciones tanto en el cultivar Serranía como en el cultivar Sutagao coinciden con el tamaño reportado para cada marcador (Vallejo y Kelly, 2001; Miklas y Kelly, 2002).

El análisis BLASTN de las secuencias del marcador molecular SAS13 indicó que dicho SCAR se halla en el cromosoma PV08 de *P. vulgaris* L. SAS13 fue previamente usado por Melotto et al. (2004), como una sonda que hibridó en el clon BAC 78L₁₇, el cual contenía una región genómica de 106.5 Kb vinculada al locus *Co-4* y genes que codifican para proteínas con dominios quinasa denominados *COK-4*, similares a las proteínas codificadas por los genes *Pto* de *Solanum lycopersicum*, conocidos por conferir resistencia a *Pseudomonas syringae* (Melotto et al., 2004). Adicionalmente, se ha descrito que *COK-4* codifica para proteínas que hacen parte de una familia de receptores de tipo quinasa (Receptor-Like Kinase, RLK), que están involucradas en la percepción del patógeno y en la transducción de señales (Rodrigues et al., 2015). El clon BAC 78L₁₇ hace parte de una librería del cultivar Sprite que contiene cinco homólogos del gen *COK-4* encontrados inicialmente en el genotipo de frijol SEL1308 (Melotto et al., 2004; Rodrigues et al., 2015).

De acuerdo a los resultados obtenidos, la secuencia de 950 pb amplificada con SAS13 es homóloga al gen *COK-4* y al BAC 78L₁₇, previamente reportado por Melotto et al. (2004), confirmando que G2333, Cargamanto, Serranía y Sutagao presentan el alelo *Co-4*². El marcador SAS13 ha sido utilizado tanto para la descripción del locus *Co-4* (Melotto et al., 2004; Rodrigues et al., 2015) como para la identificación del alelo *Co-4*² (Miklas y Kelly, 2002), el cual tiene un espectro de resistencia más amplio que *Co-4* (Silverio et al., 2002). Así mismo, el marcador SAS13 mostró homología con los transcritos Phvul.008G028500.1, Phvul.008G028600.1, Phvul.008G028400.1 y Phvul.008G028300.1 de *P. vulgaris* L., los cuales corresponden a copias del gen *COK-4* similares a las del genotipo de frijol SEL1308 (Rodrigues et al., 2015). Los transcritos Phvul.008G028400.1 (STK) y Phvul.008G028500.1 (IRAK1) al ser comparados con otros genomas de referencia mostraron similitud con la proteína RLK denominada FER Malectina o FERONIA de *Arabidopsis thaliana* y con la proteína TKL_IRAK_CrRLK1L-1.3 de *Oryza sativa*. Esta proteína FERONIA pertenece a la familia de receptores quinasa, CrRLK1, que participan en desarrollo y en crecimiento vegetal, en la señalización de hormonas, en la expansión celular y en respuestas a estrés biótico y abiótico. Además, ha mostrado estar involucrada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular bajo estrés abiótico (Feng et al., 2018; Guo et al., 2018). Por otro lado, las proteínas CrRLK1 (*Catharanthus roseus* RLK1-Receptor like kinases) se encuentran en varias especies de plantas y existen al menos 17 miembros en *Arabidopsis*. Estas proteínas de membrana

presentan ectodominios tipo Malectina (los cuales se unen a maltosa y oligosacáridos), que reconocen estructuras ricas en carbohidratos tales como polisacáridos de la pared celular (Nissen et al., 2015). Se ha descrito que participan en la inducción de flujo de iones calcio, la acumulación de especies reactivas de oxígeno, exocitosis de componentes de la pared celular, activación de NADPH oxidasas y en la regulación de vías de señalización hormonal tales como etileno (ET), ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS), en respuesta a condiciones de estrés biótico, abiótico y desarrollo vegetal (Wolf et al., 2012; Nissen et al., 2015). Feng et al. (2018), reportan que bajo estrés salino FER detecta fragmentos de pectina junto con el co-receptor LLG1 (LORELEI-LIKE-GPI-ANCHORED PROTEIN 1), induciendo la apertura de canales de calcio y vías de señalización para la reparación de pared celular. De igual modo, agregan que FER actúa como un receptor de DAMPs y puede llegar a interactuar con receptores de PAMPs o MAMPs en la membrana plasmática durante el ataque de patógenos. En un estudio realizado por Guo et al. (2018), se determinó que FER regula negativamente la señalización de AJ en *A. thaliana* bajo la infección de *P. syringae* pv. *tomato*, bacteria que produce la fitotoxina Coronatina (COR), molécula que imita la forma activa del AJ, AJ-isoleucina y genera susceptibilidad. De modo que, el receptor quinasa FERONIA es un regulador positivo de la inmunidad en la planta ante *P. syringae* pv. *tomato* ya que reduce los niveles de MYC2 un factor de transcripción dependiente de AJ.

No obstante, también se ha observado que FER puede actuar como un regulador negativo de inmunidad vegetal. Azevedo et al. (2018), evaluaron la función de FER en plantas mutadas (*fer-5*) y complementadas con el ortólogo COK-4 de *P. vulgaris* L., al ser sometidas a la cepa *Pst* DC3000. Los resultados indicaron que el mutante *fer-5* redujo el desarrollo de síntomas y población bacteriana en plantas infectadas, mientras que el mutante complementado mostró síntomas severos, sugiriendo que COK-4 de frijol común es un regulador negativo de inmunidad contra patógenos bacterianos. Sin embargo, Franck et al. (2018), mencionan que FER puede influir positivamente en la inmunidad activada por PAMPs (PTI) contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, ya que FER promueve la asociación entre los receptores FLS2 (FLAGELLIN SENSITIVE2), BAK1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1) y EFR (ELONGATION FACTOR TU RECEPTOR). Además, señalan que el péptido hormonal RALF23 (RAPID ALKALINIZATION FACTOR 23), reduce la formación del complejo FLS2/EFR-BAK1, ya que se une a FER inhibiendo la inmunidad vegetal.

Nuestros resultados sugieren que el marcador SAS13 está asociado con una región del gen *COK-4* que codifica para proteínas RLKs ortólogas a FER Malectina o FERONIA de *A. thaliana* y a la TKL_IRAK_CrRLK1L-1.3 de *O. sativa*, vinculadas en crecimiento y en respuesta a estreses de tipo biótico o abiótico. Las proteínas RLKs son proteínas transmembranales con funciones en defensa y en desarrollo vegetal. Estas tienen una estructura básica comprendida por un extremo N-terminal (región extracelular con dominios en que se unen diferentes tipos de ligandos), un segmento transmembranal, un dominio citoplasmático quinasa que se caracteriza por tener residuos conservados tipo Ser/Thr/Tyr y en donde ocurren los eventos de fosforilación y cambios conformacionales en la estructura para la transducción de señales; y finalmente el extremo C-terminal el cual es citosólico (Afzal, et al., 2008). La proteína IRAK-1 es una quinasa en mamíferos asociada a receptores transmembranales tipo TLR (Toll-like Receptor) para la generación de respuestas de inmunidad y de transducción de señales vinculadas a defensa. Posee residuos Tyr o Thr que requieren actividad de fosforilación. Se ha comprobado que tanto las RLKs de plantas como la IRAK1 son quinasas tipo no RD, que se caracterizan por la ausencia de una arginina que precede al aspartato, esto para inhibir la catálisis de este aminoácido. Este tipo de quinasas no RD están asociadas a defensa, presentan un alto grado de conservación evolutiva y funcional ya que exhiben similitud en su estructura y en la activación por fosforilación en este tipo de residuos (Dardick y Ronald, 2006; Klaus-Heisen, et al., 2011). De acuerdo a funciones ontológicas (KEGGORTH, ID K04730), IRAK1, está vinculada con vías de señalización tipo MAPK (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE), y con receptores tipo TLR que activan proteínas con dominios TIR en la inmunidad de animales.

Por lo tanto de acuerdo a nuestro análisis *COK-4* de *P. vulgaris* L., está estrechamente vinculado con la activación de mecanismos de defensa durante la interacción planta-patógeno. No obstante, Rodrigues et al. (2015), sugieren que *COK-4* no solo participa en defensa contra *C. lindemuthianum* sino también en la inmunidad a otros fitopatógenos, ya que fue regulado positivamente bajo tratamientos con flagelina (flg22), sugiriendo que *COK-4* podría estar vinculado a inmunidad innata en frijol.

No obstante, durante el análisis de la secuencia de SAS13 se determinó que el cultivar Sutagao el cual amplificó el SCAR asociado al alelo *Co-4*² presenta una mutación en el gen *COK-4* específicamente en las secuencias del aminoácido 1 hasta el 93, abarcando

regiones de los dominios catalíticos y sitios de unión de ATP. Los dominios catalíticos son requeridos para la transferencia de grupos fosfatos a los sustratos Ser/Thr (Afzal, et al., 2008; Hamel, et al., 2012), de modo que, una mutación en estas regiones y en los sitios de unión de ATP afecta la función quinasa debido a defectos en los eventos de fosforilación. Esta mutación en el gen *COK-4* podría afectar la activación de otras proteínas membranales, así como la transducción de señales hacia otras proteínas corriente abajo relacionadas en la generación temprana de respuestas de defensa durante la interacción planta-patógeno (Hamel, et al., 2012; Kimura et., 2017).

Además, durante los eventos de amplificación del SCAR SAS13 también se obtuvo una banda de 400 pb en los parentales comerciales Cabrera, Cargamanto y en los cultivares Serranía y Sutagao, siendo ausente en el diferencial G2333. Al ser comparada las secuencias con bases de datos, se evidenció que dicha región genómica de 400 pb es homóloga al gen *COK-4* y presenta alta similitud con la proteína RLK FERONIA de *Vigna radiata* var. *radiata*. Estos resultados sugieren que las secuencias amplificadas con SAS13 codifican para proteínas altamente conservadas en frijol común, como son las de tipo Serina-Treonina quinasa, las cuales participan en diferentes funciones como se ha expuesto anteriormente. Rodrigues et al. (2015), mencionan que el locus *Co-4* puede estar participando en inmunidad basal en adición a la función originalmente asignada de resistencia a antracnosis, además, indican que los marcadores PvTA25, PvSNP_{COK-4} y entre éstos SAS13, se ubican en el cromosoma Pv08 de *P. vulgaris* L., sugiriendo que forman un lugar único en el genoma ya que están ligados al locus de resistencia *Co-4*. No obstante, es necesario profundizar si dicha región amplificada con SAS13 en el frijol andino Cabrera corresponde exclusivamente a la resistencia a antracnosis o hace parte de un grupo de genes de acción complementaria al alelo de resistencia *Co-4²* tal como lo sugieren Campa et al. (2014) y Rodrigues et al. (2015), ya que materiales de frijol común de origen andino como lo son las variedades Cabrera y Cargamanto presentan dicha región asociada al alelo *Co-4²* y muestran ser susceptibles a *C. lindemuthianum*.

Otro de los marcadores moleculares SCAR utilizados en este estudio fue SAB3 ligado al gen de resistencia *Co-5*, el cual amplificó una banda de 400 pb en el parental resistente G2333 y en el cultivar Serranía, siendo ausente en los parentales comerciales Cabrera, Cargamanto, y en el cultivar Sutagao (Figura 1-2). El marcador SAB3 de acuerdo al análisis BLASTN se encuentra localizado en el cromosoma PV10 de *P. vulgaris*, no

obstante no hay información disponible en bases de datos que permitan conocer genes y proteínas asociadas a dicha región. De acuerdo con Campa et al. (2009), el locus *Co-5* incluye un clúster de genes que confieren resistencia específica a las razas 3, 6, 7, 31, 38, 39, 102 y 449 de *C. lindemuthianum*. De acuerdo con Garzón et al. (2007), el marcador SAB3 se encuentra a una distancia de 12,98 cM del locus *Co-5*, por lo tanto no se puede deducir que el cultivar Sutagao no presente dicho locus.

1.6 Referencia bibliográfica

Alzate-Marin, L., Menarim, H., Baía, S., Paula Jr., Souza, K., Costa, M., Barros, E., Moreira, M. (2001) Inheritance of anthracnose resistance in the common bean differential cultivar G2333 and identification of a new molecular marker linked to the *Co-4²* gene. *J Phytopathol* 149: 259–264. doi: 10.1046/j.1439-0434.2001.00612.x.

Afzal, A., Wood, A., Lightfoot, D. (2008) Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense. *Mol Plant Microbe Interact.* 21 (5): 507-17. doi:10.1094/MPMI-21-5-0507.

Amin, M. (2013) An Overview of Distribution, Biology and the Management of Common Bean Anthracnose. *J Plant Pathol Microb* 4:193. doi: 10.4172/2157-7471.1000193.

Azevedo, R., Gonçalves-Vidigal, M., Rodrigues, P., Melotto, M. (2018) The common bean *COK-4* and the Arabidopsis FER kinase domain share similar functions in plant growth and defence. *Mol Plant Pathol.* 19 (7): 1765–1778. doi: 10.1111/mpp.12659.

Basavaraju, P., Shetty, N.P., Shetty, H.S., De Neergaard, E., Jørgensen, H.J.L. (2009) Infection biology and defence responses in shorgum against *Colletotrichum sublineolum*. *J Appl Microbiol.* 107 (2): 404-15. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04234.x.

Bitocchi, E., Bellucci, E., Giardini, A., Rau, D., Rodriguez, M., Biagetti, E., Santilocchi, R., Spagnoletti, P., Gioia, T., Logozzo, G., Attene, G., Nanni, L., Papa, R., (2013) Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. *New Phytol.* 197 (1): 300-13. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04377.x.

Boersma, J., Conner, R., Balasubramanian, P., Yu, K., Hou, A. (2013) Marker-assisted dissection of anthracnose resistance in the dry bean cultivar Morden003. *Can. J. Plant Pathol.* 93: 1115-1123. doi:10.4141/cjps2013-085.

Burt, A., William, M., Perry, G., Khanal, R., Pauls, K., Kelly, J., Navabiet, A. (2015) Candidate Gene Identification with SNP Marker-Based Fine Mapping of Anthracnose

Resistance Gene Co-4 in Common Bean. PLoS ONE 10(10): e0139450. doi:10.1371/journal.pone.0139450.

Campa, A., Giraldez R., Ferreira, J. (2009) Genetic dissection of the resistance to nine anthracnose races in the common bean differential cultivars MDRK and TU. Theor Appl Genet 119:1–11. doi:10.1007/s00122-009-1011-8.

Campa, A., Rodríguez-Suárez, C., Giraldez, R., Ferreira, J. (2014) Genetic analysis of the response to eleven *Colletotrichum lindemuthianum* races in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). BMC Plant Biology. Vol. 14: 115. doi:10.1186/1471-2229-14-115.

Castro-Guerrero, N., Arellano, M., Mendoza, D., Valdés-López, O. (2016). Common bean: A legume model on the rise for unraveling responses and adaptations to iron, zinc, and phosphate deficiencies. Front. Plant Sci. 7: 600. doi:10.3389/fpls.2016.00600

Chen, M., Wu, J., Wang, L., Mantri, N., Zhang, X., Zhu, Z., Wang, S. (2017) Mapping and Genetic Structure Analysis of the Anthracnose Resistance Locus *Co-1HY* in the Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). PLoS One. Vol. 12 (1): e0169954. doi:10.1371/journal.pone.0169954.

Dardick, C., Ronald, P. (2006) Plant and Animal Pathogen Recognition Receptors Signal through Non-RD Kinases. PLOS Pathogens 2(1): e2. doi:10.1371/journal.ppat.0020002.

Dubey, N., Singh, K. (2018) Role of NBS-LRR Proteins in Plant Defense. In: Singh A., Singh I. (eds). Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction, Springer. Chapter 5: 115-138. doi:10.1007/978-981-10-7371-7_5.

Feng, W., Kita, D., Peaucelle, A., Cartwright, H., Doan, V., Duan, Q., Ming-Che Liu, Maman, J., Steinhorst, L., Schmitz-Thom, I., Yvon, R., Kudla, J., Hen-Ming Wu, Cheung, A., Dinneny, J. (2018) The FERONIA Receptor Kinase Maintains Cell-Wall Integrity during Salt Stress through Ca^{2+} Signaling. Curr Biol. 28 (5): 666–675. doi:10.1016/j.cub.2018.01.023.

Fontenelle, M., Santana, M., Clossen, A., Bazzoli, D., Bromonschenkel, S., Araújo, E., Queiroz, M. (2017) Differential expression of genes during the interaction between

Colletotrichum lindemuthianum and *Phaseolus vulgaris*. Eur J Plant Pathol 147: 653. doi:10.1007/s10658-016-1033-4.

Franck, C.M., Westermann, J., Boisson-Dernier, A. (2018). Plant Malectin-Like Receptor Kinases: From Cell Wall Integrity to Immunity and Beyond. Annual Review of Plant Biology, 69 (1): 301–328. doi:10.1146/annurev-arplant-042817-040557.

Garzón, L., Blair, M., Ligarreto, G. (2007) Uso de Selección Asistida con Marcadores para Resistencia a Antracnosis en Frijol Común. Rev. Agronomía Colombiana 25: 207-214.

Garzón, N. (2012). Homólogos de genes de resistencia en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y su aplicación en resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum*. Trabajo de grado Ph.D. en Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. 90p.

Guo, H., Nolan, T., Song, G., Liu, S., Xie, Z., Chen, J., Schnable, P., Walley, J., Yin, Y. (2018) FERONIA Receptor Kinase Contributes to Plant Immunity by Suppressing Jasmonic Acid Signaling in *Arabidopsis thaliana*. Curr Biol. 28 (20): 3316-3324.e6. doi:10.1016/j.cub.2018.07.078.

Hamel, L., Nicole, M., Duplessis, S., Ellis, B. (2012) Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plant-Interacting Fungi: Distinct Messages from Conserved Messengers. The Plant Cell, Vol. 24: 1327–1351. doi:10.1105/tpc.112.096156.

Kelly, J.D., V.A. Vallejo, (2004). A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. Hortscience 39 (6):1196–1207. doi:10.21273/HORTSCI.39.6.1196.

Kimura, S., Waszczak, C., Hunter, K., Wrzaczek, M. (2017) Bound by Fate: The Role of Reactive Oxygen Species in Receptor-Like Kinase Signaling. The Plant Cell, Vol. 29: 638–654. doi:10.1105/tpc.16.00947

Klaus-Heisen, D., Nurisso, A., Pietraszewska-Bogiel, A., Mbengue, M., Camut, S., Timmers, T., Pichereaux, C., Rossignol, M., Gadella, T., Imberty, A., Lefebvre, B., Cullimore, J. (2011) Structure-Function Similarities between a Plant Receptor-like Kinase and the Human Interleukin-1 Receptor-associated Kinase-4. J Biol Chem 286(13): 11202–11210. doi:10.1074/jbc.M110.186171

Melotto, M., Coelho, M., Pedrosa, H., Kelly, J., Camargo, I. (2004) The anthracnose resistance locus *Co-4* of common bean is located on chromosome 3 and contains putative disease resistance-related genes. *Theor Appl Genet* 109: 690-699. doi:10.1007/s00122-004-1697-6.

Miklas, P., Johnson, E., Stone, V., Beaver, J., Montoya, C., Zapata, M. (1996) Selective mapping of QTL conditioning disease resistance in common bean. *Crop Sci.* 36: 1344-1351. doi:10.2135/cropsci1996.0011183X003600050044x.

Miklas, P., J. Kelly (2002) The use of MAS to develop into bean germplasm possessing *Co-4* gene for anthracnose resistance. *Annu. Rep. Bean Improvement Coop.* 45: 68-69.

Nissen, K., Willats, W., Malinovsky, F. (2015) Understanding CrRLK1L Function: Cell Walls and Growth Control. *Trends Plant Sci.* 21 (6): 516-527. doi:10.1016/j.tplants.2015.12.004.

Okada, K., Abe, H., Arimura, G. (2015). Jasmonates induce both defense responses and communication in monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 56 (1): 16-27. doi:10.1093/pcp/pcu158.

Padder, B., Sharma, P., Awale, H., Kelly, J. (2017) *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. *Plant Pathol.* 99 (2): 317-330. doi:10.4454/jpp.v99i2.3867.

Pastor-Corrales, M. A., Tu, J.C. (1989) Anthracnose. En: Schwartz, H. y Galvez, G. (eds.). *Bean production problems*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali. p. 77 – 104

Rodrigues, P., Borges, A., Chowdhury, B., Gomes, D., Mui, S., Aranha, L., Melotto M. (2012) Dissecting *Phaseolus Vulgaris* Innate Immune System against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plos One* 7(8): 1-14. doi:10.1371/journal.pone.0043161.

Rodrigues, P., Francisco, C., Melotto, M. (2015). The *Co-4* locus on chromosome Pv08 contains a unique cluster of 18 *COK-4* genes and is regulated by immune response in common bean. *Theor Appl Genet.* 128 (6): 1193-208. doi:10.1007/s00122-015-2500-6.

Schmutz, J., McClean P.E., Mamidi, S., Wu, G.A., Cannon, S.B., Grimwood, J., Jenkins, J., Shu, S., et al., Jackson, S.A., (2014). A Reference Genome for Common Bean and Genome-Wide Analysis of Dual Domestications. *Nat Genet.* 46 (7): 707-713. doi: 10.1038/ng.3008.

Thorpe, M.R., Ferrieri, A.P., Herth, M.M., Ferrieri, R.A. (2007) C-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. *Planta* 226 (2): 541–551. doi:10.1007/s00425-007-0503-5.

Trabanco, N., Campa, A., Ferreira, J. (2015) Identification of a New Chromosomal Region Involved in the Genetic Control of Resistance to Anthracnose in Common Bean. *Plant genome* 8: 2. doi:10.3835/plantgenome2014.10.0079.

Silverio, L., Vidigal, M., Vidigal, P., Barelli, M., Thomazella, C., Nunes, W. (2002) Genetic resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* race 2047 in G2333. *Annu Rep Bean Improv Coop* 45: 74–75.

Vallejo, V., Kelly, J. (2001) Development of a SCAR marker linked to *Co-5* locus in common bean. *Annu. Rep. Bean Improvement Coop.* 44: 121-122

Wolf, S., Hématy, K., Höfte, H. (2012) Growth control and cell wall signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 63: 381-407. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105449.

Young, A., Melotto, M., Nodari, O., Kelly, D. (1998) Marker assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in common bean cultivar, G2333. *Theor Appl Genet* 96: 87–94. doi:10.1007/s001220050.

1.7 Material suplementario

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
G2333/1-889    1  -----ACCAATGCTGATTATACTTTATTGTCCATAAACCCTTACCGAAAAAGTGTACAAGCTGGTACAATGAAGGGGTAAAAACGGCAATCAA 87
Serrania/1-900 1  --GGTGCACCTTGACCAATTGTGATTATACTTTATTGTCCATAAACCCTTACCGAAAAAGTGTACAAGCTGGTACAATGAAGGGGTAAAAACGGCAATCAA 97
Cargamanto/1-897 1  ---TGCACTTGACCAATTGTGATTATACTTTATTGTCCATAAACCCTTACCGAAAAAGTGTACAAGCTGGTACAATGAAGGGGTAAAAACGGCAATCAA 96
Sutagao/1-510 1  AGGGTGCACCTTGACCAATTGTGATTATACTTTATTGTCCATAAACCCTTACCGAAAAAGTGTACAAGCTGGTACAATGAAGGGGTAAAAACGGCAATCAA 100
Clustal Consensus
          *****
          110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
G2333/1-889   88  AGAAAAGTATTTTGGACTGATACCTTTAATTTTCCCTTGCCATTATTAGAGTAGATGAATCTACCAAACCATATCTAGGACCATATTGGATGAATTTCT 187
Serrania/1-900 98  AGAAATAGTATTTTGGACTGATACCTTTAATTTTCCCTTGCCATTATTAGAGTAGATGAATCTACCAAACCATATCTAGGACCATATTGGATGAATTTCT 197
Cargamanto/1-897 97  AGAAATAGTATTTTGGACTGATACCTTTAATTTTCCCTTGCCATTATTAGAGTAGATGAATCTACCAAACCATATCTAGGACCATATTGGATGAATTTCT 196
Sutagao/1-510 101 AGAAATAGTATTTTGGACTGATACCTTTAATTTTCCCTTGCCATTATTAGAGTAGATGAATCTACCAAACCATATCTAGGACCATATTGGATGAATTTCT 200
Clustal Consensus 81  *****
          210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
G2333/1-889  188  CTATAAATATTTCTAGAAAAAATAAATCTTTTGAAGCTAGCAGTAGTTTTTTCACATCTTGACTAAGTCAAGCTTTTATATGCAGGCGCTTGGATCTCTAT 283
Serrania/1-900 198  GTATAAATATTTCTAGAAAAAATAAATCTTTTGAAGCTAGCAGTAGTTTTTTCACATCTTGACTAAGTCAAGCTTTTATATGCAGGCGCTTGGATCTCTAT 294
Cargamanto/1-897 197  GTATAAATATTTCTAGAAAAAATAAATCTTTTGAAGCTAGCAGTAGTTTTTTCACATCTTGACTAAGTCAAGCTTTTATATGCAGGCGCTTGGATCTCTAT 293
Sutagao/1-510 201  GTATAAATATTTCTAGAAAAAATAAATCTTTTGAAGCTAGCAGTAGTTTTTTCACATCTTGACTAAGTCAAGCTTTTATATGCAGGCGCTTGGATCTCTAT 300
Clustal Consensus
          *****
          310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
G2333/1-889  284  GTGGGGAA--GATTCCAAOCCAACTTAATATGCTTCAAGCCAAACAATTGAGGAGCAACATAGTTCAATGTGTATGGTAAAGTGACAAAGTGAGATC 379
Serrania/1-900 295  TGGGGAA--AATTCCAAOCCAACTTAATATGCTTCAAGCCAAACAATTGAGGAGCAACATAATCAATGTGTATGGTAAAGTGACAAAGTGAGATC 390
Cargamanto/1-897 294  TTGGGGAA--GATTCCAAOCCAACTTAATATGCTTCAAGCCAAACAATTGAGGAGCAACATAGTTCAATGTGTATGGTAAAGTGACAAAGTGAGATC 389
Sutagao/1-510 301  TTGGGGAA--GATTCCAAOCCAACTTAATATGCTTCAAGCCAAACAATTGAGGAGCAACATAGTTCAATGTGTATGGTAAAGTGACAAAGTGAGATC 397
Clustal Consensus
          *****
          410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
G2333/1-889  380  TACTTAAGCAAG--AAGGTGTCACAAATTGGAACTATGTTTCTGAATTGTTTGGGCATGTGTTGTTTGAAGCCCCAACAAATACAAATTTCATCTCAGAGA 478
Serrania/1-900 391  TACTTAAGCAAGCAAGGTGTCACAAATTGGAACTATGTTTCTGAATTGTTTGGGCATGTGTTGTTTGAAGCCCCAACAAATACAAATTTCATCTCAGAGA 490
Cargamanto/1-897 390  TACTTAAGCAAGCAAGGTGTCACAAATTGGAACTATGTTTCTGAATTGTTTGGGCATGTGTTGTTTGAAGCCCCAACAAATACAAATTTCATCTCAGAGA 489
Sutagao/1-510 398  TACATGTCCAAAGGATCTCARGAATACACCCCTACATGATGGTGAAGATTCATGGAAAGGAGGCTGCAAGATCTGCAATAGGAGTAC--AGGAGGATCA 493
Clustal Consensus 302  *****

```

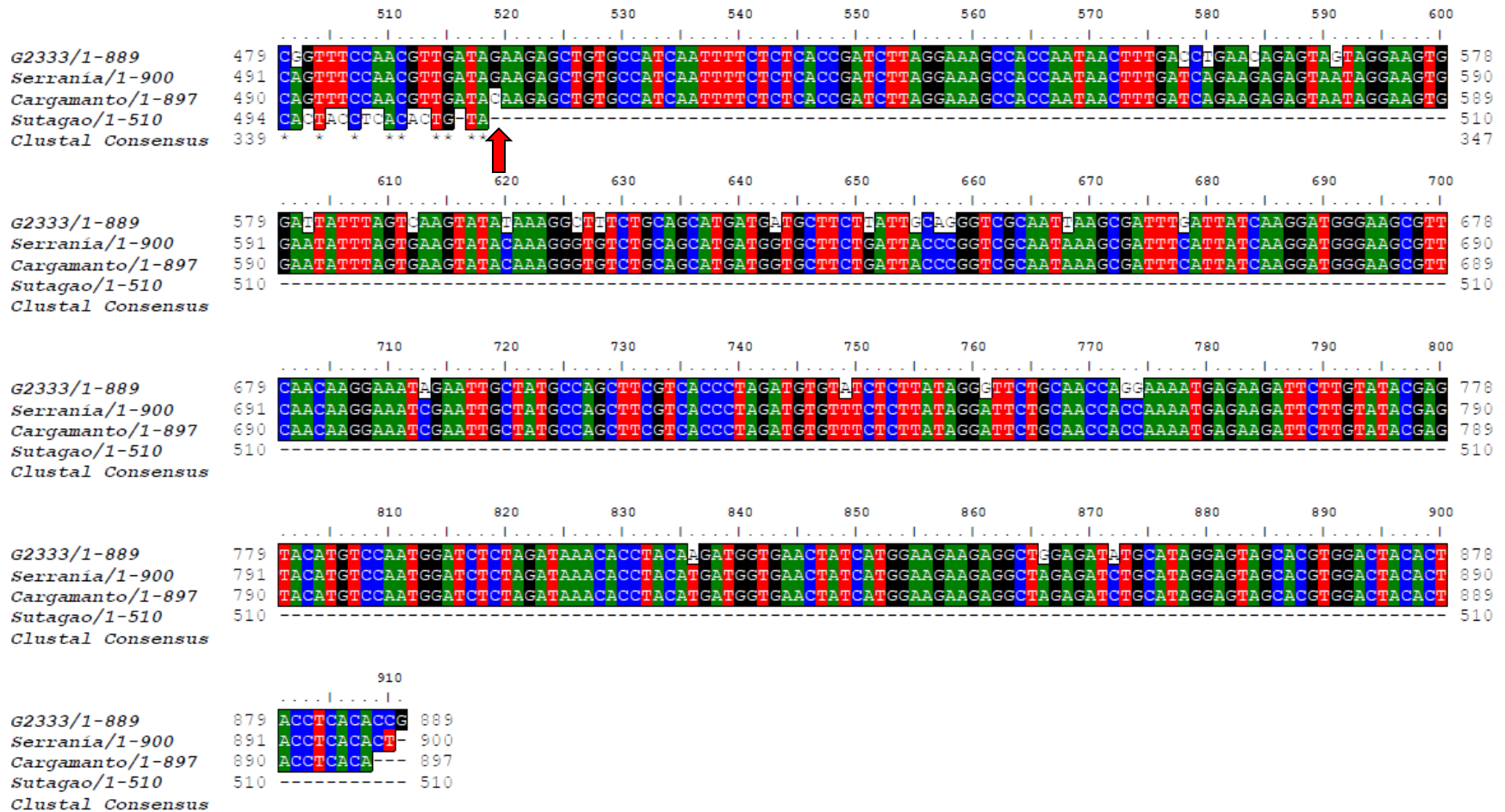


Figura suplementaria 1-1: CLUSTALW BioEdit de las secuencias amplificadas en *Phaseolus vulgaris* L. con el marcador molecular SAS13 asociado al alelo de resistencia *Co-4²*. A la izquierda los frijoles que amplificaron SAS13 y el tamaño de la secuencia obtenida en pb. A la derecha secuencias consensos de cada variedad de frijol común. La regla superior y los valores laterales indican el número de la base. Los asteriscos representan la secuencia consenso del alineamiento múltiple (clustal consenso). A partir de la base 307 del cultivar Sutagao (flecha roja), revela menor similitud en la secuencia respecto a G2333, Serranía y Cargamanto. Nótese la longitud corta de SAS13 en el cultivar Sutagao.

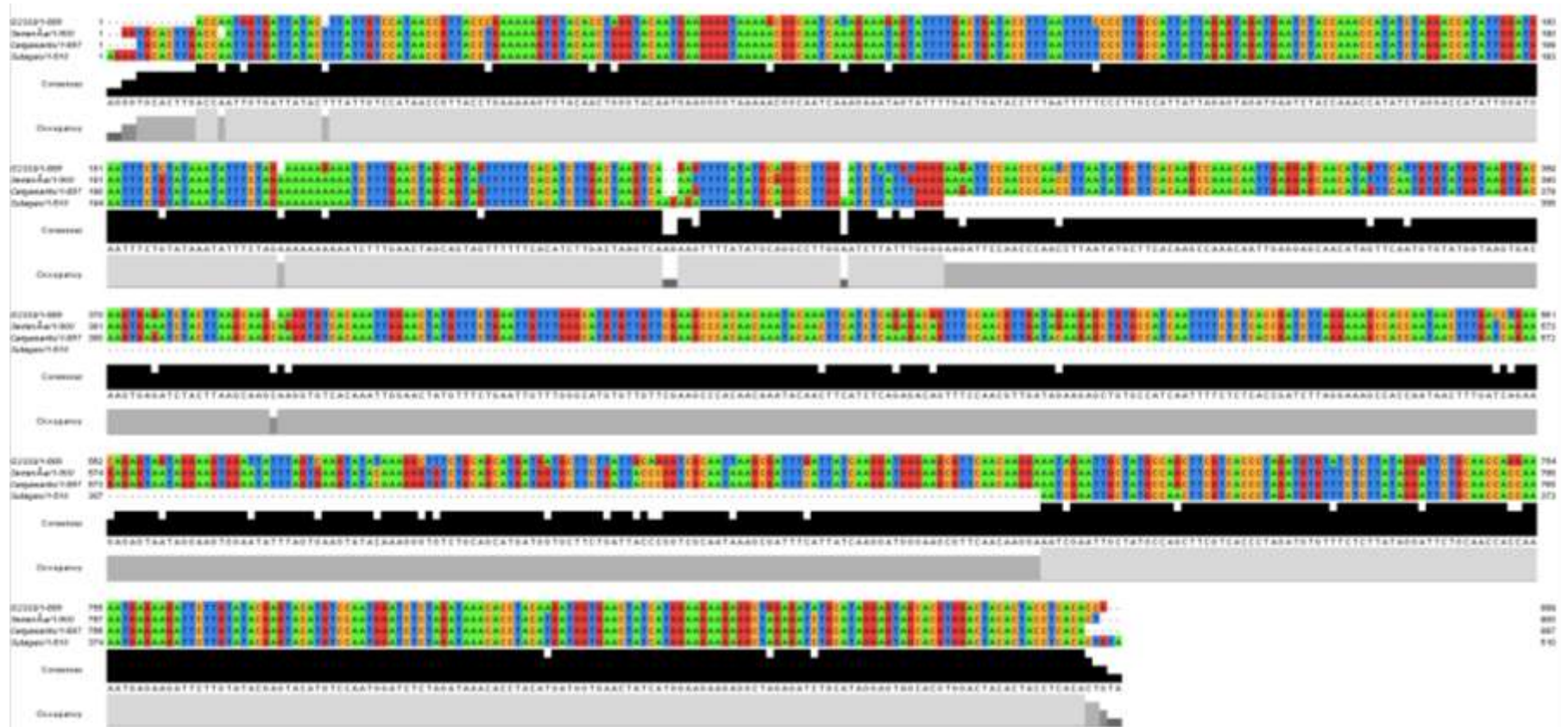


Figura suplementaria 1-2: CLUSTAL MUSCLE de las secuencias amplificadas con el marcador molecular SAS13 asociado al gen de resistencia *Co-4²*. A la izquierda los frijoles que amplificaron SAS13 y el tamaño de la secuencia obtenida en pb. A la derecha secuencias consenso de cada variedad de frijol común. La franja negra representa la secuencia consenso del alineamiento múltiple (*match*), las interrupciones en blanco, regiones sin similitud (*mismatch*). Los puntos en la secuencia consenso representan gaps. Nótese la delección entre las bases 307 y 705 del SCAR SAS13.

Información suplementaria 1-3: Secuencias consenso de los materiales de frijol común que amplificaron el marcador molecular SAS13 asociado al alelo de resistencia *Co-4*². Banda 950 pb.

>G2333/1-889

```
ACCAATGGTGATTATACTTATTGTCCATAACCGTTACCCGAAAAAGTGTACACCTAGGTACAATGAAGGGGT
AAAAGCGGCAATCATAGAAAGAGTATTTTACTGATACCTTTAATTTTCCCCTTGCCATTATTAGAGTAGAT
GAATCTACCAAACCATATCTAGGACCATATTGGATGAATTTCTCTATAAATATTTCTAGAAAAAGAAATCTT
TGAAGTAGCAGTAGTTTTTTCACATCTTGACTAAGTCAGAGTTTTATATGCAGGCCTTGGATCTATTGTGGG
GAAGATTCCAACCAATCTTAATATGCTTCACAAGCCAAACAATTGAGGAGCAACATAGTTCATTGTGTATG
GTAAGTGACAAGTGAGATCTACTTAAGCAAGAAGGTGTCACAAATTGGAACATATGTTTCTGAATTGTTGGG
CATGTGTTGTTTGAAGCCCAACAATAACAATTTCATCTCAGAGACGGTTTCCAACGTTGATAGAAGAGCT
GTGCCATCAATTTTCTCTCACCATCTTAGGAAAGCCACCAATAACTTTGACCTGAACAGAGTAGTAGGAAG
TGGATTATTTAGTCAAGTATATAAAGGCTTTCTGCAGCATGATGATGCTTCTTATTGCAGGGTCGCAATTAA
GCGATTTGATTATCAAGGATGGGAAGCGTTCAACAAGGAAATAGAATTGCTATGCCAGCTTCGTACCCTAG
ATGTGTATCTCTTATAGGGTTCTGCAACCAGGAAAATGAGAAGATTCTTGTATACGAGTACATGTCCAATGG
ATCTCTAGATAAACACCTACAAGATGGTGAACATCATGGAAGAAGAGGCTGGAGATATGCATAGGAGTAGC
ACGTGGACTACACTACCTCACACCG
```

>Serranía/1-900

```
GGTGCACCTTGACCATTGTGATTATACTTTATTGTCCATAACCGTTACCTGAAAAAGTGTACAACCTGGGTACA
ATGAAGGGGTAAAAACGGCAATCAAAGAAATAGTATTTTACTGATACCTTTAATTTTCCCCTTGCCATTAT
TAGAGTAGATGAATCTACCAAACCATATCTAGGACCATATTGGATGAATTTCTGTATAAATATTTCTAGAAA
AAAAAATCTTTGAACTAGCAGTATTTTTTTCACATCTTGACTAAGTCAAATTTTTATATGCGGGCCTTGGA
TCTTATTGGGGGAAAATTCCAACCCAACCTTAATATGCTTCACAAGCCAAACAATTGAGGAGCAACATATTT
CAATGTGTATGGTAAGTGACAAGTGAATCTACTTAAGCAAGCAGGGTGTACAAATTGGAACATATGTTTCT
GAATTGTTTGGGCATGTGTTGTTTGAAGCCCAACAATAACAATTTCATCTCAGAGACAGTTTCCAACGTT
GATAGAAGAGCTGTGCCATCAATTTTCTCTCACCATCTTAGGAAAGCCACCAATAACTTTGATCAGAAGAG
AGTAATAGGAAGTGAATATTTAGTGAAGTATACAAGGGTGTCTGCAGCATGATGGTGCTTCTGATTACCC
GGTCGCAATAAAGCGATTTTATTATCAAGGATGGGAAGCGTTCAACAAGGAAATCGAATTGCTATGCCAGCT
TCGTACCCTAGATGTGTTTCTCTTATAGGATTCTGCAACCACCAAAAATGAGAAGATTCTTGTATACGAGTA
CATGTCCAATGGATCTCTAGATAAACACCTACATGATGGTGAACATCATGGAAGAAGAGGCTAGAGATCTG
CATAGGAGTAGCACGTGGACTACACTACCTCACACT
```

>Cargamanto/1-897

```
TGCACCTTGACCAATTGTGATTATACTTTATTGTCCATAACCGTTACCTGAAAAAGTGTACAACCTGGGTACAA
TGAAGGGGTAAAAACGGCAATCAAAGAAATAGTATTTTACTGATACCTTTAATTTTCCCCTTGCCATTATT
AGAGTAGATGAATCTACCAAACCATATCTAGGACCATATTGGATGAATTTCTGTATAAATATTTCTAGAAAA
AAAAAATCTTTGAACTAGCAGTAGTTTTTTCACATCTTGACTAAGTCAAAGTTTTATATGCAGGCCTTGGAT
CTTATTTGGGGAAGATTCCAACCCAACCTTAATATGCTTCACAAGCCAAACAATTGAGGAGCAACATAGTTC
AATGTGTATGGTAAGTGACAAGTGAGATCTACTTAAGCAAGCAAGGTGTCACAAATTGGAACATATGTTTCTG
AATTGTTTGGGCATGTGTTGTTTGAAGCCCAACAATAACAATTTCATCTCAAAGACAGTTTCCAACGTTG
ATACAAGAGCTGTGCCATCAATTTTCTCTCACCATCTTAGGAAAGCCACCAATAACTTTGATCAGAAGAGA
GTAATAGGAAGTGAATATTTAGTGAAGTATACAAGGGTGTCTGCAGCATGATGGTGCTTCTGATTACCCG
GTCGCAATAAAGCGATTTTATTATCAAGGATGGGAAGCGTTCAACAAGGAAATCGAATTGCTATGCCAGCTT
CGTACCCTAGATGTGTTTCTCTTATAGGATTCTGCAACCACCAAAAATGAGAAGATTCTTGTATACGAGTAC
```

ATGTCCAATGGATCTCTAGATAAACACCTACATGATGGTGAACATCATGGAAGAAGAGGCTAGAGATCTGC
ATAGGAGTAGCACGTGGACTACACTACCTCACA

>Sutagao/1-510

AGGGTGCACCTTGACCAATTGTGATTATACTTTATTGTCCATAACCGTTACCTGAAAAAGTGTACAACCTGGGT
ACAATGAAGGGGTAAAAACGGCAATCAAAGAAATAGTATTTTACTGATACCTTTAATTTTTCCCTTGCCAT
TATTAGAGTAGATGAATCTACCAAACCATATCTAGGACCATATTGGATGAATTTCTGTATAAATATTTCTAG
AAAAAAAAAATCTTTGAACTAGCAGTAGTTTTTTTACATCTTACTAAGTCAAGAGATTTTATATGCAGGCC
TTGGAATCTTATTTGGGGAATCGAATTGCTATGCCAACTTCGTCACCCTAGATGTGTTTTCTTTATAGGATT
CTGCAACCACCAAAATGAGAAGATTCTTGTATACGAGTACATGTCCAATGGATCTCTAGATAAACACCTACA
TGATGGTGAACATCATGGAAGAAGAGGCTAGAGATCTGCATAGGAGTAGCACGTGGACTACACTACCTCAC
ACTGTA

Información suplementaria 1-4: Secuencias consenso de los materiales de frijol común que amplificaron el marcador molecular SAS13 asociado al alelo de resistencia *Co-4²*. Banda 400 pb.

> Cabrera/1-408 pb

TCACGGACCGAATAAGCCACCAACAACCTTTGATCAGAAGAGAGTAATAGGGAGTGGATTATTTAGTGAAGTA
TACAAAGGGTGTCTGCAGCACGATGGTGCTTCTGATTACACGGTCGCAATAAAGCGATTTGATTATCAAGGA
TGGGCAGCGTTCAACAAGGAAATCGAATTGCTATGCCAGCTTCGTCACCCTAGATGTGTTTTCTTTATAGGA
TTCTGCAACCACCAAAATGAGAAGATTCTTGTATACGAGTACATGTCCAATGGATCTCTAGATAAACACCTA
CAAGAAGGTCAACTATCATGGAAGAAGAGGCTAGAGATATGCATAGGAGTAGCACGTGGACTACACTACCT
CACACCGGAGCCAAGCGTTCCATCTTTCACTGTATCCTCGGTCCGTGA

> Cargamanto/1-409 pb

TCACGGACCGAATAAGCCACCAACAACCTTTGATCAGAAGAGAGTAATAGGAAGTGGATTATTTAGTGAAGTA
TACAAAGGGTGTCTGCAGCATGATGGTGCTTCTGATTACMCGGTCGCAATAAAGCGATTTGATTATCAAGGA
TGGGAAGCGTTCAACAAGGAAATCGAATTGCTATGCCAGCTTCGTCACCCTAGATGTGTTTTCTTTATAGGA
TTCTGCAACCACCAAAATGAGAAGATTCTTGTATACGAGTACATGTCCAATGGATCTCTAGATAAACACCTA
CAAGAATGGTCAACTATCATGGAAGAAGAGGCTAGAGATATGCATAGGAGTAGCACGTGGACTACACTACCT
TCACACCGGAGCCAAGCGTTCCATCTTTCACTGTATCCTCGGTCCGTGA

> Serranía/1-403 pb

ACGGACCGAATAAGCCACCAACAACCTTTGATCAGAAGAGAGTATAAGGAAGTGGATTATTTAGTGAAGTATA
CAAAGGGTGTCTGCAGCATGATGGTGCTTCTGATTACCCGGTCGCAATAAAGCGATTTGATTATCAAGGATG
GGAAGCGTTCAACAAGGAAATCGAATTGCTATGCCAGCTTCGTCACCCTAGATGTGTTTTCTTTATAGGATT
CTGCAACCACCAAAATGAGAAGATTCTTGTATACGAGTACATGTCCAATGGATCTCTAGATAAACACCTACA
AGAAGGTCAACTATCATGGAAGAAGAGGCTAGAGATATGCATAGGAGTAGCACGTGGACTACACTACCTTCA
CACTGGAGCCAAGCGTTCCATCTTTCACTGTATCCTCGGTCCG

> Sutagao/1-403 pb

CGGACCGAATAAGCCACCAACAACCTTTGATCAGAAGAGAGTAATAGGAAGTGGATTATTTAGTGAAGTATAC
AAAGGGTGTCTGCAGCATGATGGTGCTTCTGATTACACGGTCGCAATAAAGCGATTTGATTATCAAGGATGG
GAAGCGTTCAACAAGGAAATCGAATTGCTATGCCAGCTTCGTCACCCTAGATGTGTTTTCTTTATAGGATTC
AGCAACCACCAAAATGAGAAGATTCTTGTATACGAGTACATAATCCAATGGATCTCTAGATAAACACCTACA

AGAAGGTGAACTATCATGGAAGAAGAGGCTAGAGATATGCATAGGAGTAGCACGTGGACTACACTACCTTCA
CACCGGAGCCAAGCGTTCCATCTTTCACTGTATCCTCGGTCCG

Información suplementaria 1-5: Secuencias consenso de los materiales de frijol común que amplificaron el marcador molecular SAB3 asociado al gen de resistencia *Co-5*. Banda 400 pb.

> G2333/1-415 pb

TTGGCGCACACATAAGTTCTCACGGATTGTAAGTATATACTGTGGAAGTAGCCTTTTTCTAAAAACAAAC
ACACCCTTTTATAGAGATTTAATAGAAAAGAATTTTTAAAAACAAAAGGGTACAATTAGTAAAATCAACCTGT
TAAAAATCAAAACAATTTGTTGATTTTACCTAAAAATGGTAGTATGTATGAAAATTGATTTTTCTCAATTAG
AATATACTCAAATTGAAAACATTTCTTATGTAACAAATTTAAAAATATGGTTTTTCAGTATATAAAACATATTAT
AGAAAAATATAAAACATTTCAATATTTTCAATCAATTGATTTAAAAATATAACAAATTGAAAACTGTAAC
TTCTAGAAAACAAAATTTAAAAACAAGTTGAAAACCTTTTTTGATGGTGTGCGCAA

> Serranía/1-400 pb

GCACACATAAGTTCTCACGGATTGTAAGTATATACTGTGGAAGTAGCCTTTTTCTAAAAACAAACACACC
CTTTTATAGAGATTTAATAGAAAAGAATTTTTAAAAACAAAAGGGTACAATTAGTAAAATCAACCTGTTAAAA
ATCAAAACAATTTGTTGATTTTACCTAAAAATGGTAGTATGTATGAAAATTGATTTTTCTCAATTAGAATAT
ACTCAAATTGAAAACATTTCTTATGTAACAAATTTAAAAATATGGTTTTTCAGTATATAAAACATATTATAGAAA
AATATAAAACATTTCAATATTTTCAATCAATTGATTTAAAAATATAACAAATTGAAAACTGTAACCTTTCTA
GAAAACAAAATTTAAAAACAAGTTGAAAACCTTTTTTGATGG

2. Delección en *COK-4* suprime la activación de respuestas tempranas de defensa contra *Colletotrichum lindemuthianum*

2.1 Resumen

En las plantas la inmunidad es el resultado de una red compleja de respuestas de defensa ante un potencial patógeno. En el presente estudio dos cultivares de frijol común, Serranía y Sutagao obtenidos en programas de mejoramiento y a los cuales se les intrograsaron los genes de resistencia a *Colletotrichum lindemuthianum*, *Co-4²* y *Co-5*, fueron sometidos al ataque de la raza 7 del patógeno para evaluar respuestas de defensa tipo estructural y química como inducción de depósitos de calosa y producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en los sitios de penetración del hongo. El uso de la escala de severidad para frijol, la detección histoquímica con azul de anilina y 3,3'tetrahidrocloruro de diaminobencidina (3,3'DAB), permitieron determinar la relación entre la presencia o ausencia de los genes *Co* con cambios en la activación y en el tiempo de respuesta de algunos mecanismos de defensa en presencia del patógeno. Se comprobó que los frijoles resistentes G2333 y Serranía, portadores de los loci *Co-4²* y *Co-5*, acumularon tempranamente mayores deposiciones de calosa y H_2O_2 en los sitios de ataque del hongo durante las etapas de penetración y de establecimiento de la hifa biótropa de *C. lindemuthianum*, mientras que el cultivar Sutagao el cual evidenció una delección en los dominios catalíticos del gen *COK-4* fue susceptible a la raza al suprimir tempranamente la inducción de barreras físicas y químicas favoreciendo el desarrollo de la enfermedad. Esto evidencia que el gen *COK-4* podría estar participando en la detección del microorganismo y en la activación de la PTI durante la interacción con *C. lindemuthianum*.

Palabras claves: Papilas, ROS, *COK-4*, RLKs, PTI

2.2 Introducción

La antracnosis del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus), anamorfo de *Glomerella cingulata* f.sp *phaseoli*, es considerada una enfermedad limitante que puede provocar pérdidas totales en cultivos susceptibles, afectando a su hospedero en todos los estadios de desarrollo en condiciones de bajas temperaturas y elevada humedad relativa (Fontenelle et al., 2017; Padder et al., 2017). Como estrategia de manejo a la antracnosis se realizan prácticas de tratamiento en semillas y estructuras foliares con fungicidas, rotación de cultivos y uso de semillas certificadas. No obstante, uno de los métodos más efectivos para el control de la enfermedad ha sido el uso de cultivares resistentes (Basavaraju et al., 2008; Padder et al., 2017), los cuales han sido obtenidos mediante cruces entre diferenciales de frijol que han mostrado resistencia a razas específicas de *C. lindemuthianum* y frijoles comerciales susceptibles (Pastor-Corrales, 1991; Garzón et al., 2007; Padder et al., 2017). Dicha resistencia a *C. lindemuthianum* es mediada por genes *Co*, los cuales han sido asociados con defensa durante la interacción con el patógeno (Pastor-Corrales, 1991; Rodrigues et al., 2015; Meziadi et al., 2016).

C. lindemuthinum (filo Ascomycota, Clase Sordariomycetes), es un hongo altamente variable con una diversidad genética amplia que ha llevado a especializarse a nivel de razas lo que ha dificultado el mantenimiento de una resistencia durable en cultivares de frijol (Melotto et al., 2000). Este hongo produce conidias en estructuras asexuales llamadas acérvulos y se encuentra en la naturaleza en estado imperfecto, ya que su estado sexual (*Glomerella cingulata* f.sp *phaseoli*), es poco común. Las hifas vegetativas (1-10 μm de diámetro), son septadas, ramificadas, hialinas a marrón pálido, sus conidias (10 μm de longitud), son cilíndricas, hialinas, aseptadas, de extremos obtusos o con una base aguda (Liu et al., 2013), tiene un estilo de vida hemibiotrófo al presentar una transición de fases que corresponden a dos modos de nutrición. La primera fase es conocida como biótropa en la cual el patógeno se establece en las células vivas de la planta a partir de estructuras especializadas como vesículas e hifas primarias (O'Connell et al., 1985; Padder et al., 2017). En la segunda fase llamada necrótropa, el hongo desarrolla hifas secundarias que secretan enzimas hidrolíticas (Pectinasas, endopolygalacturonasas y α -arabinofuranosidasas), capaces de degradar polímeros de las células resultando en la liberación de una amplia variedad de azúcares para el hongo.

Este evento provoca la necrosis, el síntoma característico de la antracnosis (O'Connell et al., 2012; Pereira et al., 2013; Doehlemann, et al., 2013).

Para el proceso infeccioso de *C. lindemuthianum* se requieren condiciones de alta humedad relativa (>70%) y temperaturas entre 18 y 22 °C (Pastor-Corrales y Tu, 1989). En las plantas de frijol común, la germinación de la conidia inicia con el desarrollo de un tubo germinativo que en su extremo formará una estructura ovoide marrón oscura, llamada apresorio, la cual mediante una puntilla de penetración facilitará el ingreso del patógeno al tejido vegetal, esto atravesando la cutícula, la pared celular o a través de estomas (O'Connell et al., 1985; Padder et al., 2017). Una vez dentro de la célula vegetal la invasión es ejecutada por vesículas de infección, hifas primarias e hifas secundarias. Estas últimas se desplazan hacia las células adyacentes de manera intracelular ocasionando la muerte del tejido lo que está asociado con la fase necrotrofa del hongo (Giraldo y Valent, 2013). Sin embargo, a pesar de los diferentes mecanismos de infección de este patógeno, algunas plantas son capaces de activar tempranamente mecanismos de defensa para evitar el daño de sus tejidos, entre éstos el reforzamiento de barreras estructurales por depósitos de calosa y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Basavaraju et al., 2009).

En las plantas la pared celular es la primera barrera de protección contra el estrés biótico y abiótico. Es una estructura rígida compuesta de una red compleja de proteínas (celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina), que le confieren resistencia y mantienen la integridad celular (Malinovsky et al., 2014). Sin embargo, durante la interacción con patógenos, la pared celular puede verse afectada por la acción de enzimas hidrolíticas que son secretadas por los microorganismos en los intentos de penetración (Bellicampi et al., 2014). No obstante, las plantas han desarrollado estrategias para contrarrestar el ataque de los patógenos, siendo una de ellas el reconocimiento de patrones conservados asociados a microorganismos conocido como MAMPS, patrones asociados a patógenos conocidos como PAMPS o patrones asociados a daño, DAMPS. Este sistema de detección es realizado en la planta mediante proteínas transmembranales conocidas como Receptores de Reconocimiento (PRRs), los cuales al detectar dichos patrones inducen cambios a nivel de la membrana como flujo de iones, incrementos en la concentración de Ca^{2+} citosólico, producción de ROS y activación de cascadas de señalización que implica MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), proteínas quinasas

dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), reprogramación transcripcional, síntesis de proteínas inhibitoras de enzimas hidrolíticas y reforzamiento de la pared celular por calosa (Jones y Dangl, 2006; Bellicampi et al., 2014; Herrera-Vásquez et al., 2015; Kadota et al., 2015). Este reforzamiento de la pared celular ha sido observado durante la interacción planta-patógeno, especialmente en los sitios de presión del apresorio (Basavaraju et al., 2009; Voigt y Somerville, 2009), hace parte de una estructura denominada papila, la cual es enriquecida por 1,3 β -glucanos, componente estructural de la calosa (Voigt y Somerville, 2009; Malinovsky et al., 2014). El papel de este polímero en la defensa de las plantas durante las interacciones con patógenos, ha mostrado ser importante en la resistencia a enfermedades, especialmente durante las etapas tempranas de infección (Voigt, 2014). La inhibición y la ausencia de deposición de calosa en los sitios de intento de penetración resultan en una interacción compatible y en el desarrollo de la enfermedad (Ellinger, et al., 2013).

Durante la interacción planta-patógeno otra de las respuestas de defensa es la producción de las ROS, moléculas altamente reactivas capaces de generar daños en la estructura celular, en el ADN y en proteínas (Hung et al., 2005). Entre las ROS el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ha cobrado mayor interés en investigaciones recientes ya que sus niveles celulares en las plantas reflejan cambios ocasionados por estreses de tipo biótico o abiótico (Hung et al., 2005; Saxena et al., 2016). Durante el ataque de patógenos el H_2O_2 puede ser inducido por PAMPs y DAMPs, debido a la activación de RLKs (Receptor-Like-Kinase), ácido fosfatídico y proteínas dependientes de Ca^{2+} . El H_2O_2 se produce inicialmente en el apoplasto por la acción de la enzima NADPH oxidasa, la cual es un donador de electrones que en la membrana plasmática transfiere dichas cargas al oxígeno apoplástico para producir el anión superóxido (O_2^-), que posteriormente es convertido por la enzima superóxido dismutasa (SOD) a H_2O_2 (Herrera-Vásquez et al., 2015; Saxena et al., 2016; Smirnov y Arnaud, 2019). Llevado a cabo estos procesos el H_2O_2 ingresa por medio de acuaporinas al citosol permitiendo la expansión de la señal hacia algunos organelos (mitocondrias, cloroplasto y peroxisomas) para la regulación del cierre estomático y la síntesis de hormonas como ABA (ácido abscísico), ET (etileno) y AS (ácido salicílico) (Doehlemann y Hemetsberger, 2013; Saxena et al., 2016; Smirnov y Arnaud, 2019), no obstante, otras enzimas como la peroxidasa tipo II utilizan como sustrato al H_2O_2 para modificaciones en la pared celular en respuesta a patógenos (Smirnov y Arnaud, 2019). Las elevadas concentraciones de H_2O_2 afectan a los

microorganismos debido a su capacidad tóxica, además, pueden provocar muerte celular programada (DPC) y respuestas de hipersensibilidad (HR) en el tejido vegetal como reacciones de defensa contra potenciales patógenos (Shetty et al., 2008; Doehlemann y Hemetsberger, 2013). No obstante, las células vegetales presentan mecanismos de remoción de ROS mediante la acción de enzimas anti-oxidantes (Catalasa, ascorbato peroxidasa y glutatona peroxidasa), para la regulación de los niveles de las especies reactivas en la célula (Hung et al., 2005; Herrera-Vásquez et al., 2015; Saxena et al., 2016).

Esta interacción planta-patógeno ha sido estudiada en diferentes patosistemas agrícolas de los cuales frijol-*C. lindemuthianum* es objeto de nuestro estudio. Como se mencionó anteriormente la siembra de cultivares hace parte de una de las medidas de manejo más efectivas para el control de la antracnosis debido a la presencia de genes de resistencia *Co* introgresados por diferenciales de frijol (Padder et al., 2017). Entre los diferenciales, el frijol mesoamericano G2333 ha mostrado ser resistente a todas las razas de *C. lindemuthianum* identificadas en Colombia (Riascos, 2001; Rincón, 2007), por lo que ha sido utilizado en los programas de mejoramiento de la Universidad Nacional de Colombia como fuente de resistencia a esta enfermedad. Es así, que los cultivares Sutagao y Serranía pertenecientes al RC₁F₁, obtenidos mediante cruces entre el frijol resistente G2333 y los frijoles comerciales susceptibles Cabrera y Cargamanto, fueron desarrollados para reducir los niveles de incidencia en las regiones en donde se siembra el grano (Garzón et al., 2007). En el presente estudio se evaluó la relación entre la presencia de los loci de resistencia *Co-4*² y *Co-5* introgresados por el diferencial G2333 en los cultivares Sutagao y Serranía, con cambios en la activación de algunos mecanismos de defensa como lo son las acumulaciones de depósitos de calosa y la producción de la especie reactiva, H₂O₂, al ser sometidos a la infección con la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Para ello hojas inoculadas de cada uno de los cultivares y sus parentales fueron procesadas con azul de anilina y con 3,3'tetrahidrocloruro de diaminobencidina (3,3'DAB), para la detección de calosa y H₂O₂, respectivamente. Entre los resultados se pudo determinar que el cultivar Serranía el cual presenta ambos *Co* fue resistente a la raza 7 del patógeno mostrando mayores deposiciones de calosa y producción de H₂O₂ en los sitios de penetración, en contraste con el cultivar Sutagao quien mostró evidenciar una mutación en el alelo *Co-4*² y tuvo una reacción susceptible frente a la raza del hongo.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento de las plantas de frijol

Las semillas de los frijoles parentales G2333, Cabrera y de los cultivares Serranía y Sutagao fueron suministradas por el banco de germoplasma de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, mientras que el frijol Cargamanto fue obtenido de manera comercial. Todas las semillas fueron dispuestas en bandejas de crecimiento, sembradas en suelo estéril y mantenidas en invernadero a una temperatura promedio de 18 °C y una humedad relativa del 71%.

2.3.2 Incremento de la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*

La raza 7 de *C. lindemuthianum*, fue suministrada por el Programa de Frijol del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Para el incremento del inóculo se utilizaron vainas de habichuelas sanas previamente lavadas y cortadas en trozos de 3 cm de longitud aproximadamente, se reservaron en frascos y fueron autoclavadas durante 40 minutos. Posteriormente en cámara de flujo laminar se eliminó el exceso de agua liberado por el material vegetal y se agregó a cada tubo pequeñas porciones de la raza 7 del patógeno crecido en PDA durante dos semanas y que provenía de un cultivo monospórico. Todos los frascos se mantuvieron en incubación a 20°C en condiciones de oscuridad durante 15 días.

2.3.3 Inoculación de la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum* en hojas de frijol común

Las hojas primarias y peciolo de las plantas de frijol común de 15 días de edad de los cultivares Sutagao, Serranía, del diferencial G2333 y de los frijoles comerciales Cabrera y Cargamanto, fueron inoculadas con una suspensión de $1,7 \times 10^6$ conidias/mL de la raza 7 de *C. lindemuthianum* utilizando un pincel estéril. Este proceso se llevó a cabo humedeciendo totalmente el área foliar por haz y envés. Para los controles se siguió el mismo procedimiento descrito, pero el inóculo fue reemplazado con agua destilada estéril. Tanto las plantas inoculadas como los controles fueron dispuestos. Al tercer día posterior a la inoculación, el plástico fue retirado y se mantuvieron descubiertas hasta el último tiempo de evaluación.

2.3.4 Evaluación de severidad de la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum* en plantas de frijol inoculadas

La evaluación de la severidad se llevó a cabo con diez plantas de los cultivares Sutagao y Serranía y de los parentales G2333, Cabrera y Cargamanto. Cada 24 horas a partir de la inoculación se realizó seguimiento del desarrollo de síntomas de antracnosis en las hojas primarias y peciolo inoculados durante 9 días. La severidad de la enfermedad fue evaluada al noveno día posterior a la inoculación (dpi) aplicando la escala propuesta por Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987) (Tabla 2-1).

Tabla 2-1: Descripción y categoría de los valores de severidad en hojas de frijol común infectadas con *Colletotrichum lindemuthianum*.

Calificación	Categoría	Descripción
1	Resistente	No hay desarrollo de síntomas visibles de la enfermedad en las estructuras de la planta.
2	Resistente	Lesiones necróticas diminutas en el envés de la hoja, evidentes en nervaduras terciarias, sin presencia en nervadura primaria, en haz, en peciolo y en tallo. Menos del 1% del área foliar es afectada por los síntomas de antracnosis*.
3	Resistente	Presencia de muy pocas y pequeñas lesiones, generalmente en la vena primaria del envés de la hoja, las cuales cubren aproximadamente el 1% del área foliar.
5	Intermedio	Presencia de varias lesiones pequeñas en el peciolo o en las venas primarias y secundarias del envés de las hojas.
6	Intermedio	Desarrollo de lesiones necróticas de tamaño mediano (más de 2 mm de longitud) en peciolo, en venas primarias y secundarias del envés y ocasionalmente en el haz de las hojas*.
7	Susceptible	Presencia de numerosas lesiones necróticas grandes en el envés de la hoja siendo además observables en haz y en peciolo.
9	Susceptible	Necrosis severa en el 25% o más del tejido de la planta, observándose lesiones en hojas, peciolo, tallo, ramas e

incluso en puntos de crecimiento. Estas lesiones causan frecuentemente la muerte en gran parte de los tejidos en la planta.

*La descripción de los valores 2 y 6 de la escala de severidad presentados en esta tabla fueron adicionados teniendo en cuenta lo planteado por Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987), ya que los autores solo describen los números impares de la escala.

2.3.5 Detección de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en hojas frijol común inoculadas con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*

Para evaluar las acumulaciones de H₂O₂ en los cultivares de frijol común Serranía y Sutagao y en sus parentales G2333, Cabrera y Cargamanto, se tomaron muestras de hojas primarias inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum* y de los controles a las 6, 16 y 24 horas posteriores de la inoculación (hpi), como a los 3, 5 y 7 dpi. Las hojas muestreadas fueron sumergidas en una solución de 3,3' tetrahidrocloruro de diaminobencidina (3'3 DAB, 1 mg/mL) e infiltradas con una bomba de vacío durante 30 min. Luego fueron incubadas a temperatura ambiente en agitación y oscuridad durante toda la noche. Transcurrido el tiempo, se eliminó la solución de 3'3 DAB y se procedió a decolorar en baño maría a 65 °C utilizando etanol concentrado durante dos horas. El etanol fue remplazando cada vez que la solución se tornaba a un color verde intenso. Posteriormente las hojas fueron mantenidas en etanol al 70% a 4 °C hasta su observación.

Para detectar las acumulaciones de H₂O₂ se realizaron cortes con cuchilla de bisturí de la lámina foliar desde la vena central hasta la margen de la hoja. Dicho corte fue de 2 mm de ancho y entre 10 a 15 mm de longitud. A estas tiras se les agregó azul de lactofenol para facilitar la visualización del patógeno. Las observaciones se llevaron a cabo realizando un barrido del tejido vegetal con un microscopio compuesto a 40x, tanto en la cara abaxial como en la adaxial de las hojas de frijol. Las fotografías fueron tomadas con la cámara ToupTek Photonics (UCMOS14000KPA, China) y calibradas con el programa ImageJ.

2.3.6 Detección de depósitos de calosa en hojas frijol común inoculadas con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*

Para la detección de depósitos de calosa en las hojas primarias de los cultivares del frijol común Serranía y Sutagao y de sus parentales G2333, Cabrera y Cargamanto, se tomaron muestras de hojas a los 3, 5 y 7 días posteriores a la inoculación (dpi). Se preparó una solución de lactofenol alcohólico en un v/v 1:1:1:1:8 de fenol: glicerol: ácido láctico: agua y etanol absoluto, para aclarar el tejido vegetal (Danies et al., 2014). Las hojas inoculadas y los controles fueron inicialmente decoloradas con la solución a una temperatura de 70 °C en baño maría durante 15 min. Una vez aclarado el tejido vegetal se cambió la solución por una nueva y se precalentó durante 5 min más. Posteriormente, se realizó una infiltración por 30 min usando una bomba de vacío. Llevado a cabo este paso las hojas en lactofenol alcohólico fueron incubadas durante 24 horas en baño maría a 70 °C remplazando la solución cuando se tornaba a color verde intenso. Cumplido el tiempo de incubación, se cambió el lactofenol dos o tres veces más hasta que la solución no tiñera y las hojas se vieran transparentes. Finalmente cada muestra fue lavada con etanol al 50% y con agua destilada.

Finalizado el procedimiento de aclarado, las hojas fueron sumergidas e incubadas por 2 horas en una solución de 150 mM de fosfato de potasio (K_2HPO_4), pH= 9,5 y azul de anilina al 0,01% (Danies et al., 2014). Las muestras fueran cubiertas con papel de aluminio para protegerlas de la luz. Luego se propició infiltración usando una bomba de vacío durante 30 min y se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad y agitación moderada.

Para detectar los depósitos de calosa cada hoja fue fijada en glicerol al 50 % con el envés hacia arriba y observados en un microscopio de epifluorescencia con filtro UV (BP 360-370 nm de excitación y BA 420 nm de emisión). Los campos ópticos capturados fueron en promedio 30 y se seleccionaron al azar. El área total del campo a 10X (1,8 mm²), fue determinado con el software ImageJ. Los puntos de observación se centraron en nervadura principal y en la lámina foliar. Los depósitos de calosa fueron contados usando el software DotCount v1.2 (<http://reuter.mit.edu/software/dotcount/>) bajo un umbral de intensidad de 128, un tamaño mínimo de puntos de 1 y un máximo de 250 (Rodrigues et al., 2015). Cada valor de cuantificación de calosa en las hojas inoculadas y en los controles fue verificado añadiendo o eliminando puntos manualmente. Para este

ensayo se tomaron dos réplicas técnicas de hojas primarias inoculadas y no inoculadas por cada tiempo de evaluación (3, 5 y 7 dpi). Este ensayo se repitió dos veces.

Las variaciones entre el número de deposiciones de calosa en las muestras de frijol común ($n = 30$), inoculadas y controles de los tiempos 3, 5 y 7 dpi, fueron determinadas mediante el software Origin Trial 2019b (OriginLab Corporation), procesados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba Tukey ($P < 0,05$) para encontrar diferencias significativas.

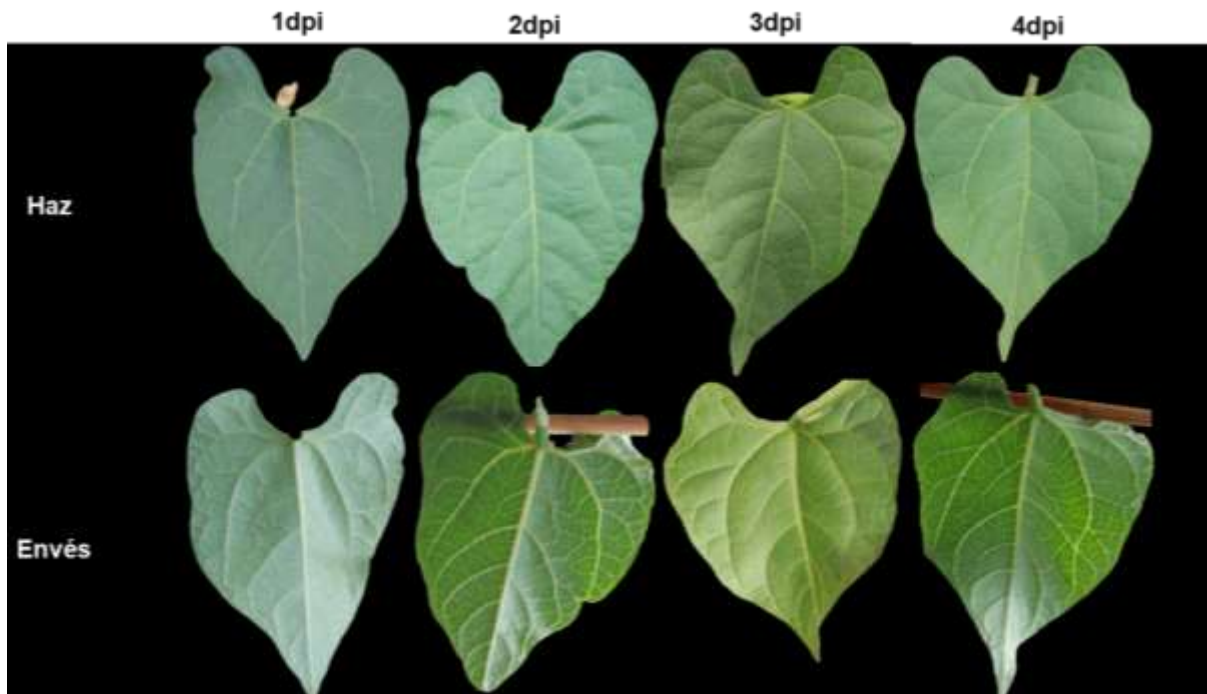
2.4 Resultados

2.4.1 El cultivar Sutagao es susceptible a la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthinum*

Con el objetivo de evaluar la severidad de los síntomas de antracnosis en los cultivares Sutagao y Serranía y en sus parentales G2333, Cabrera y Cargamanto, las hojas primarias inoculadas de cada uno de los materiales de frijol fueron observadas cada 24 horas durante nueve días. La evaluación realizada a los 9 dpi con la escala propuesta por Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987), indicó que el diferencial G2333 y el cultivar Serranía fueron resistentes a la raza 7 de *C. lindemuthinum* ya que obtuvieron valores de 1 y 2, respectivamente (Figura 2-1 y 2-4), los cuales de acuerdo a la escala, los valores entre 1 a 3 indica resistencia, 4 a 6 intermedio y de 7 a 9, susceptibilidad. Los parentales comerciales Cabrera y Cargamanto presentaron valores de 7 y 6 cada uno (Figura 2-2 y 2-3), mientras que el cultivar Sutagao obtuvo valores de 9 en la escala, ya que evidenció desarrollo de lesiones necróticas severas tanto en hojas, peciolo como en puntos de crecimiento, llevando a la muerte del individuo (Figura 2-5).

La aparición de síntomas inició con minúsculas lesiones necróticas entre el quinto y sexto día posterior a la inoculación, las cuales fueron más evidentes a los 7 dpi. Estas lesiones de aspecto necrótico, fueron chancros cóncavos y alargados en las venas de las hojas, en peciolo y en tallo. Inicialmente aparecen en las nervaduras del envés, incrementándose en número y en tamaño de acuerdo a la susceptibilidad de la planta. Posteriormente, las lesiones avanzan hacia el peciolo y finalmente a los tallos, siendo visibles también en el haz de las hojas (Figura 2-2). A los 9 dpi las lesiones constriñen el peciolo y el tallo, ocasionando la muerte del individuo (Figura suplementaria 2-1). Las hojas pueden llegar a tomar un aspecto quebradizo en los casos más severos de la

enfermedad. No obstante, el desarrollo de antracnosis no fue igual en todos los materiales de frijol evaluados. Los resultados evidenciaron que los cultivares Serranía y Sutagao siendo materiales mejorados no responden de manera similar ante el ataque de la raza 7 de *C. lindemuthianum*, ya que el cultivar Serranía mostró pocos síntomas (Figura 2-4), siendo semejante a su parental G2333 (Figura 2-1). En contraste, el cultivar Sutagao fue notoriamente susceptible a la raza 7 del patógeno (Figura 2-5), inclusive con mayor desarrollo de lesiones necróticas que su parental comercial Cabrera (Figura 2-4).



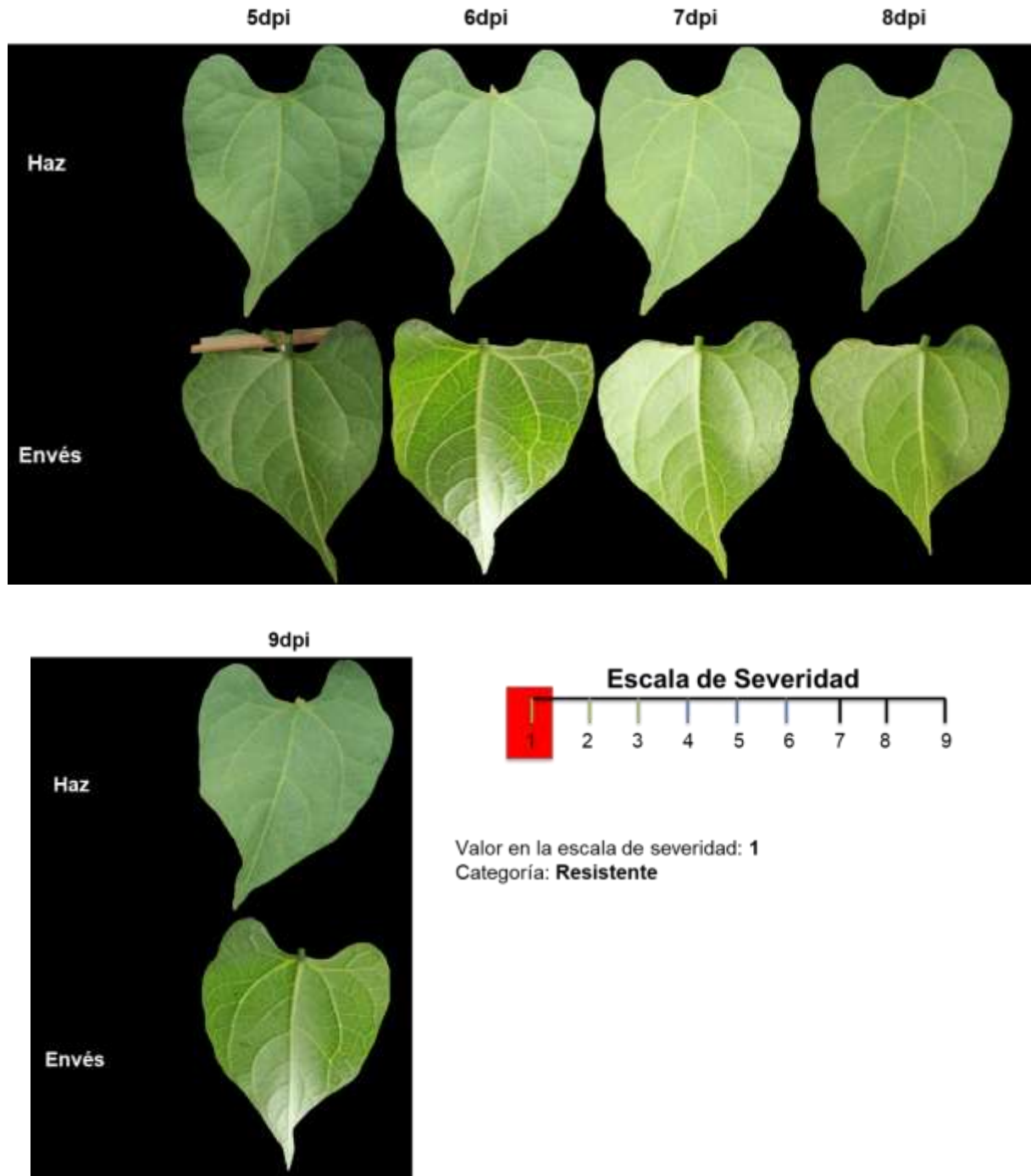
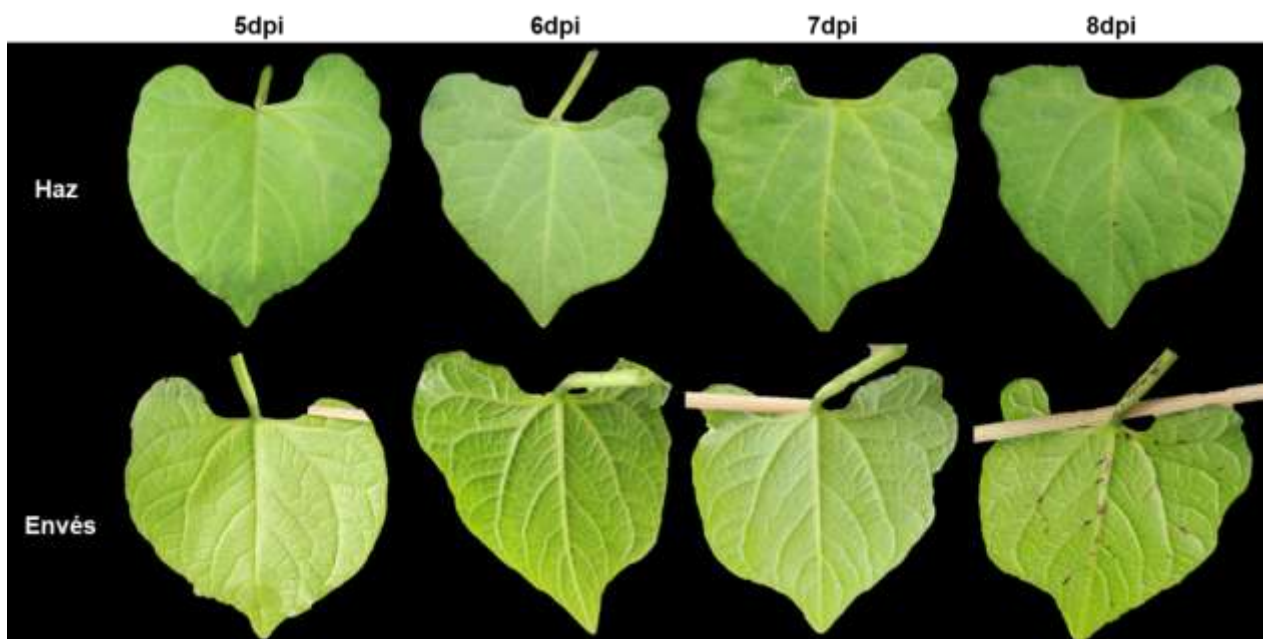
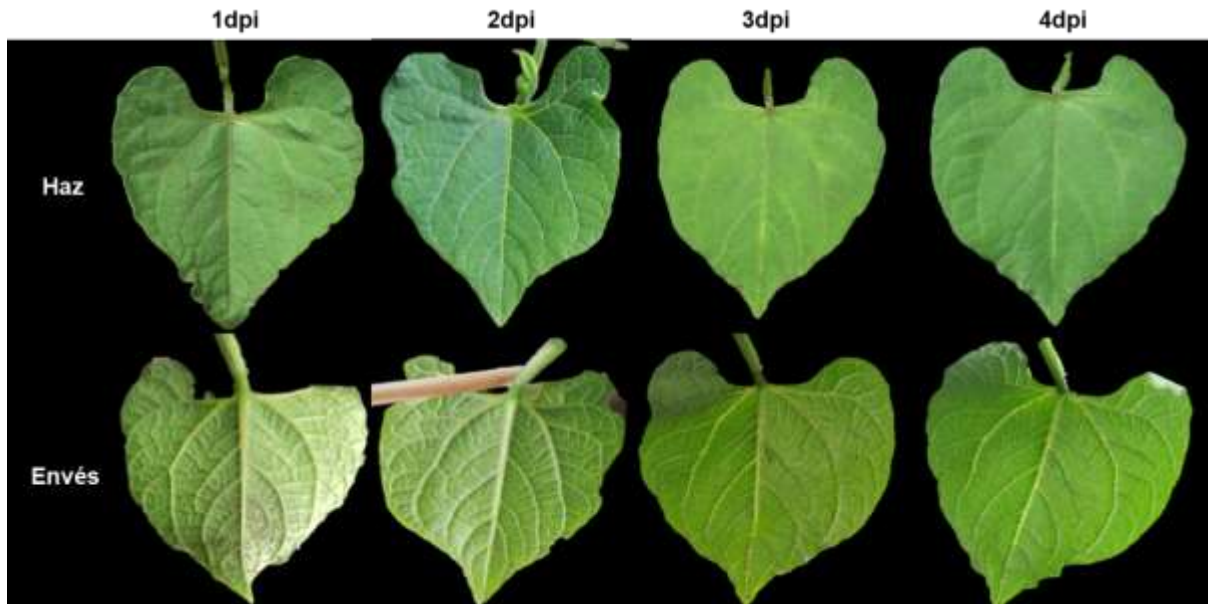


Figura 2-1: Evaluación de desarrollo de síntomas de antracnosis en hojas primarias del diferencial G2333 previamente inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Las imágenes superiores corresponden a la cara adaxial de la hoja de frijol y las inferiores muestran la cara abaxial. Evaluación realizada durante nueve días posteriores a la inoculación (dpi). Los valores en la escala de severidad son asignados de acuerdo a Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987).



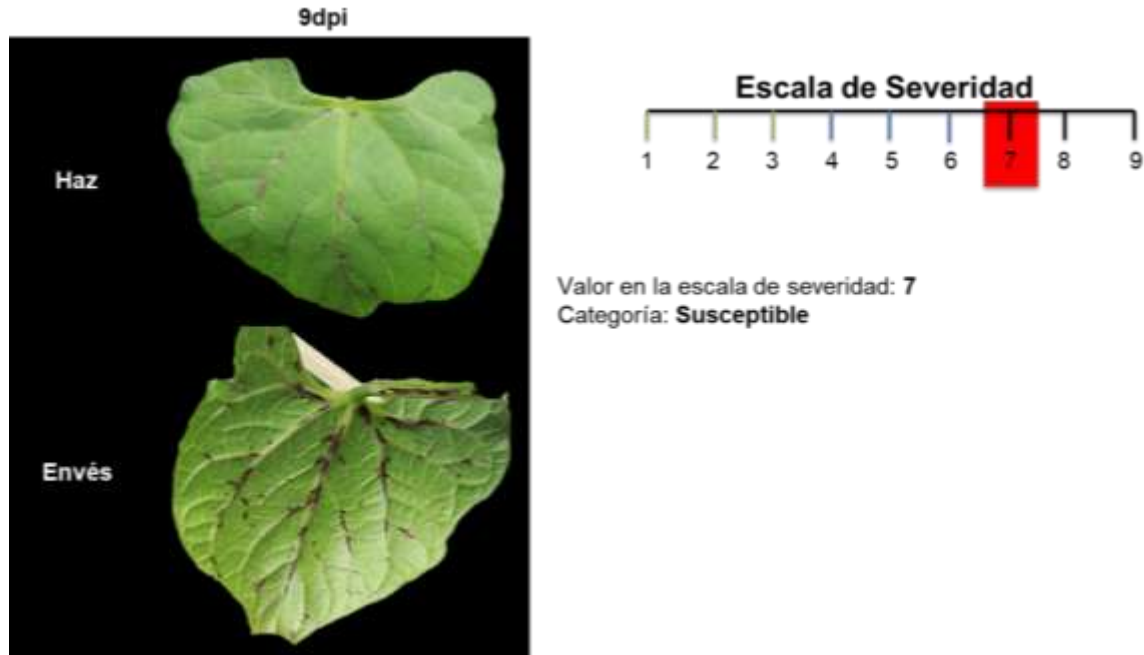
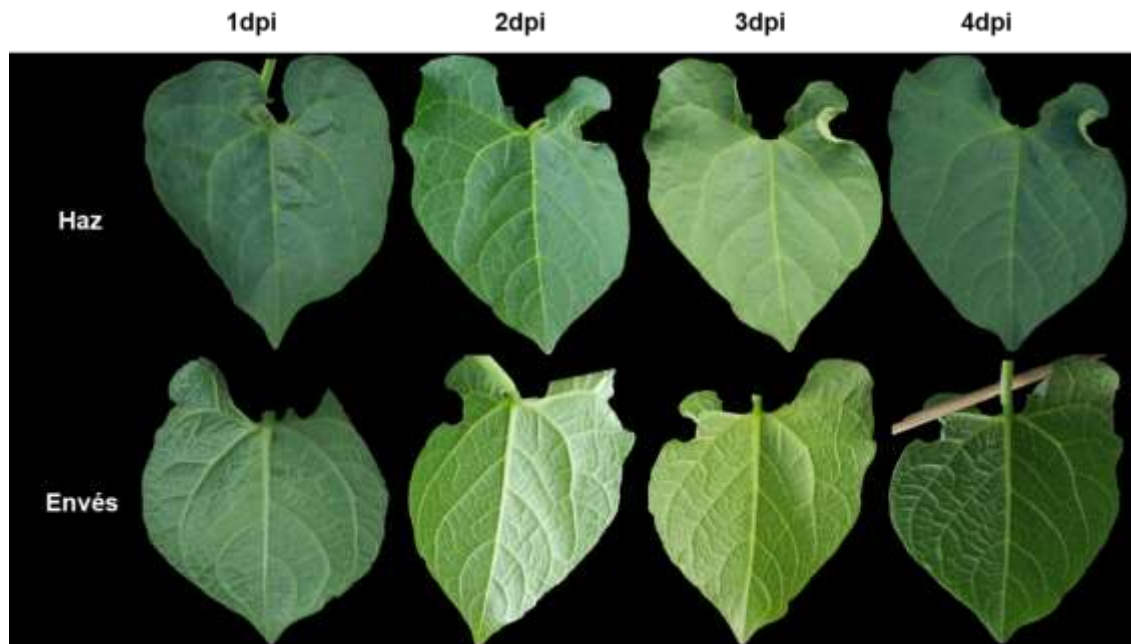


Figura 2-2: Evaluación de desarrollo de síntomas de antracnosis en hojas primarias del parental comercial Cabrera previamente inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Las imágenes superiores corresponden a la cara adaxial de la hoja de frijol y las inferiores muestran la cara abaxial. Evaluación realizada durante nueve días posteriores a la inoculación (dpi). Los valores en la escala de severidad son asignados de acuerdo a Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987).



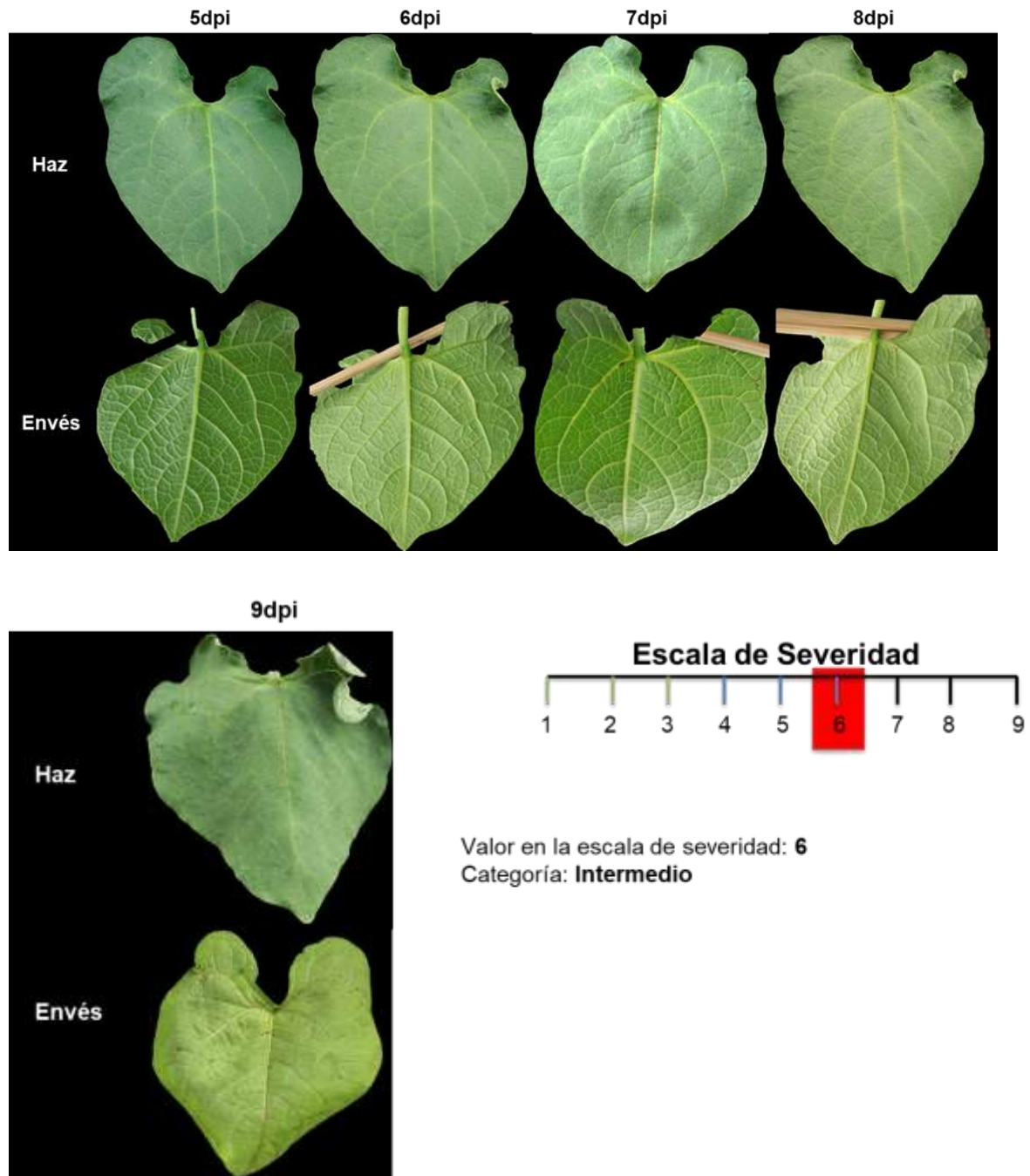
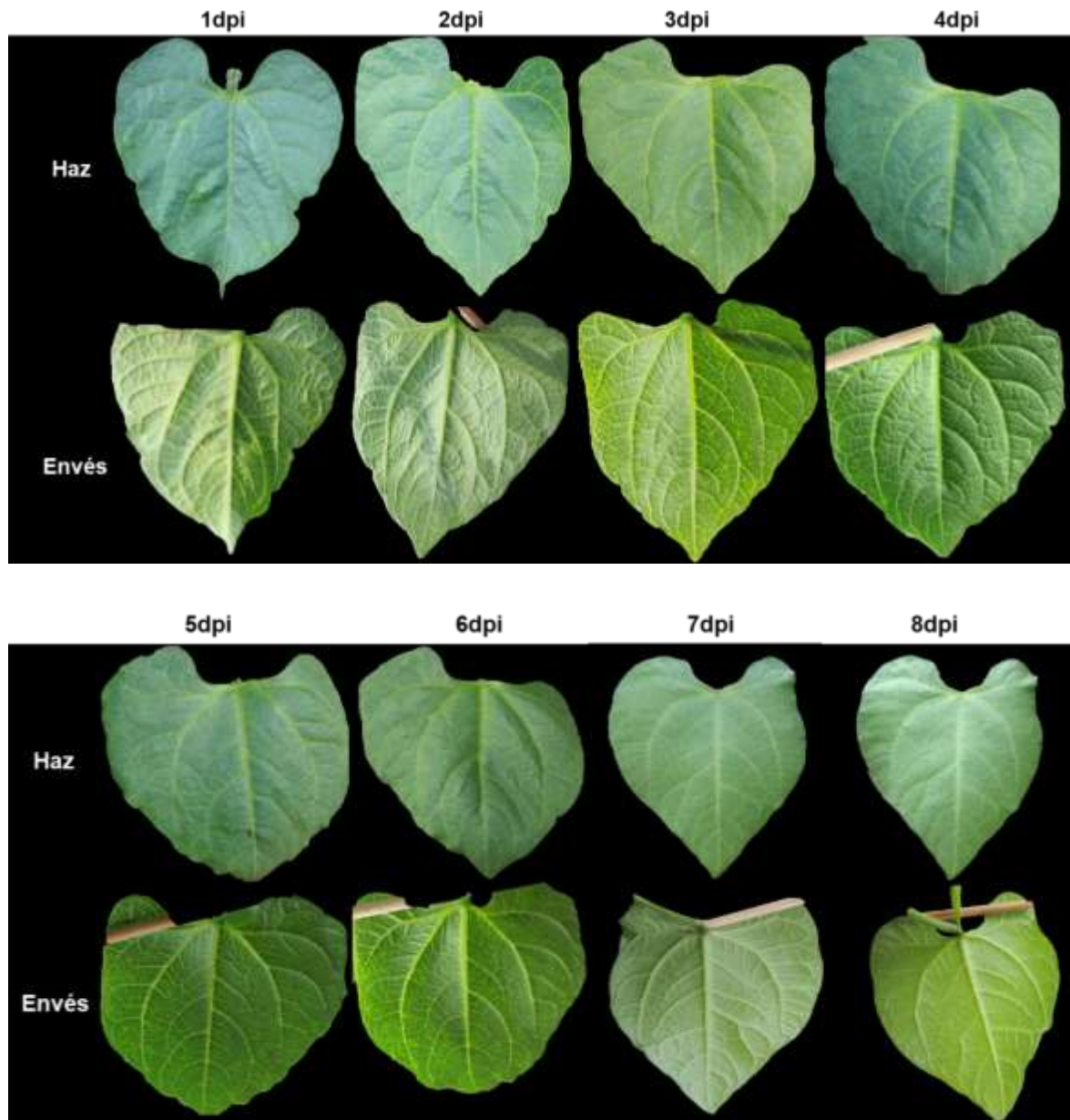


Figura 2-3: Evaluación de desarrollo de síntomas de antracnosis en hojas primarias del parental comercial Cargamanto previamente inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Las imágenes superiores corresponden a la cara adaxial de la hoja de frijol y las inferiores muestran la cara abaxial. Evaluación realizada durante nueve días posteriores a la inoculación (dpi). Los valores en la escala de severidad son asignados de acuerdo a Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987).



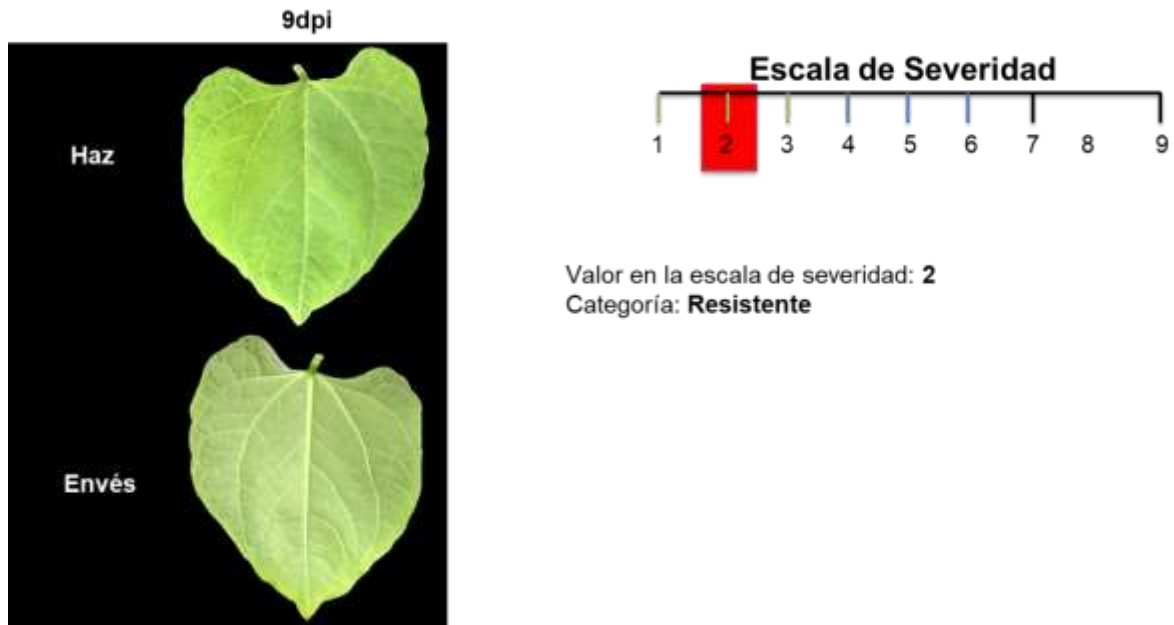
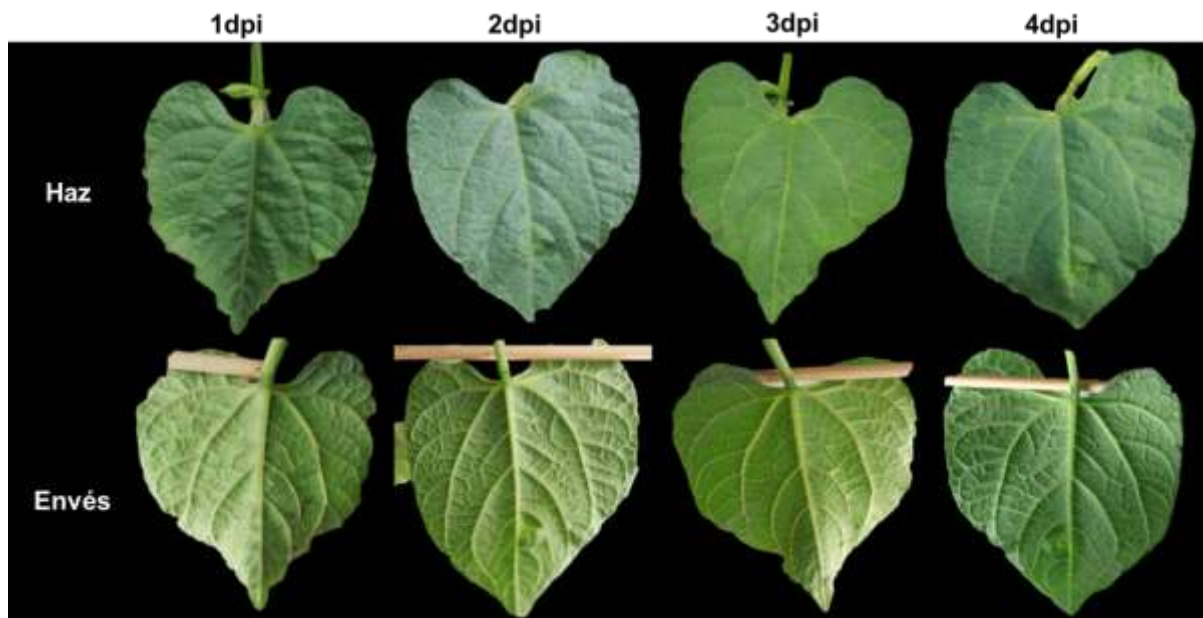


Figura 2-4: Evaluación de desarrollo de síntomas de antracnosis en hojas primarias del cultivar Serranía previamente inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Las imágenes superiores corresponden a la cara adaxial de la hoja de frijol y las inferiores muestran la cara abaxial. Evaluación realizada durante nueve días posteriores a la inoculación (dpi). Los valores en la escala de severidad son asignados de acuerdo a Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987).



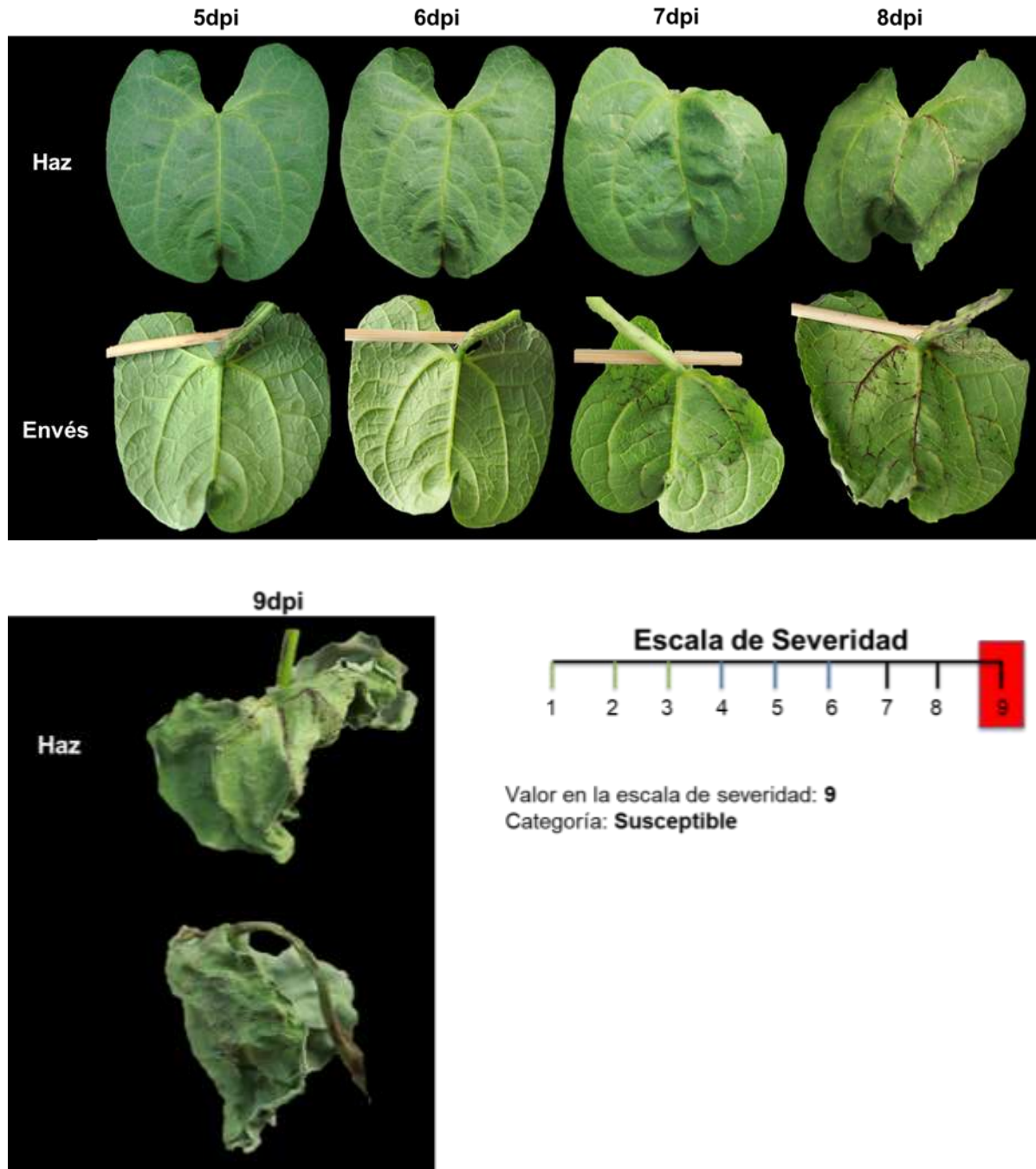


Figura 2-5: Evaluación de desarrollo de síntomas de antracnosis en hojas primarias del cultivar Sutagao previamente inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Las imágenes superiores corresponden a la cara adaxial de la hoja de frijol y las inferiores muestran la cara abaxial. Evaluación realizada durante nueve días posteriores a la inoculación (dpi). Los valores en la escala de severidad son asignados de acuerdo a Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987).

2.4.2 Relación entre el proceso de infección de *Colletotrichum lindemuthianum* y la acumulación de H₂O₂ en *Phaseolus vulgaris* L.

Los ensayos histoquímicos para la detección de H₂O₂ en hojas primarias inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum*, de los frijoles parentales G2333, Cabrera y Cargamanto y de los cultivares Serranía y Sutagao, procesados con 3,3' DAB permitieron visualizar el proceso de infección del patógeno.

2.4.2.1 Proceso de infección de *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol común

De acuerdo a las observaciones realizadas en hojas inoculadas con la raza 7 del patógeno, se pudo comprobar que las conidias de *C. lindemuthianum* pueden llegar a germinar antes de las 6 hpi, dependiendo de la variedad de frijol común. Estas estructuras presentaron una longitud de 10 µm, siendo cilíndricas, hialinas y sin septos. Estas conidias generaron tubos germinativos largos y cortos los cuales se originaron tanto de los extremos como de su parte media (Figura 2-6a, b y d).

Se detectó que *C. lindemuthianum* busca ingresar por tricomas, glándulas foliares, cutícula y a través de estomas, los cuales estaban presentes tanto en el haz como en el envés de las hojas del frijol común. El apresorio se evidenció como una estructura globosa que ejerce presión sobre la pared de la célula vegetal, formándose sobre el extremo distal del tubo germinativo. Sus paredes fueron gruesas respecto al tubo germinativo e inicialmente de apariencia hialina, hecho evidente por la tinción con azul de lactofenol (Figura 2-6c). A partir de las 16 hpi el aspecto del apresorio cambió a color marrón provocado por el oscurecimiento de sus paredes en un proceso denominado melanización (Figura 2-6d). Luego el apresorio evidenció una puntilla justo en el sitio en donde ejerce la presión sobre el tejido (Figura 2-6e). Durante este evento la morfología del apresorio cambió de una esfera completa a una de base plana, evidencia de la fuerza mecánica y del inicio de los sucesos de penetración. Este proceso fue similar tanto en las plantas resistentes como en las susceptibles (Figura 2-6f).

A partir de las 24 hpi en variedades susceptibles se observó la presencia de vesículas de infección al interior de la célula vegetal, las cuales fueron de apariencia globosa, hialinas y de membranas delgadas (Figura 2-6g). De esta estructura, se originó una hifa primaria de membranas delgadas, ubicándose de manera próxima a la pared celular y separada

de la vesícula de infección por un septo (Figura 2-6h). Estas estructuras infectivas indicaron que el patógeno se encontraba en una fase biótrofa.

A los 3 dpi (72 hpi) fue más evidente el desarrollo de vesículas de infección e hifas primarias en los frijoles susceptibles, aunque en los resistentes durante este tiempo hubo evidencia de dichas estructuras pero en menor proporción.

A los 5 dpi (120 hpi) en frijoles susceptibles, la célula infectada evidenció el desarrollo de hifas secundarias, sin invasión intracelular. Estas fueron notablemente abundantes ya que se caracterizaron por ser ramificadas, irregulares, hialinas y de membranas delgadas (Figura 2-6i). La presencia de dicha estructura reveló el inicio de la fase necrótropa del patógeno, ya que los síntomas de antracnosis a los 5 dpi fueron poco perceptibles en las hojas inoculadas.

A los 7 dpi (168 hpi) en los frijoles susceptibles se produjo un incremento súbito de lesiones necróticas. Dichas lesiones al ser observadas al microscopio evidenciaron invasión intracelular (Figura 2-6j). Unas pocas conidias de *C. lindemuthinum* fueron capaces de destruir grandes áreas del tejido vegetal, especialmente en las venas, evidenciando hifas secundarias que se propagaron rápidamente a través de las nervaduras hasta generar hifas vegetativas de aspecto hialino, delgado y septado, llegando a cubrir grandes extensiones del tejido por invasión intracelular (Figura 2-6k). Esto evidenció la fase necrótropa tardía del hongo, ya que se relacionó con el incremento súbito de los síntomas de antracnosis en las hojas de las plantas susceptibles. En este tiempo, fue notorio la emersión de hifas especialmente por los estomas y por las glándulas foliares en los frijoles que mostraron el desarrollo de la enfermedad.

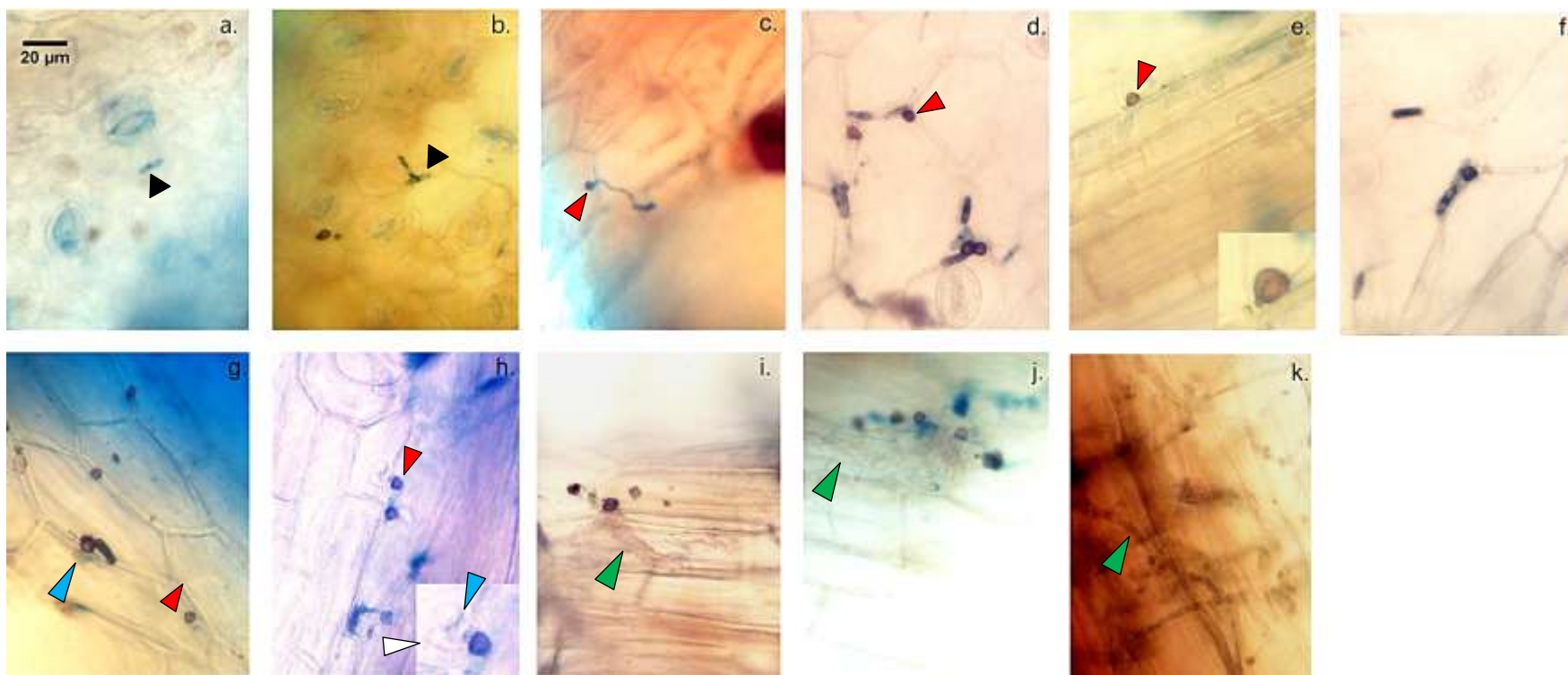


Figura 2-6: Proceso de infección de *Colletotrichum lindemuthianum* en materiales de frijol común inoculados con la raza 7 del patógeno. **a.** Conidia (6 hpi); **b.** conidia y tubo germinativo (6 hpi); **c.** apresorio no melanizado (16 hpi); **d.** conidias y apresorios melanizados (16 hpi); **e.** apresorio con puntilla de penetración visible (recuadro) (16 hpi); **f.** presión del apresorio en el sitio de intento de penetración (16 hpi); **g.** y **h.** desarrollo de la vesícula infectiva e hifas primarias (24 hpi y 3 dpi), nótese el septo de división (recuadro en h.); **i-j.** desarrollo de hifas secundarias (i, 5 dpi; 7 dpi); **k.** invasión intracelular en tejido necrosado (7 dpi). Las puntas sólidas señalan: negras, conidias; rojas, apresorios; azules, vesículas de infección; blancas, hifas primarias; verdes, hifas secundarias e invasión intracelular en regiones con lesiones necróticas. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio compuesto bajo un aumento de 40X.

2.4.2.2 El H₂O₂ se acumula debajo de las estructuras de *Colletotrichum lindemuthianum* como una reacción temprana de defensa vegetal

C. lindemuthianum desarrolló estructuras especializadas en su proceso de infección desde la pre-penetración hasta la fase necrotrófica. Para evaluar la generación de respuestas de defensa en los diferentes genotipos de frijol al ataque y la invasión del patógeno, se quiso detectar mediante 3,3'-DAB la acumulación de moléculas altamente reactivas (peróxido de hidrógeno, H₂O₂) vinculadas en inmunidad vegetal. A continuación se presenta una descripción de los hallazgos (figuras 2-7 a 2-11).

– 24 horas posteriores a la inoculación

La 3,3'-DAB reveló que el H₂O₂ se acumula tempranamente en el parental mesoamericano G2333 y en el comercial Cargamanto, especialmente en la pared celular formando un halo alrededor del apresorio; mientras que en el cultivar Serranía hubo desplazamiento del núcleo de la célula en el sitio de intento de penetración. A las 6 y 16 hpi no se detectó H₂O₂ en ninguno de los materiales de frijol evaluados, lo cual indica que la inducción de esta molécula no es anterior a estos tiempos.

– 3 días posteriores a la inoculación

Se visualizaron halos de mayor tamaño alrededor del apresorio en el parental G2333 y en el comercial Cargamanto en este tiempo. En el cultivar Serranía el H₂O₂ fue detectado en regiones del apoplasto y en paredes celulares con formación de papilas. Se evidenciaron respuestas de hipersensibilidad (HR) en las células epidermales de la vena principal de G2333, mientras que en la lámina foliar el H₂O₂ se acumuló fuertemente en el apoplasto como una señal que se produjo debajo de los apresorios y que se difundió hacia las células adyacentes. Cabe señalar que en este tiempo, el parental G2333 y el cultivar Serranía evidenciaron conidias y tubos germinativos de aspecto degradado, lo cual podría explicar la poca presencia de apresorios a los 7 dpi.

Los frijoles Cabrera y Sutagao también acumularon H₂O₂ en áreas con reforzamiento de la pared celular y en el apoplasto, pero en menor proporción respecto a los frijoles resistentes. Así mismo, en estos genotipos se evidenció el desarrollo de vesículas de infección sin evidencia de H₂O₂.

– **5 días posteriores a la inoculación**

Los frijoles resistentes G2333 y el cultivar Serranía evidenciaron en este tiempo un mayor número de conidias y tubos germinativos degradados. Algunos de sus apresorios fueron de apariencia rugosa y de menor tamaño en relación a otros. Las áreas foliares que mostraron estructuras degradadas del patógeno no exhibieron H_2O_2 ni cierre estomático, sin embargo, aquellas con procesos de infección viables revelaron acumulaciones de H_2O_2 y cierre estomático, indicando que los eventos de infección no son simultáneos en la hoja y por ende la activación de los mecanismos de defensa son inducidos una vez se da la detección del patógeno en el sitio de intento de penetración.

En el frijol comercial Cargamanto las vesículas de infección estuvieron rodeadas de una fuerte acumulación de H_2O_2 , no siendo así en los frijoles susceptibles Cabrera y Sutagao que evidenciaron desarrollo de hifas primarias y secundarias del patógeno.

– **7 días posteriores a la inoculación**

En este tiempo hubo incrementos en la producción de H_2O_2 en el frijol comercial Cabrera y el cultivar Sutagao, especialmente en las venas de las hojas. La acumulación de H_2O_2 fue notable en regiones con lesiones necróticas que revelaron invasión intracelular del patógeno. En contraste, los frijoles resistentes, G2333 y el cultivar Serranía, redujeron las acumulaciones de H_2O_2 en venas y en apoplasto. Además, se evidenció poca cantidad de apresorios sobre el tejido vegetal, revelando un gran número de ellos con rupturas. No obstante, algunas áreas de los frijoles resistentes manifestaron en el apoplasto acumulaciones de H_2O_2 asociado con la presencia de estructuras viables de infección.

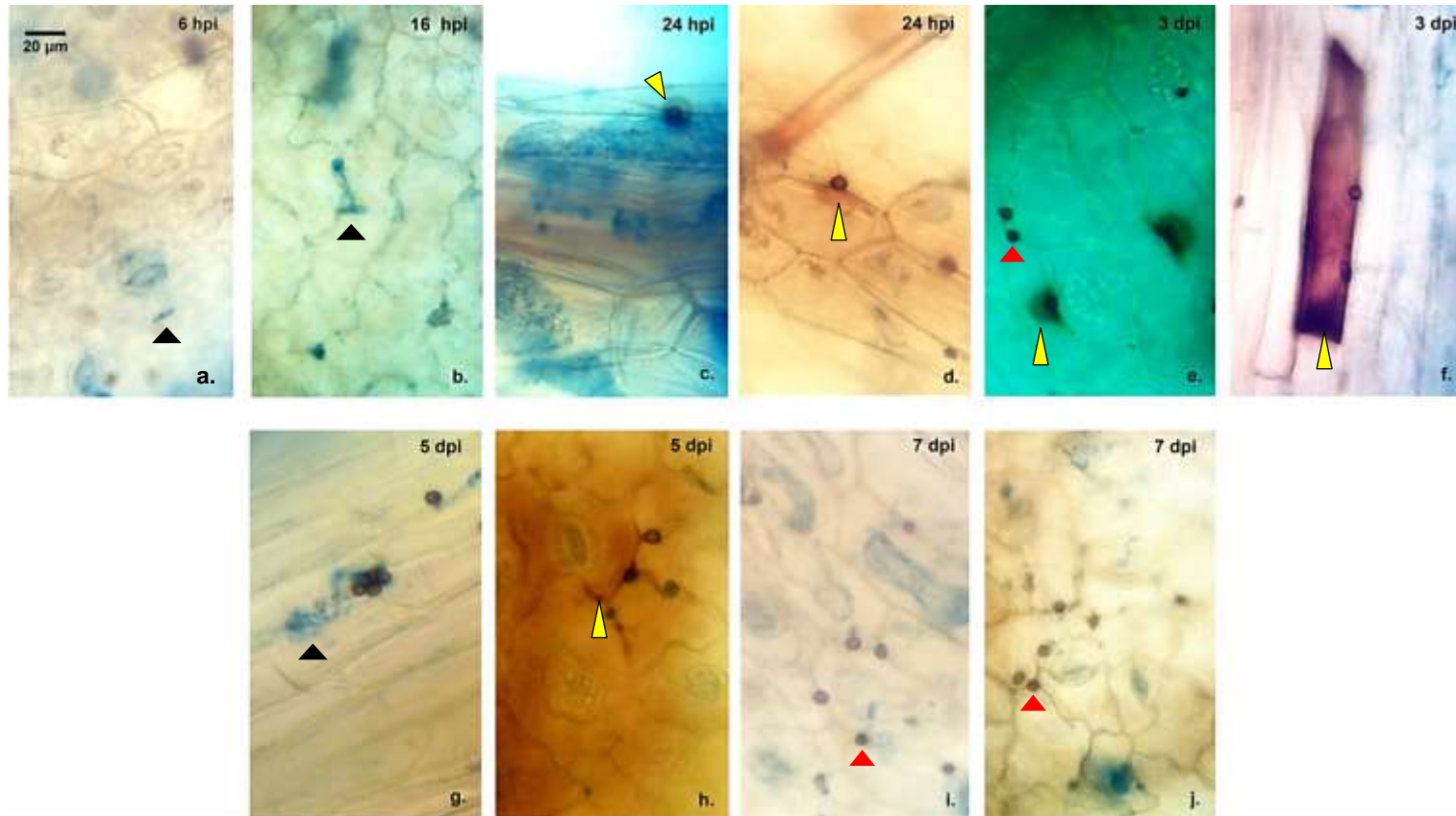


Figura 2-7: Acumulación de H_2O_2 durante la interacción entre el frijol parental resistente G2333 y la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. **a.** Conidia sin germinar; **b.** conidia y apresorio no melanizado; **c, d y e.** producción de H_2O_2 debajo de los sitios de intento de penetración; **f.** respuesta de hipersensibilidad; **g.** degradación de conidias y tubos germinativos; **h.** señal de H_2O_2 en apoplasto y citosol; **i-j.** reducción en la producción de H_2O_2 y en el tamaño de los apresorios. Las puntas sólidas señalan: negras, conidias; rojas, apresorios; amarillas, H_2O_2 . Las imágenes fueron tomadas en microscopio compuesto bajo un aumento de 40X.

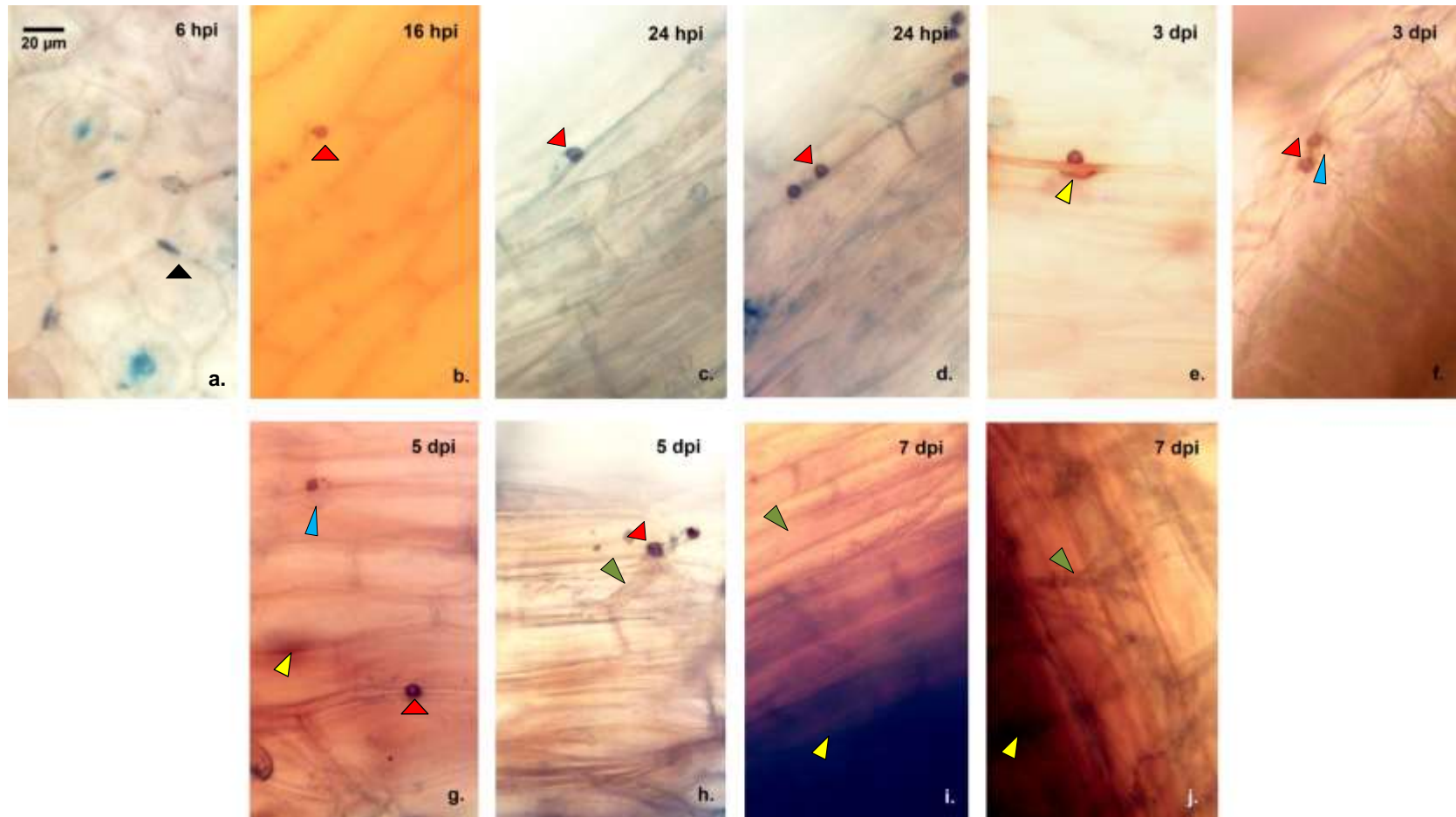


Figura 2-8: Acumulación de H_2O_2 durante la interacción entre el parental de frijol Cabrera y la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. **a.** Conidia; **b.** conidia y apresorio melanizado; **c** y **d.** apresorios en los sitios de intento de penetración; **e.** producción de H_2O_2 en sitios de reforzamiento de la pared celular; **f-g.** desarrollo de la vesícula de infección debajo del apresorio; **h.** desarrollo de HS en célula invadida sin evidencia de producción de H_2O_2 ; **i-j.** invasión intracelular por HS con fuerte acumulación de H_2O_2 . Las puntas sólidas señalan: negras, conidias; rojas, apresorios; amarillas, H_2O_2 ; azules, vesícula de infección; verdes, hifas secundarias (HS) e invasión intracelular. Las imágenes fueron tomadas en microscopio compuesto bajo un aumento de 40X.

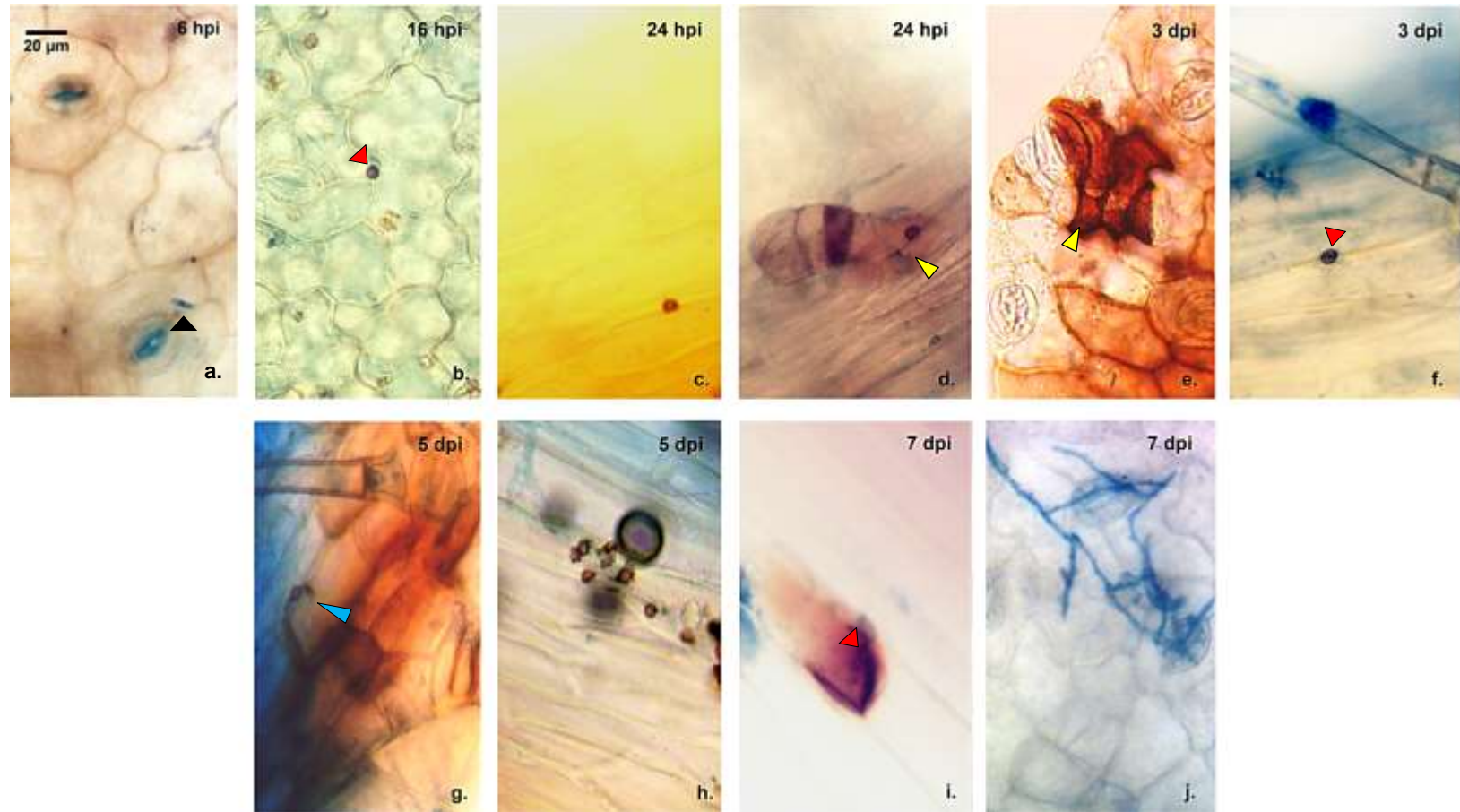


Figura 2-9: Acumulación de H_2O_2 durante la interacción entre el frijol comercial Cargamanto y la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. **a.** Conidias; **b.** apresorio melanizado; **c.** apresorio en el sitio de intento de penetración; **d-e.** producción de H_2O_2 en sitios de intento de penetración; **f.** apresorio sin evidencia de inducción de H_2O_2 ; **g.** producción de H_2O_2 en regiones con vesículas de infección; **h.** reducción en la producción de H_2O_2 , degradación y reducción en el tamaño de apresorios; **i.** señal de H_2O_2 en regiones del apoplasto y citosol; **j.** emersión de hifas por los estomas. Las puntas sólidas señalan: negras, conidias; rojas, apresorios; amarillas, H_2O_2 ; azules, vesículas de infección; verdes, hifas. Las imágenes fueron tomadas en microscopio compuesto bajo un aumento de 40X.

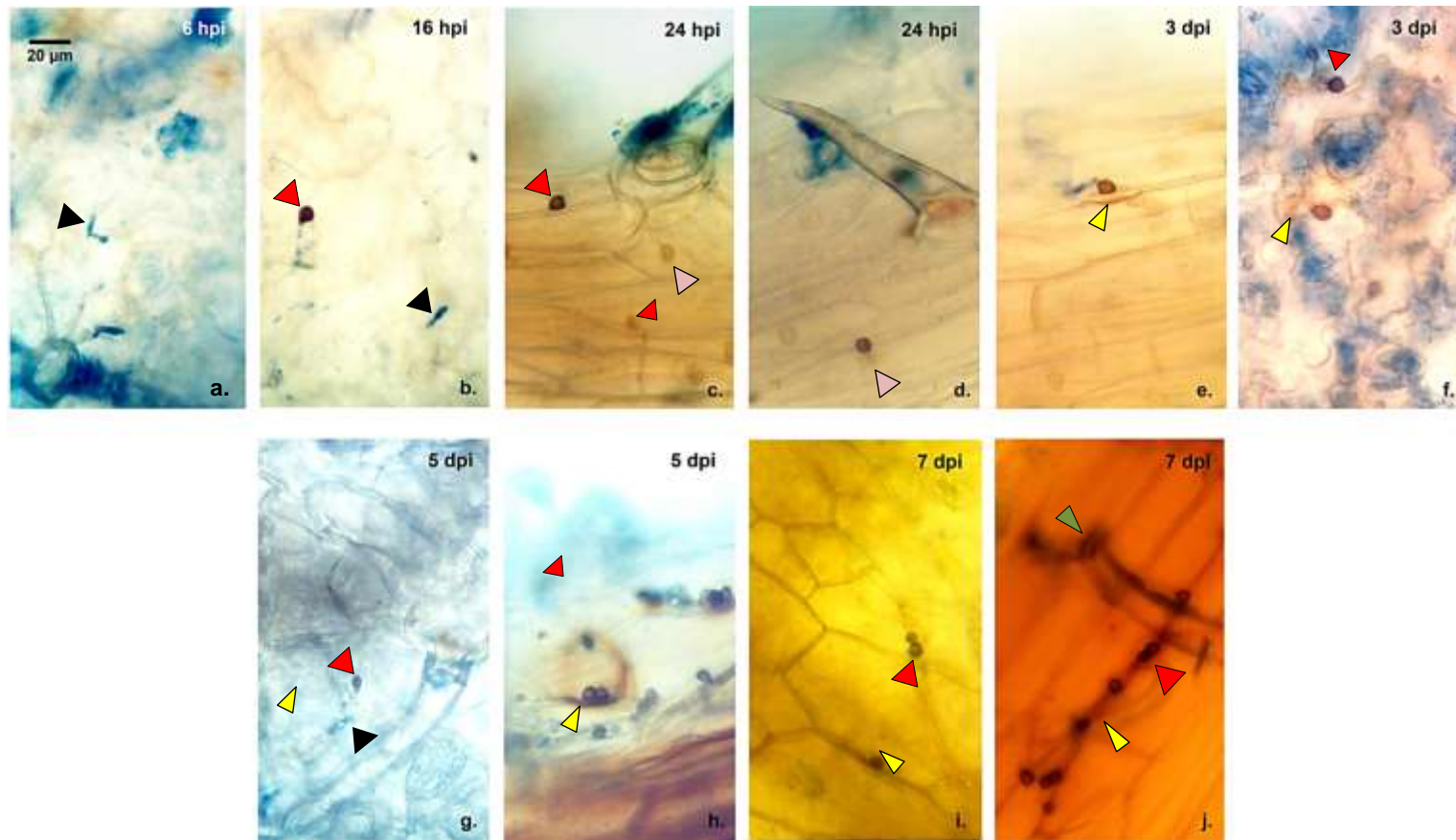


Figura 2-10: Acumulación de H_2O_2 durante la interacción entre el cultivar de frijol Serranía y la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. **a.** Conidia y apesorio no melanizado; **b.** conidia y apesorio melanizado; **c.** apesorio en el sitio de intento de penetración; **d.** movimiento del núcleo celular debajo del apesorio; **e.** producción de H_2O_2 y reforzamiento de la pared celular; **f.** producción de H_2O_2 en regiones del apoplasto; **g.** degradación de conidias y reducción en el tamaño del apesorio; **h.** y **j.** señal de H_2O_2 debajo de apesorios; **i.** reducción en la producción de H_2O_2 y en el tamaño de los apesorios. Las puntas sólidas señalan: negras, conidias; rojas, apesorios; amarillas, H_2O_2 ; rosado, núcleo celular. Las imágenes fueron tomadas en microscopio compuesto bajo un aumento de 40X.

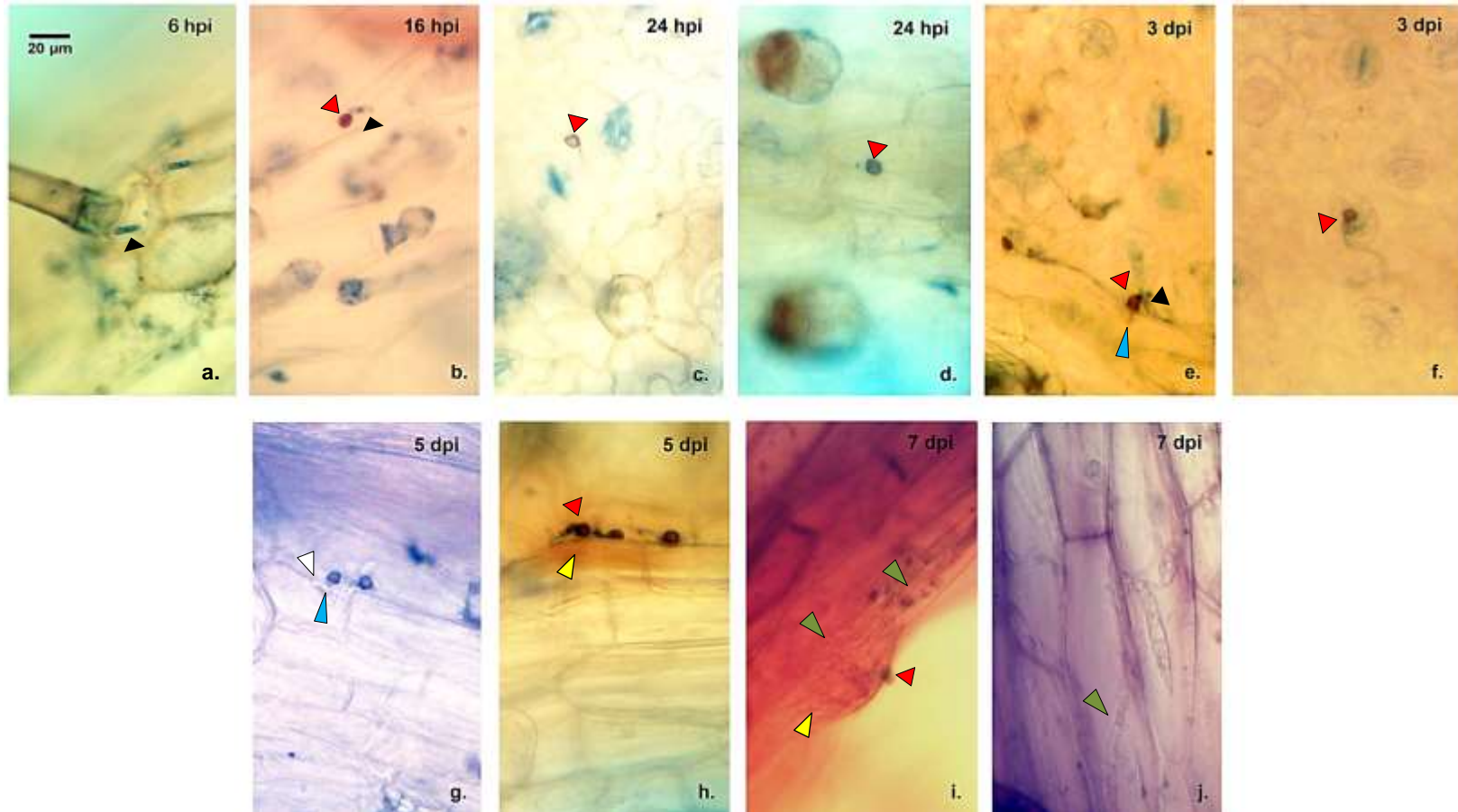


Figura 2-11: Acumulación de H_2O_2 durante la interacción entre el cultivar de frijol Sutagao y la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. **a.** Conidia; **b.** conidia y apresorio melanizado; **c** y **d.** apresorios en los sitios de intento de penetración; **e.** desarrollo de vesícula de infección debajo del apresorio; **f.** ingreso del patógeno por el estoma, sin evidencia de producción de H_2O_2 ; **g.** vesículas de infección e HP; **h.** señal de H_2O_2 debajo de apresorios; **i.** invasión en la célula por HS, fuerte acumulación de H_2O_2 ; **j.** producción de H_2O_2 en regiones con invasión intracelular del patógeno. Las puntas sólidas señalan: negras, conidias; rojas, apresorios; amarillas, H_2O_2 ; azules, vesícula de infección; blancas, hifas primarias (HP); verdes, hifas secundarias (HS) e invasión intracelular. Las imágenes fueron tomadas en microscopio compuesto bajo un aumento de 40X.

2.4.3 La inducción de calosa en el cultivar Sutagao se ve afectada por la mutación en *COK-4* y por la ausencia de *Co-5*

El desarrollo severo de lesiones necróticas en las plantas inoculadas con la raza 7 de *C. lindemuthianum* es indicativo de una interacción compatible (enfermedad) con el patógeno, de modo que, una de las primeras barreras en verse afectada por el ingreso del hongo es la pared celular. Para observar la respuesta de defensa en esta estructura se analizó en los diferentes genotipos de frijol común, la inducción de depósitos de calosa por tinción con azul de anilina y su relación con la presencia o ausencia de los genes de resistencia *Co*. El polímero de calosa fue acumulado debajo de los apresorios, alrededor de las puntillas de penetración y en áreas próximas a las estructuras infectivas, revelando la formación de papilas y reforzamiento de las paredes celulares (Figura 2-12). Además, se evidenciaron acumulaciones en las células guarda de los estomas, en las células anexas de los tricomas y en las glándulas foliares, estructuras en las que se llegaron a encontrar un gran número de conidias y apresorios aglomerados.

De acuerdo a la observación, se determinó que los depósitos de calosa fueron visibles a los 3, 5 y 7 dpi (Figuras 2-14 a 2-16), debido a que los eventos de germinación de las conidias pueden llegar a extenderse hasta 7 dpi. Sin embargo, el promedio del número de depósitos de calosa varió en relación a los tiempos de evaluación y a la resistencia del frijol al patógeno.

A los 3, 5 y 7 dpi el diferencial G2333 reforzó la pared celular por deposición de calosa en los sitios de intento de penetración del patógeno. Dicha respuesta fue significativamente mayor que en los parentales comerciales Cabrera y Cargamanto y que en el cultivar susceptible Sutagao. No obstante, el número de deposiciones evidenciadas en G2333 fue reduciéndose a lo largo del tiempo. El cultivar Serranía también incrementó las deposiciones de calosa a los 3 dpi, sin embargo, a los 5 y 7 dpi disminuyeron no mostrando diferencias significativas con los parentales comerciales y con el cultivar Sutagao (Figura 2-13).

Las deposiciones de calosa estuvieron presentes en todos los materiales de frijol común evaluados, tanto en los resistentes como en los susceptibles demostrando que esta respuesta de defensa es activada una vez se da la detección del patógeno, ya que los resultados revelan incrementos del polímero en comparación con los controles (Figura 2-

13). Sin embargo, el parental Cabrera y el cultivar Sutagao que fueron susceptibles a la raza 7, mostraron menores señales de fluorescencia asociadas a deposiciones de calosa en el primer tiempo de evaluación (Figuras 2-14).

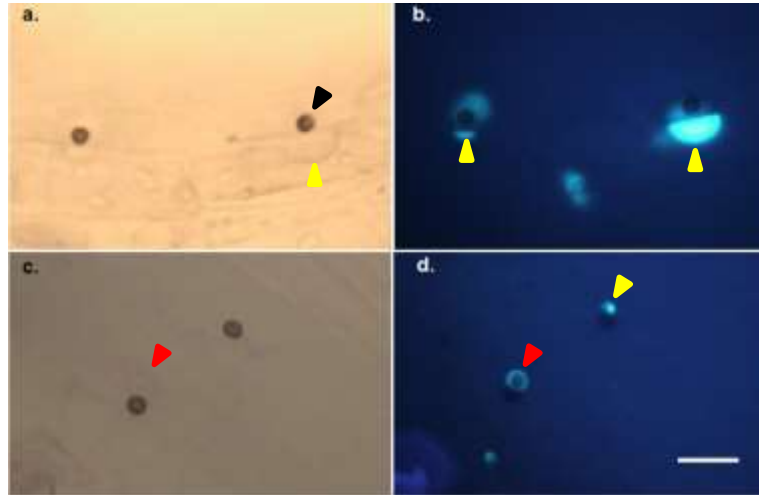


Figura 2-12: Inducción de deposiciones de calosa en *Phaseolus vulgaris* L. durante la interacción con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. **a.** y **b.** Diferencial mesoamericano G2333; **c.** y **d.** cultivar Serranía. La luz fluorescente revela depósitos de calosa debajo de apresorios (b), al alrededor de la vesícula de infección y de la puntilla de penetración (d). Puntas sólidas: amarillas, papilas; rojas, vesícula infectiva; negra, apresorio. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con filtro UV a un aumento de 40x. La escala en todas las imágenes es de 20 μ m.

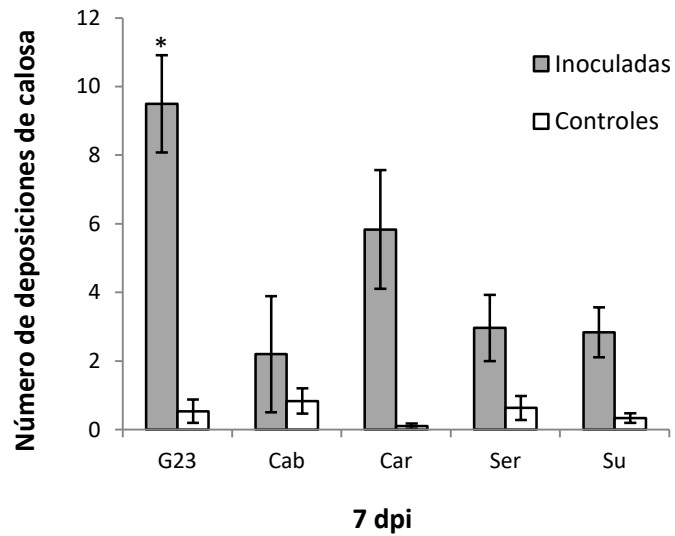
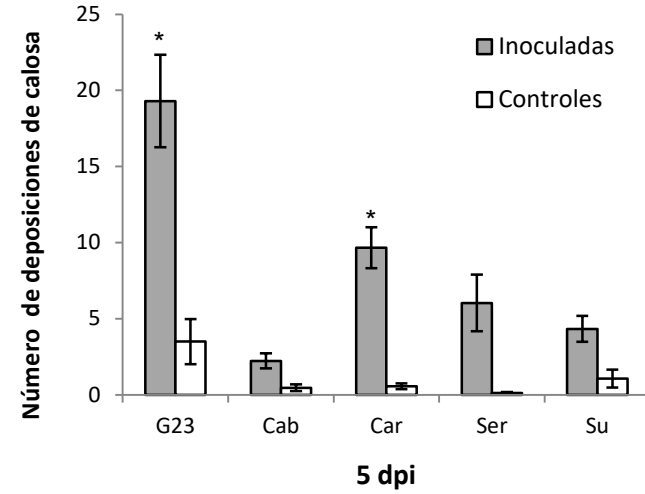
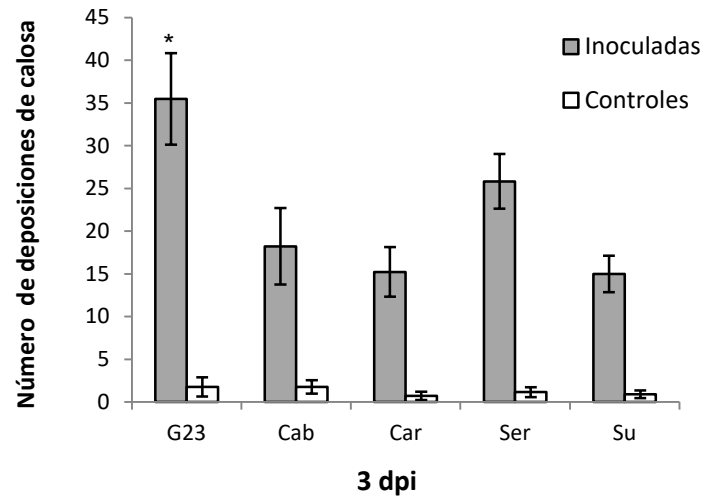


Figura 2-13: Promedio total de deposiciones de calosa ($1,8 \text{ mm}^2$) en materiales de frijol común 3, 5 y 7 dpi con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Los valores promedios representan dos repeticiones independientes. $n=30$, las barras de error indican SD. Los asteriscos sobre las barras expresan diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey ($P < 0.05$). G23, diferencial G2333; Cab, comercial Cabrera; Car, comercial Cargamanto; Ser, cultivar Serranía y Su, cultivar Sutagao.

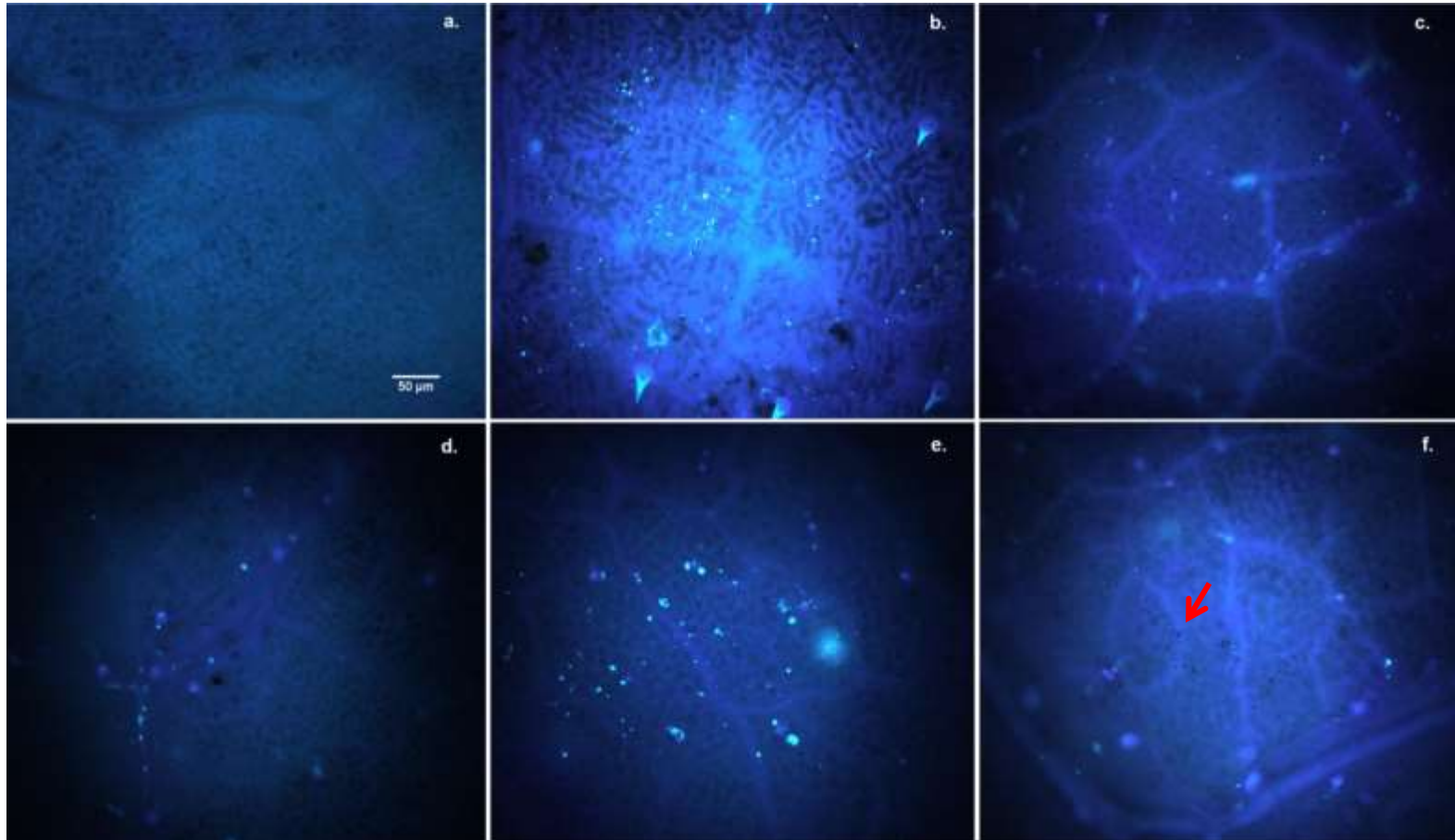


Figura 2-14: Acumulación de depósitos de calosa a los 3 dpi en materiales de frijol común inoculados con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum* y teñidos con azul de anilina. **a.** Control; **b, c, d, e y f** plantas inoculadas. **b.** parental resistente G2333, **c.** parental comercial Cabrera, **d.** parental comercial Cargamanto, **e.** cultivar Serranía y **f.** cultivar Sutagao. La fluorescencia verde corresponde a depósitos de calosa. Los puntos negros señalados por la flecha roja muestran los aporesorios del patógeno. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con filtro UV a un aumento de 10x. La escala para todas las imágenes es de 50 µm.

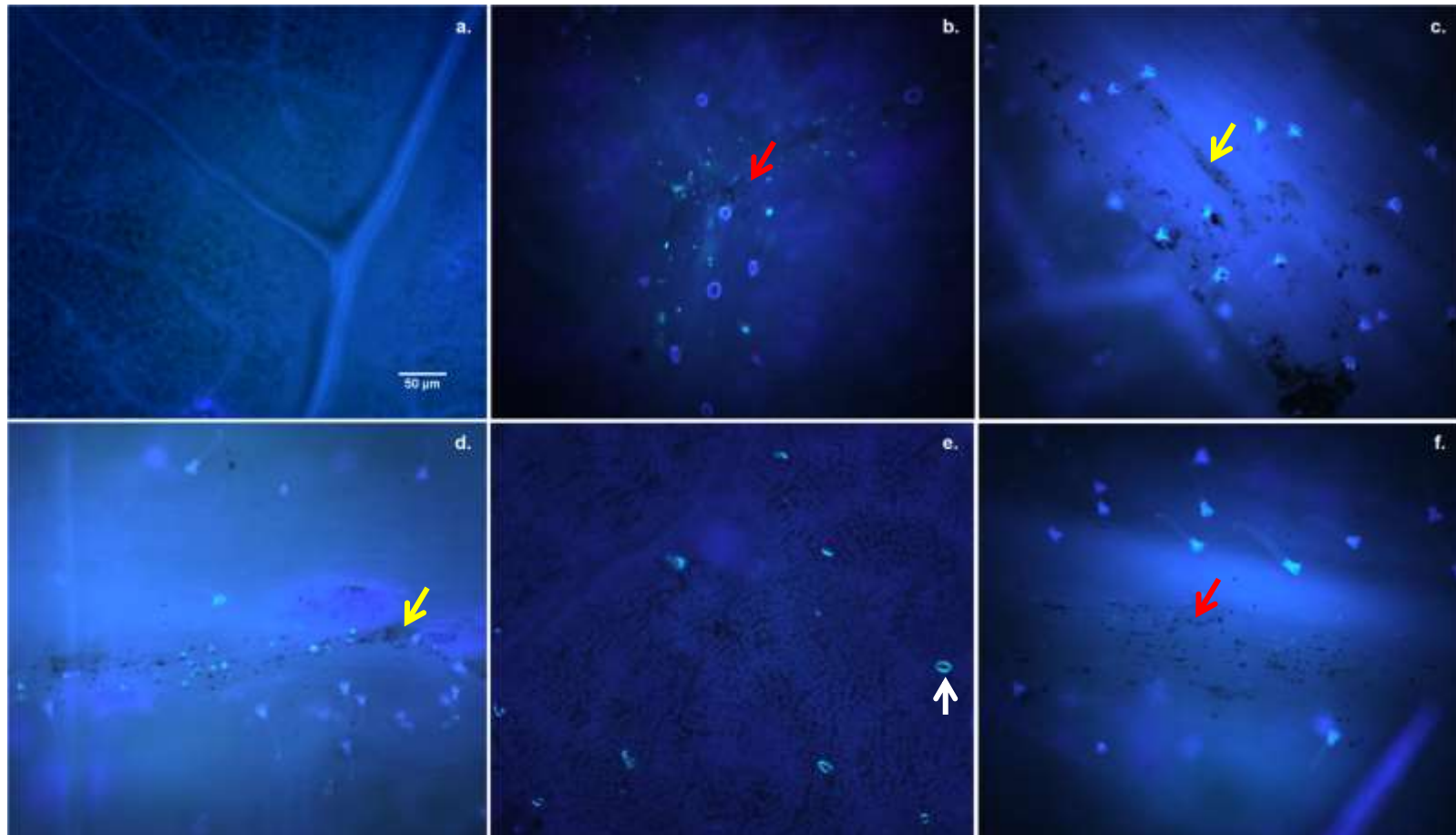


Figura 2-15: Acumulación de depósitos de calosa a los 5 dpi en materiales de frijol común inoculados con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum* y teñidos con azul de anilina. **a.** Control; **b, c, d, e y f** plantas inoculadas. **b.** parental resistente G2333, **c.** parental comercial Cabrera, **d.** parental comercial Cargamanto, **e.** cultivar Serranía y **f.** cultivar Sutagao. La fluorescencia verde corresponde a depósitos de calosa, a excepción de los tricomas. Las flechas rojas señalan los apresorios, las amarillas lesiones necróticas y las blancas, estomas. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con filtro UV a un aumento de 10x. La escala para todas las imágenes es de 50 µm.

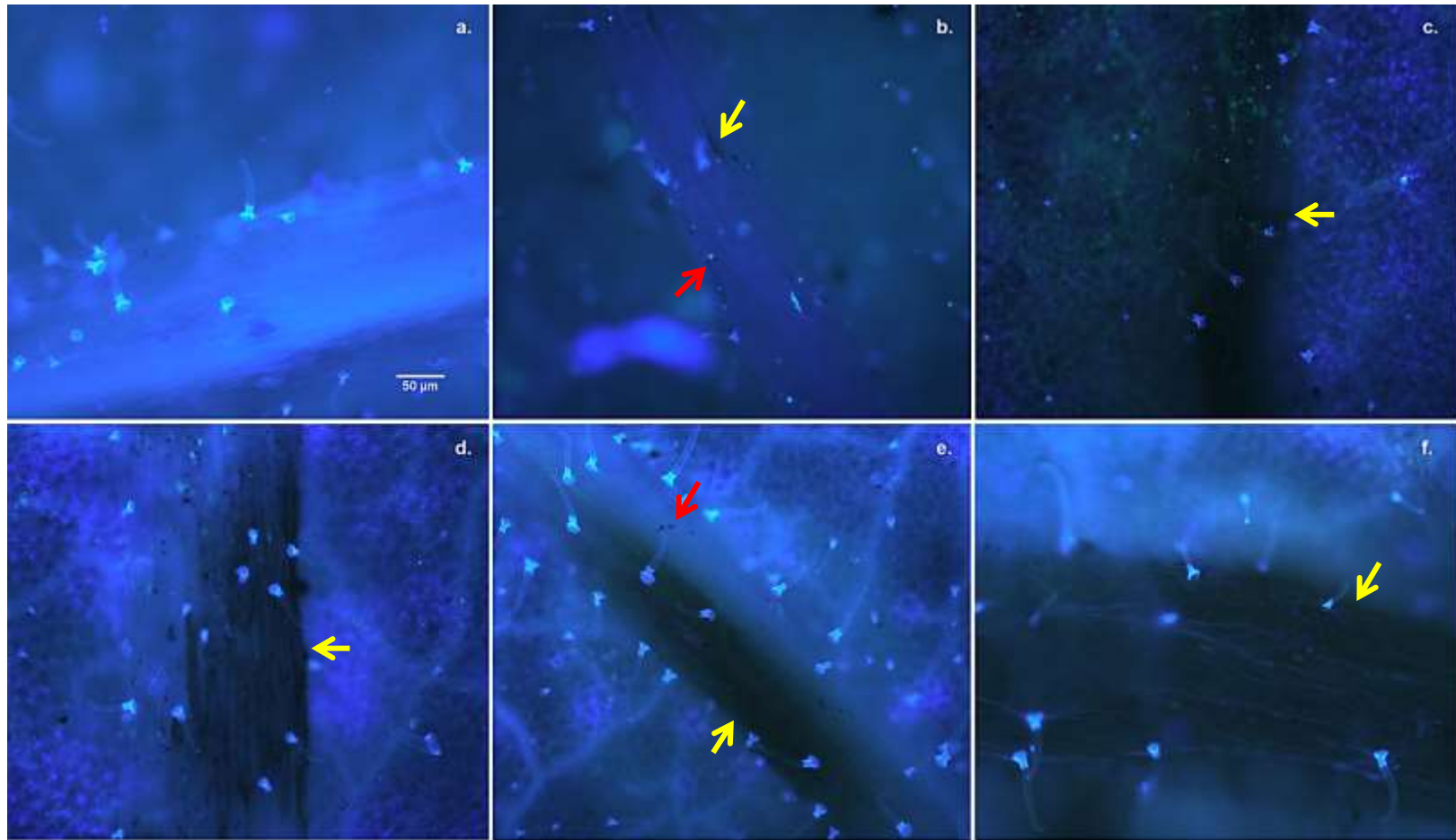


Figura 2-16: Acumulación de depósitos de calosa a los 7 dpi en materiales de frijol común inoculados con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum* y teñidos con azul de anilina. **a.** Control; **b, c, d, e y f** plantas inoculadas. **b.** parental resistente G2333, **c.** parental comercial Cabrera, **d.** parental comercial Cargamanto, **e.** cultivar Serranía y **f.** cultivar Sutagao. La fluorescencia verde corresponde a depósitos de calosa, a excepción de los tricomas. Las flechas rojas y amarillas señalan los apresorios y lesiones necróticas, respectivamente. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio de epifluorescencia con filtro UV a un aumento de 10x. La escala para todas las imágenes es de 50 µm.

2.5 Discusión

Durante la interacción planta-patógeno muchos de los mecanismos de defensa vegetal son activados luego de la detección del microorganismo. En el presente estudio se pudo determinar mediante ensayos de patogenicidad y de detección *in situ* la inducción de barreras químicas y físicas en dos cultivares de frijol común liberados en campo, Serranía y Sutagao, ante el ataque de la raza 7 de *C. lindemuthianum*. El uso de la escala de severidad propuesta por Schoonhoven y Pastor-Corrales (1987), la detección histoquímica de depósitos de calosa y de H₂O₂, permitieron relacionar respuestas de defensa con la presencia o ausencia de los loci *Co-4*² y *Co-5* durante la interacción entre *P. vulgaris* L. y la raza 7 de *C. lindemuthianum*.

La aplicación de la escala de severidad determinó que el cultivar Serranía y su parental mesoamericano G2333 son resistentes a la raza 7 de *C. lindemuthianum*, mientras que el cultivar Sutagao y su parental andino Cabrera manifestaron ser susceptibles a esta raza. De acuerdo a las evaluaciones histoquímicas, los frijoles G2333 y Serranía acumularon debajo de los apresorios y alrededor de las puntillas de penetración, papilas enriquecidas con calosa y H₂O₂. Estas respuestas fueron menores en los frijoles Cabrera y Sutagao ya que evidenciaron pocas señales de deposición en los sitios de ataque del hongo, lo cual favoreció el ingreso y la invasión de *C. lindemuthianum* en el tejido vegetal. De acuerdo a Voigt y Somerville (2009), la papila es un engrosamiento de la pared celular que se forma en el sitio de ataque del patógeno, cuyo contenido principal es 1,3-β-glucano, polímero que fue detectado mediante epifluorescencia. No obstante, se ha observado que en dicha estructura se acumulan adicionalmente peroxidasas, tioninas y compuestos fenólicos, los cuales también están relacionados con defensa. La papila aunque no detiene completamente al patógeno reduce el proceso de infección y permite la ganancia de tiempo para la inducción de expresión de genes vinculados en inmunidad vegetal (Smirnoff y Arnaud, 2019). Así mismo el H₂O₂ producido en las primeras etapas del ciclo de infección de hongos actúa como una molécula altamente reactiva con función antimicrobiana (Basavaraju, et al., 2009), la cual fue detectada tempranamente en los materiales resistentes G2333, Serranía y en el frijol comercial Cargamanto.

De este modo, la pared celular se constituye como la primera barrera en ser modificada durante el ataque de patógenos (Humphrey, et al., 2007). La inducción de respuestas de defensa como depósitos de calosa y la producción de H₂O₂ es favorecida por la detección

temprana de PAMPs, mediante proteínas transmembranales tipo RLKs (Receptor-Like Kinases) y PRRs los cuales son receptores de reconocimiento de patrones que activan la inmunidad desencadenada por PAMPs (PTI, PAMP-triggered immunity) (Jones y Dangl, 2006; Greeff, et al., 2012). Los frijoles G2333 y Serranía pertenecientes a las poblaciones posteriores al RC₁F₁, presentan los loci de resistencia *Co-4*² y *Co-5*, sin embargo, el cultivar Sutagao solo amplificó el marcador asociado al alelo *Co-4*², el cual fue homólogo a una proteína RLK denominada COK-4. En el cultivar Sutagao las secuencias de *COK-4* revelaron una delección en la región de los dominios catalíticos y en los sitios de unión de ATP. Las Proteínas RLKs contienen dominios extracelulares para el reconocimiento de elicitores y un dominio quinasa intracelular para la transducción de la señales (Afzal, et al., 2008). En este último dominio ocurren los eventos de fosforilación que activan modificaciones en la homeostasis celular y cambios en los estados de fosforilación de proteínas tipos MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) durante la interacción planta-patógeno (Hamel et al., 2012). La delección en la región de los dominios catalíticos del gen *COK-4* y la ausencia de *Co-5* en el frijol Sutagao, pudo haber afectado la formación de complejos de PRRs-COK-4 y la transducción de señales corriente abajo para la activación de la PTI, resultando en susceptibilidad. Además, estos eventos podrían relacionarse con una supresión temprana de barreras físicas y químicas, como lo son la producción de depósitos de calosa y H₂O₂ en los sitios de ataque de la raza 7 de *C. lindemuthianum*, lo cual facilitaría el ingreso del hongo y posteriormente el desarrollo de la enfermedad. No obstante, es necesario realizar en estudios que correlacionen la interacción entre dichos loci de resistencia y receptores asociados con defensa.

Cuando la PTI es activada defensas locales son inducidas en los sitios de ataque, entre éstas la acumulación de ROS y la elicitación de HR (Jones y Dangl, 2006; Doehlemann y Hemetsberger, 2013). El patógeno antes de invadir la célula vegetal debe atravesar el apoplasto y la membrana, en la cual una vez dada la percepción de los PAMPs, minutos después se genera un incremento de ROS en la región apoplástica (60-180 min) (Lamb y Dixon, 1997). Sin embargo, si en la célula afectada dicha acumulación no es suficiente para impedir la infección, una segunda fase es promovida, caracterizada por el aumento continuo en los niveles de ROS para llevar a la generación de una HR (Lamb y Dixon, 1997; Doehlemann y Hemetsberger, 2013). Estas reacciones oxidativas fueron evidentes en las primeras etapas de infección de la raza 7 de *C. lindemuthianum* (24 hpi y 3 dpi), en los frijoles G2333 y Cargamanto (Figuras 2-7 y 2-9), hecho que contrastó en los

susceptibles Cabrera y Sutagao, los cuales redujeron las acumulaciones de H_2O_2 en estos tiempos.

El H_2O_2 es esencial para la inducción de respuestas de defensa temprana ya que promueve la movilización de Ca^{2+} al citosol, activación NADPH-oxidasas e interactúa con vías de señalización hormonal, particularmente con la vía del AS (ácido salicílico) para la generación de HR y el establecimiento de la defensa sistémica (Doehlemann y Hemetsberger, 2013; Kimura et al., 2017). Además, el H_2O_2 puede viajar a través de vesículas a los sitios de intento de penetración del patógeno para evitar la infección, sin embargo, en plantas susceptibles, efectores específicos llegan a interactuar con proteínas vegetales de secreción para reprimir la PTI y la señalización mediada por ROS (Jwa y Hwang, 2017).

De acuerdo a O'Connell et al. (2012), el hongo patogénico *C. higginsianum* manipula al hospedero desde la etapa apresorial hasta la fase biótropa. La etapa apresorial (pre-penetración y penetración), se caracteriza por la producción de metabolitos secundarios y de enzimas-activas en carbohidratos (CAZyme), que degradan cutina, celulosa, hemicelulosa y pectina, para el establecimiento inicial en el hospedero. Sin embargo, en la fase biótropa (a partir del desarrollo de la vesícula infectiva), *C. higginsianum* produce mayormente metabolitos secundarios, los cuales no son tóxicos para el hospedero, pero participan en la manipulación de respuestas de defensa en la planta. Así mismo, genes codificantes para proteínas candidatas efectoras (CSEP) también son inducidos fuertemente durante esta fase, sugiriendo que la hifa biótropa funciona primariamente como una plataforma de secreción de efectores y de metabolitos secundarios para la supresión de respuestas de inmunidad (PTI). En la transición a la fase necrotrófica, *C. higginsianum* secreta proteasas y CAZyme para degradar los polisacáridos de la pared celular, de igual modo, genera transportadores de membranas para nutrirse de las moléculas obtenidas en la degradación (O'Connell et al., 2012). Este proceso de infección puede ser semejante en *C. lindemuthianum* ya que en las evaluaciones histoquímicas se pudo comprobar que en los frijoles resistentes las deposiciones de calosa y de H_2O_2 se redujeron considerablemente a los 5 y 7 dpi, indicando que estas respuestas de defensa son inducidas tempranamente para evitar el establecimiento de la fase biótropa del hongo en la célula vegetal (24 hpi y 3 dpi) (Figura 2-7, 2-9 y 2-10). Sin embargo, en los tejidos necrosados de los frijoles susceptibles Cabrera y Sutagao a los 7 dpi, grandes acumulaciones de H_2O_2 fueron detectadas en las regiones sintomáticas

hecho que podría relacionarse con la invasión de hifas secundarias en el tejido de planta. En un estudio realizado por Basavaraju, et al. (2009), se comprobó que el estado necrótrofo del hongo *C. sublineolum* fue favorecido por las acumulaciones de H_2O_2 en las regiones sintomáticas de un genotipo de sorgo (*Sorghum bicolor*) susceptible. Estos resultados indican que en los estados avanzados de la infección, fase necrótrofa, la muerte celular observada en las regiones sintomáticas está posiblemente asociada con la fuerte producción de H_2O_2 y la secreción de enzimas degradadoras del patógeno para su nutrición, las cuales que actúan sobre polímeros de la pared celular y otros compuestos orgánicos (De Queiroz et al., 2019).

Estos resultados revelan que los loci *Co-4²* y *Co-5* se encuentran estrechamente vinculados con la activación temprana de mecanismos de defensa, ya que los frijoles resistentes portadores de dichos loci, G2333 y Serranía, incrementaron las deposiciones de calosa y la producción de H_2O_2 en los sitios de ataque de la raza 7 de *C. lindemuthianum* en las etapas tempranas de infección (24 hpi y 3 dpi), en contraste al cultivar Sutago en el cual las deposiciones calosa y la producción de H_2O_2 se vió afectada en los sitios de ataque del patógeno por la deleción presentada en *Co-4²* y la ausencia del marcador asociado a *Co-5*. Cabe destacar que el locus *Co-5* confiere resistencia a la raza 7 del hongo (Campa et al., 2014), contribuyendo este resultado a la susceptibilidad observada en el cultivar Sutago. Estos hallazgos demuestran que la presencia de los loci *Co-4²* y *Co-5* participan en la resistencia a la raza 7 de *C. lindemuthianum*.

2.6 Referencia bibliográfica

Afzal, A., Wood, A., Lightfoot, D. (2008) Plant Receptor-Like Serine Threonine Kinases: Roles in Signaling and Plant Defense. *Mol Plant Microbe Interact.* 21 (5): 507-17. doi:10.1094/MPMI-21-5-0507.

Basavaraju, P., Shetty, N.P., Shetty, H.S., De Neergaard, E., Jørgensen, H.J.L. (2009) Infection biology and defence responses in shorgum against *Colletotrichum sublineolum*. *J Appl Microbiol.* 107 (2): 404-15. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04234.x

Danies, G., Antolínez, C., Cantillo, J., Peña, G., Vargas, A., Cárdenas, M., Bernal, A., Fry, W., Restrepo, S. (2014) *Physalis peruviana* responses to *Phytophthora infestans* are typical of an incompatible interaction. *Can. J. Plant Pathol.* 37 (1): 106-117. doi:10.1080/07060661.2014.975157.

De Queiroz, C.B., Correia, H.L., Santana, M.F., Batista, D.S., Vidigal, P.M., Brommonschenkel, S.H., de Queiroz, M. (2019) The repertoire of effector candidates in *Colletotrichum lindemuthianum* reveals important information about *Colletotrichum* genus lifestyle. *Appl Microbiol Biotechnol.* doi: 10.1007/s00253-019-09639-9.

Doehlemann, G., Hemetsberger, C. (2013) Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytol.* 198 (4):1001-16. doi:10.1111/nph.12277.

Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W. y Sharon, A. (2017) Plant pathogenic fungi. *Microbiol Spectr.* 5(1). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016.

Fontenelle, M., Santana, M., Cnossen, A., Bazzoli, D., Brommonschenkel, S., Araújo, E., Queiroz M. (2017) Differential expression of genes during the interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaseolus vulgaris*. *Eur J Plant Pathol* 147: 653. doi:10.1007/s10658-016-1033-4.

Garzón, L., Blair, M., Ligarreto, G. (2007) Uso de Selección Asistida con Marcadores para Resistencia a Antracnosis en Frijol Común. *Rev. Agronomía Colombiana* 25: 207-214.

Giraldo, M., Valent, B. (2013) Filamentous plant pathogen effectors in action. *Nat Rev Microbiol.* 11 (11): 800-14. doi: 10.1038/nrmicro3119.

Greeff, C., Roux, M., Mundy, J., Petersen, M. (2012) Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. *Front Plant Sci.* 3: 209. doi: 10.3389/fpls.2012.00209.

Hamel, L., Nicole, M., Duplessis, S., Ellis, B. (2012) Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plant-Interacting Fungi: Distinct Messages from Conserved Messengers. *Plant Cell.* 24: 1327–1351. doi:10.1105/tpc.112.096156.

Herrera-Vásquez A, Salinas, P., Holuigue, L. (2015) Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Front. Plant Sci.* 6:171. doi: 10.3389/fpls.2015.00171.

Humphrey, TV., Bonetta, DT, Goring, DR. (2007) Sentinels at the wall: Cell Wall receptors and sensors. *New Phytol.* 176 (1): 7–21. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02192.x.

Hung, H., Yu, W., Lin, H. (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 1-10.

Jones, J., Dangl, J. (2006) The plant immune system. *Nature.* 444: 323-329. doi:10.1038/nature05286.

Jwa, NS, Hwang, BK (2017) Convergent Evolution of Pathogen Effectors toward Reactive Oxygen Species Signaling Networks in Plants. *Front. Plant Sci.* 8:1687. doi: 10.3389/fpls.2017.01687.

Kadota, Y., Shirasu, K., Zipfel, C. (2015) Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiol.* 56 (8): 1472–1480 doi:10.1093/pcp/pcv063.

Kimura, S., Waszczak, C., Hunter, K., Wrzaczek, M. (2017) Bound by Fate: The Role of Reactive Oxygen Species in Receptor-Like Kinase Signaling. *The Plant Cell*, Vol. 29: 638–654. doi: 10.1105/tpc.16.00947.

Lamb, C., Dixon, R. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48 (1): 251–275. doi:10.1146/annurev.arplant.48.1.251.

Liu, F., Cai, L., Crous, P., Damm, U. (2013) Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum*. *Mycologia*, 105 (4): 844–860. doi: 10.3852/12-315.

Melotto M., Balardin R.S., Kelly J.D., (2000) Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*. In: Prusky D., Freeman S., Dickman M.B. (eds). *Colletotrichum* Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction, pp. 346-361. APS Press, St. Paul, MN, USA.

Meziadi C., Richard M., Derquennes A., Thareau V., Blanchet S., Gratias A., Pflieger S., Geffroy V. (2016) Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. *Plant Sci.* 242: 351-357. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.09.006.

Nowicki, M., Lichocka, M., Nowakowska, M., Kłosińska, U., Golik, P., Kozik, E. (2012) A simple dual stain for detailed investigations of plant-fungal pathogen interactions. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 77 (1): 61-74. doi: 10.2478/v10032-012-0016-z.

O'Connell R.J, Bailey J., Richmond D., (1985). Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol.Plant Pathol.* 27 (1): 75-98. doi: 10.1016/0048-4059(85)90058-X.

O'Connell, R.J., Thon, M., [...] Vaillancourt, L. (2012) Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat Gen.* volume 44 (9): 1060–1065. doi:10.1038/ng.2372.

Padder, B., Sharma, P., Awale, H., Kelly, J. (2017) *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. *Plant Pathol.* 99 (2): 317-330. doi:10.4454/jpp.v99i2.3867.

Pastor-Corrales, M. A., Tu, J.C. (1989) Anthracnose. En: Schwartz, H., Galvez, G. (eds.). *Bean production problems*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali. p. 77 – 104.

Pastor-Corrales M. (1991) Estandarización de variedades diferenciales y designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phytopathology* 81: 694.

Pereira, M., Araújo, C., Araújo, E., Vieira, M., Soares, D. (2013) Beginning to Understand the Role of Sugar Carriers in *Colletotrichum lindemuthianum*: the Function of the Gene *mfs1*. *J Microbiol.* 51 (1): 70–81. doi: 10.1007/s12275-013-2393-5.

Riascos, J. (2001). Caracterización de la diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum* usando marcadores moleculares. Trabajo de grado. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Cali, Colombia. 70 p.

Rincón, L.J. (2007). Diversidad genética de *Colletotrichum lindemuthianum* que afecta frijol en las zonas productoras de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Santander. Trabajo de grado M.Sc. en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. 90p.

Saxena, I., Srikanth, S., Chen, Z. (2016) Cross Talk between H₂O₂ and Interacting Signal Molecules under Plant Stress Response. *Front. Plant Sci.* 7:570. doi: 10.3389/fpls.2016.00570.

Schoonhoven, A., Pastor Corrales, M. (eds.) (1987) Standard system for the evaluation of bean germplasm. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 53 p.

Shetty, N.P., Jørgensen, H.J.L., Jensen, J.D. Collingen, D.B., Shetty, H.S. (2008) Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *Eur J Plant Pathol.* 121: 267-280. doi.org/10.1007/s10658-008-9302-5.

Smirnoff, N., Arnaud, D. (2019) Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist.* 221: 1197–1214. doi: 10.1111/nph.15488.

Voigt, C., Somerville, S. (2009). Callose in Biotic Stress (Pathogenesis). *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*, 525–562. doi:10.1016/b978-0-12-373971-1.00016-9.

Voigt, C. (2014) Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Front Plant Sci.* 5 (168):1-6. doi: 10.3389/fpls.2014.00168.

Zavaliev, R., Epel, B. L. (2014). Imaging Callose at Plasmodesmata Using Aniline Blue: Quantitative Confocal Microscopy. *Plasmodesmata*, 105–119. doi:10.1007/978-1-4939-1523-1_7.

2.7 Material suplementario



Figura suplementaria 2-1: Desarrollo de síntomas severos de antracnosis en el cultivar susceptible Sutagao durante su interacción con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Evaluación 9 días posteriores a la inoculación.

3. La resistencia a la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum* está mediada por la inducción temprana de genes de defensa en *Phaseolus vulgaris* L.

3.1 Resumen

La inducción de genes relacionados con defensa hace parte de uno de los procesos de las plantas cuando están siendo atacadas por fitopatógenos. En el presente estudio dos materiales de frijol común que mostraron resistencia a la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*, el parental mesoamericano G2333 y el cultivar Serranía, y el cultivar susceptible Sutagao, fueron evaluados para analizar la expresión de genes vinculados con defensa al ser sometidos a la infección del patógeno. Estos cultivares son productos de programas de mejoramiento, a los que les intrograsaron los genes de resistencia a *C. lindemuthianum*, *Co-4*² y *Co-5*, de los cuales el frijol Sutagao evidenció una delección en el gen *COK-4* y la ausencia de *Co-5*. La cuantificación relativa por PCR en tiempo real, permitió evaluar cambios en los niveles y en el tiempo de expresión de genes relacionados con la producción de enzimas y proteínas vinculadas con defensa inducible (PRs). El análisis permitió confirmar que la presencia de ambos genes *Co* es necesaria para la activación temprana de mecanismos asociados con inmunidad vegetal, ya que los frijoles resistentes G2333 y Serranía, indujeron tempranamente compuestos antifúngicos, quitinasas y peroxidasas para la limitación en el crecimiento y en los procesos de penetración del patógeno. En contraste, el cultivar Sutagao expresó tardíamente los genes de defensa favoreciendo el ingreso y el establecimiento del hongo en el tejido vegetal. Estos resultados evidencian que *COK-4* y *Co-5* contribuyen en la limitación del microorganismo en el sitio de ataque y en la activación de la inmunidad durante la interacción con *C. lindemuthianum*.

Palabras claves: *PR-3*, *PR-4*, peroxidasas, ácido salicílico, ácido jasmónico.

3.2 Introducción

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) se encuentra entre las tres leguminosas de mayor importancia económica a nivel mundial, superada por soya (*Glycine max*) y maní (*Arachis hypogea* L.) (Mayo et al., 2015). No obstante, su producción es afectada por fitopatógenos que reducen el rendimiento de los cultivos, entre estos *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) anamorfo de *Glomerella cingulata* f.sp *phaseoli*, agente causal de la antracnosis, enfermedad limitante que puede generar pérdidas totales de los sembrados (Fontenelle et al., 2017; Padder et al., 2017). Como medida de manejo, programas de mejoramiento genético han obtenido cultivares de frijol resistentes a varias razas a *C. lindemuthianum* con el fin reducir el uso de agroquímicos y permitir la inducción natural de mecanismos de defensa ante potenciales patógenos (Pastor-Corrales, 1991; Miklas et al., 2006; Garzón et al., 2007; Rodrigues et al., 2015; Padder et al., 2017). Las plantas al ser organismos sésiles pueden hacer frente a los múltiples factores estresantes incluidos los de tipo biótico, por lo cual, han desarrollado un sistema de detección y respuestas ante posibles invasores, ésto mediante la percepción de moléculas conservadas (patrones moleculares asociados a microorganismos, MAMPS, a patógenos, PAMPS, o a daño, DAMPS), que desencadenarán procesos de señalización celular para la activación de mecanismos de defensa durante la interacción planta-patógeno (Jones y Dangl, 2006; Heil y Land, 2014; Gust et al., 2017). La detección de estos patrones es dada por receptores de reconocimiento (PRRs), entre los que se encuentran proteínas tipo RLKs (Receptor-Like Kinases), estructuras transmembranales que participan en desarrollo, crecimiento, defensa contra patógenos y en estrés abiótico (Rodrigues et al., 2015). Se ha descrito que algunas RLKs en concierto con otros receptores tipo RLCKs (Receptor-Like Cytoplasmic Protein Kinases), los cuales actúan como componentes de señalización aguas abajo, controlan la activación de NADPH oxidasas localizadas en la membrana celular, encargadas de la transferencia de electrones al O₂ apoplástico para la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), incidiendo estos eventos en cambios en la concentración de Ca²⁺ citosólico, en la activación de proteínas dependientes de Ca²⁺ (CDPKs) y en cascadas MAPKs (mitogen-activated protein kinase), lo cual resulta en la reprogramación transcripcional de genes de defensa para el establecimiento de la PTI (PAMP-triggered immunity) (Kimura, et al., 2017; Han, 2018).

Sin embargo, algunos patógenos han evolucionado produciendo moléculas efectoras que pueden interferir en la defensa PTI, las cuales al ser liberadas en la célula vegetal actúan sobre blancos vinculados en defensa basal, para desencadenar la susceptibilidad (Effector-Triggered Susceptibility, ETS). No obstante, las plantas pueden llegar a presentar proteínas de resistencia (R), capaces de reconocer directa o indirectamente el efector del patógeno. Estas proteínas R presentan sitios de unión a nucleótidos y repeticiones ricas en leucina (NB-LRR), para inducir la inmunidad desencadenada por efectores (ETI) (Jones y Dangl, 2006; Han, 2018), lo que incluye la expresión de genes relacionados con defensa, respuestas de hipersensibilidad (HR) en los sitios ataque del patógeno, reforzamiento estructural, liberación de enzimas como peroxidasas, quitinasas, glucanasas, proteinasas de naturaleza antimicrobiana (Oliveira, et al., 2015; S. Ali et al., 2018).

Después de la detección del patógeno, la planta puede llegar a activar vías de señalización hormonal vinculadas con defensa, tales como las del ácido salicílico (AS) y del ácido jasmónico (AJ) (Ali et al., 2018). Herrera-Vásquez et al. (2015), refieren que el H_2O_2 participa en la inducción del AS, y así mismo esta hormona incrementa los niveles de enzimas antioxidantes para el control de las ROS. De manera que, este proceso tiene como fin activar la transcripción de genes de defensa como aquellos que codifican para PRs o proteínas relacionadas con defensa inducible (antes denominadas Pathogenesis-related proteins, PRs). Tanto el AS como el AJ promueven la síntesis de PRs, proteínas que están involucradas tanto en estrés biótico como abiótico. Entre estas proteínas, PR-1, PR-2 y PR-5 han sido asociadas con AS, son producidas localmente en los sitios de ataque de patógenos y requeridas para la generación de resistencia sistémica adquirida (SAR). De igual modo, el AJ puede llegar a inducir la acumulación local de otras PRs, entre estas PR-3, PR-4 y PR-12 para promover una resistencia local adquirida (LAR) (Ali et al., 2017a). Las proteínas PRs son moléculas ricas en cisteína que poseen un amplio potencial de actividad antimicrobiana, restricción a la invasión y al crecimiento de patógenos, de allí su importancia en la defensa vegetal (Sudisha et al., 2011; Ali et al., 2018).

Estos procesos de detección y señalización para la generación de respuestas de defensa han sido ampliamente estudiados en plantas modelos y en patosistemas de gran afectación agrícola, es por ello, que fríjol común - *C. lindemuthianum* ha cobrado interés en investigaciones recientes para la comprensión de la interacción entre estos dos

organismos (De Queiroz, et al., 2019). Como se mencionó anteriormente la obtención de cultivares hace parte de una de las medidas de manejo más efectivas para el control de la antracnosis, mediante la introgresión de genes de resistencia *Co* presentes en diferenciales de frijol, como G2333 (Padder et al., 2017). Un ejemplo de ello fue la obtención de los cultivares Sutagao y Serranía a partir de cruces con G2333 y frijoles comerciales susceptibles a *C. lindemuthianum* (Garzón et al., 2007). En resultados previos se encontró que el diferencial G2333 y el cultivar Serranía presentaban ambos genes *Co* mientras que los frijoles Cargamanto y Sutagao solo amplificaron el marcador asociado al alelo *Co-4²*. No obstante, el cultivar Sutagao mostró una delección que afectó los dominios catalíticos y sitios de unión de ATP presentes en una proteína tipo RLK codificada en el gen *COK-4* (Pedroza et al., 2019). Por consiguiente, se planteó como objetivo relacionar la presencia de los loci *Co-4²* y *Co-5* y la delección presentada en el gen *COK-4* con cambios en los niveles y en el tiempo de expresión algunos genes de frijol común vinculados con defensa en variedades que mostraron ser resistentes y susceptibles al ataque de la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Para ello se evaluó la expresión de *PR-1*, *PR-3*, *PR-4*, los cuales codifican para compuestos antifúngicos y quitinasas, *PvPOD* (peroxidasa) y *PvERF* (factor de transcripción de respuesta a etileno). Entre los resultados se pudo determinar que el parental G2333 y el cultivar Serranía resistentes a la raza 7, en contraste al cultivar susceptible Sutagao, indujeron tempranamente genes asociados a enzimas que participan en la restricción del patógeno en el sitio de ataque, esto para evitar el progreso de infección de *C. lindemuthianum*.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Material vegetal e inoculación de la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum* en hojas de frijol común

Las semillas del frijol común de los cultivares Serranía y Sutagao y del parental mesoamericano G2333 fueron suministradas por el banco de germoplasma de frijol de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia. Todas las semillas fueron dispuestas en bandejas de crecimiento, sembradas en suelo estéril y mantenidas en invernadero a una temperatura promedio de 18 °C y una humedad relativa del 71%.

La raza 7 de *C. lindemuthianum*, fue suministrada por el Programa de Fríjol del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). El incremento del patógeno se llevó a cabo utilizando vainas de habichuelas cortadas y autoclavadas durante 40 minutos. En cámara de flujo laminar se eliminó el exceso de agua liberado por el material vegetal y se agregó a cada tubo pequeñas porciones de la raza 7 del patógeno crecido en PDA durante dos semanas y que provenía de un cultivo monospórico. Los frascos se mantuvieron en incubación a 20°C en condiciones de oscuridad durante 15 días.

La inoculación de la raza 7 se realizó en hojas primarias y peciolo de las plantas de frijol común de 15 días de edad de los cultivares Sutagao, Serranía y del diferencial G2333 a una concentración de $1,7 \times 10^6$ conidias/mL utilizando un pincel estéril. Este proceso se llevó a cabo humedeciendo totalmente el área foliar tanto en haz como en envés. Para el control negativo, se siguió el mismo procedimiento descrito, pero el inóculo fue remplazado con agua destilada estéril. Tanto las plantas inoculadas como el control fueron dispuestas en un invernadero y cubiertas con plásticos para generar una humedad relativa alta (80%) y una temperatura promedio de 18 °C. Al tercer día posterior a la inoculación, el plástico fue retirado y se mantuvieron descubiertas hasta el último tiempo de evaluación.

3.3.2 Extracción de ARN de hojas de frijol común inoculadas con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*

Dos hojas inoculadas con el patógeno y dos del control negativo de los cultivares Serranía, Sutagao y del parental G2333, fueron cosechadas y mantenidas a -80 °C. Este ensayo se repitió dos veces en el tiempo. Los tiempos evaluados correspondieron a las 0 y 24 horas posteriores a la inoculación (hpi) y a los 3, 5 y 7 días posteriores a la inoculación (dpi). Para la extracción del ARN total, el tejido vegetal fue macerado con

nitrógeno líquido en un mortero estéril, reduciéndolo a un polvo fino al que se le agregaron aproximadamente 3.0 mL de buffer de extracción (CTAB 2%, Tris-HCl pH= 8.0 100 mM, NaCl 1.4 M, NaSO₃ 1%, Polivinilpirrolidona PVP-40 2%, β-Mercaptoetanol 2% y EDTA 20mM). 1 mL de la mezcla homogenizada fue agregada en un tubo de 2 mL y llevada a baño maría a 65°C por 15 minutos. Posteriormente, al retirar de la incubación se le agregó 1 mL de cloroformo–alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se llevó a centrifugación a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. Transcurrido el tiempo se transfirió la fase acuosa (aproximadamente 800 µL) a un nuevo tubo de 2 mL al que se le agregó 1 mL de cloroformo-IAA (24:1). Las muestras fueron mezcladas y llevadas a centrifugación a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. Generada la fase acuosa, 800 µL fueron tomados y adicionados a un tubo estéril de 1.5 mL. La precipitación fue llevada a cabo con 1 mL de LiCl 4 M toda la noche a 4 °C. Transcurrido este tiempo las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 40 minutos a 4 °C. El sobrenadante se descartó y el botón fue resuspendido con 500 µL de buffer TE–SDS (Tris-HCl pH= 8, 10 mM; EDTA 1 mM; SDS 1%), previamente precalentado a 37°C. Luego, a cada tubo se le añadieron 700 µL de isopropanol puro y 200 µL de NaCl 5 M. Se mezclaron por inversión varias veces y se llevaron por 1 hora a -20° C. Luego, se centrifugaron a 10000 rpm por 15 minutos a 4° C, descartándose posteriormente el sobrenadante y lavando el pellet con 500 µL de etanol al 70%. Una última centrifugación se llevó a cabo por 5 minutos a 10000 rpm a 4° C. Se descartó el sobrenadante y el botón se secó por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente fue resuspendido en 50 µL de buffer TE. Todas las soluciones fueron preparadas con agua tratada con DEPC al 0.2% y doblemente autoclavadas. Las muestras fueron almacenadas a -20° C y -80° C.

3.3.3 Síntesis de ADNc de variedades de frijol común inoculadas con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*

El ARN total extraído del material vegetal fue tratado con DNase I, RNase-free (1 U/ µL), THERMO SCIENTIFIC para eliminar el ADN genómico presente. Para comprobar la ausencia de ADN en las muestras de ARN tratadas con DNAase, se realizaron amplificaciones por PCR del gen actina (α -Actina) de *P. vulgaris* L. Las reacciones para PCR fueron llevadas a un volumen final de 15 µL que contenían 1X de buffer (500 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl (pH 9.1 at 20 °C) y 0.1% Triton™ X-100), 2,5 mM de MgCl₂, 1U de Taq ADN-polimerasa recombinante (Invitrogen), 0,25 mM de dNTPs, 0,1 µM de cada

uno de los cebadores (directo e inverso) y 2 μ L de ARN tratado con DNase. La amplificación para el gen α -*Actina* se realizó bajo el siguiente perfil térmico: 95 °C durante 3 min, seguido de 34 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 61 °C por 40 s y 72 °C por 2 min, finalmente una extensión de 72 °C por 5 min.

Una vez confirmada la presencia exclusiva de ARN, fue cuantificado con el espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ One^C para proceder a la síntesis de ADNc. Para ello se tomaron 1 μ g de ARN total para ser transcrito con el Kit SuperScript III First-Strand Síntesis System, Invitrogen, de acuerdo al protocolo de manufactura. El cebador utilizado en su síntesis fue Oligo(dT). Para comprobar que el ADNc obtenido durante la síntesis era amplificable, se realizó una PCR del gen α -*Actina* siguiendo el perfil térmico previamente descrito. Los productos obtenidos de cada amplificación fueron corridos por electroforesis a 80 V en un gel de agarosa al 1,5%, usando el marcador de tamaño molecular 1 Kb Plus (DNA Ladder Vivantis). Se usó como agente intercalante el bromuro de etidio y la visualización se realizó con el sistema de imagen de Bio-Rad Laboratories' ChemiDoc MP.

3.3.4 Expresión genes de defensa en *Phaseolus vulgaris* L. durante la interacción con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*

Para evaluar la relación entre la presencia de los genes *Co-4*² y *Co-5* de G2333, Serranía y la delección presentada en *COK-4* en el cultivar susceptible Sutagao, con la expresión diferencial de genes vinculados en defensa, se analizó cuantitativamente los niveles de expresión de cinco genes de *P. vulgaris* L., siendo éstos *PR-1*, *PR-3* y *PR-4*, los cuales codifican para compuestos antifúngicos, quitinasas, *PvPOD* (peroxidasa) y *PvERF* (factor de transcripción de respuesta a etileno). El gen *PvEF1- α* fue utilizado como gen de referencia (housekeeping gene) para el análisis comparativo (Tabla suplementaria 3-1).

3.3.4.1 Eficiencia de amplificación de los genes vinculados con defensa en *Phaseolus vulgaris* L.

Para determinar la eficiencia de amplificación de los genes *PR-1*, *PR-3*, *PR-4*, *PvPOD*, *PvERF* y *PvEF1- α* , se llevaron a cabo diluciones seriadas de ADN de *P. vulgaris* L. Se tomaron 5 μ L de ADN y se diluyeron en 45 μ L de agua MilliQ. La concentración de partida fue de 30 ng/ μ L llevando a diluciones de 0.3, 0.03, 0.003 y 0.0003 ng/ μ L, esto

para la generación de la curva estándar. Se realizaron tres réplicas por dilución y de la concentración de partida. Las reacciones para la qPCR absoluta fueron llevadas a un volumen final de 12.65 μL que contenían 6.25 μL de LightCycler® 480 SYBR Green I Master 2x (Roche), 0.2 μL cebador directo 10 μM , 0.2 μL cebador inverso 10 μM , 2 μL de templado y 4 μL de agua grado PCR. Los parámetros utilizados para la qPCR en el LightCycler® 480 System de Roche, fueron de acuerdo a la versión 1.5 del Software LightCycler® 480. Un ciclo de pre-incubación a 95 °C por 5 min, seguido 45 ciclos de amplificación bajo un perfil térmico de 95 °C por 10 s, 61 °C por 30 s y 72 °C por 30 s. El método de detección fue por SYBR Green. Se realizó un ciclo para la curva de disociación (Melting curve) bajo el perfil 95 °C por 5 s, 65 °C por 1 min y 97 °C continuos. Finalmente un ciclo de enfriamiento a 40 °C por 10 s.

3.3.4.2 Análisis de expresión diferencial de genes relacionados con defensa en frijol común

El ADNc de cada tratamiento y de los controles de los tiempos 0 y 24 hpi y de los 3, 5 y 7 dpi de cultivares Serranía y Sutagao y del parental mesoamericano G2333 fue utilizado para el análisis de expresión diferencial de los genes *PR-1*, *PR-3*, *PR-4*, *PvPOD* y *PvERF* mediante PCR en tiempo real bajo el método de cuantificación relativa. Para dicho análisis se compararon los valores CP (Crossing point) del gen de referencia *PvEF1- α* y de cada gen de defensa, teniendo en cuenta la eficiencia de amplificación de cada uno de ellos. Para las reacciones de qPCR en tiempo real se utilizaron platos de 96 pozos (LightCycler 480 Multiwell Plate, ROCHE). Cada reacción se llevó a un volumen final de 11.4 μL que contenían 5 μL de LightCycler® 480 SYBR Green I Master 2x (Roche), 0.2 μL de cada uno de los cebadores 10 μM (directo, inverso), 2 μL de ADNc y 4 μL de agua grado PCR. Los parámetros de amplificación fueron de acuerdo al LightCycler® 480 Software, Versión 1.5 de Roche bajo un ciclo de pre-incubación a 95 °C por 5 min, seguido 45 ciclos de amplificación bajo un perfil térmico de 95 °C por 10 s, 61 °C por 30 s y 72 °C por 30 s y la detección se hizo por SYBR Green. Se realizó un ciclo para la curva disociación (Melting curve) bajo el perfil 95 °C por 5 s, 65 °C por 1 min y 97 °C continuos. Finalmente un ciclo de enfriamiento a 40 °C por 10 s. Cada tiempo de evaluación (0 y 24 hpi, 3, 5 y 7 dpi), se llevó a cabo por triplicado; dos réplicas técnicas por cada tiempo fueron analizadas en los materiales de frijol evaluados.

Para calcular los niveles de expresión relativa se utilizó el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Las diferencias significativas fueron determinadas comparando las medias de expresión usando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

3.4 Resultados

3.4.1 Eficiencia de las amplificaciones de los genes vinculados con defensa en *Phaseolus vulgaris* L.

La eficiencia de la amplificación de los genes *PR-1*, *PR-3*, *PR-4*, *PvPOD*, *PvERF* y *PvEF1- α* fue obtenida por qPCR absoluta, mediante una curva estándar, los cuales presentaron valores cercanos o mayores al 90% (Tabla 3-1). Posteriormente, se realizó la normalización mediante el método de $\Delta\Delta Ct$ sin corrección de la eficiencia, propuesto por Livak y Schmittgen (2001)

Tabla 3-1: Eficiencia de amplificación de genes de *Phaseolus vulgaris* L. evaluados durante el análisis por PCR en tiempo real.

Gen	Nombre	Eficiencia	Slope	%
<i>PvEF1-α</i>	^a Factor de elongación 1	1,971	-3,392	97,15
<i>PR-1</i>	Proteínas relacionada con defensa 1	1,905	-3,574	90,50
<i>PR-3</i>	Proteínas relacionada con defensa 3	1,887	-3,624	88,77
<i>PR-4</i>	Proteínas relacionada con defensa 4	1,993	-3,337	99,37
<i>Pv-POD</i>	Peroxidasa	1,905	-3,571	90,56
<i>PvERF</i>	Factor de transcripción de respuesta a etileno	1,916	-3,541	91,60

^a Gen de referencia

3.4.2 Los genes *PR1*, *PR-3* y *PvPOD* se inducen tempranamente para evitar el progreso de *Colletotrichum lindemuthianum* en *Phaseolus vulgaris* L.

Con el objetivo de relacionar la expresión de genes vinculados en defensa con la presencia de los genes *Co-4²* y *Co-5* en G2333 y Serranía y la delección presentada en *COK-4* en el cultivar Sutagao, se analizaron los niveles relativos de *PR-1*, *PR-3*, *PR-4*, *PvPOD* y *PvERF* en tres variedades de frijol común sometidas al ataque de la raza 7 de *C. lindemuthianum*. Los resultados indicaron que el gen *PR-1* incrementó su expresión a las 24 hpi en el cultivar Serranía, mientras que el parental G2333 reveló mayores niveles

a los 3 dpi, hecho contrario en el cultivar Sutagao el cual evidenció menor expresión del gen respecto a los frijoles resistentes (Figura 3-1).

El gen de la peroxidasa (*PvPOD*), indicó cambios a las 24 hpi en los materiales resistentes G2333 y Serranía, con respecto al frijol susceptible Sutagao, el cual reveló bajos niveles en este tiempo. No obstante, a los 3 dpi el frijol Sutagao aumentó la expresión de *PvPOD*, pero fue baja en comparación a las 24 hpi (Figura 3-1).

El gen *PR-3* el cual codifica para quitinasas, aumentó su nivel de expresión a las 24 hpi, seguido de incrementos a los 5 y 7 dpi en el parental resistente G2333, en contraste a los cultivos Serranía y Sutagao que mantuvieron niveles bajos en todos los tiempos de evaluación (Figura 3-2). De manera similar, el gen *PR-4* (el cual también codifica para quitinasas), mostró mayor expresión a los 5 y 7 dpi en G2333 y en el cultivar susceptible Sutagao. Estas evidencias indican que *PR-3* y *PR-4* elevan significativamente su expresión a partir de los 5 dpi (Figura 3-2 y 3-3).

El gen *Pv-ERF*, que codifica para factores de transcripción asociados en respuesta a etileno, se indujo en todos los materiales de frijol evaluados mostrando cambios significativos a partir de las 24 hpi. La expresión de éste gen fue predominante en los cultivos Serranía y Sutagao, ya que el parental G2333 presentó menores niveles en comparación con éstos.

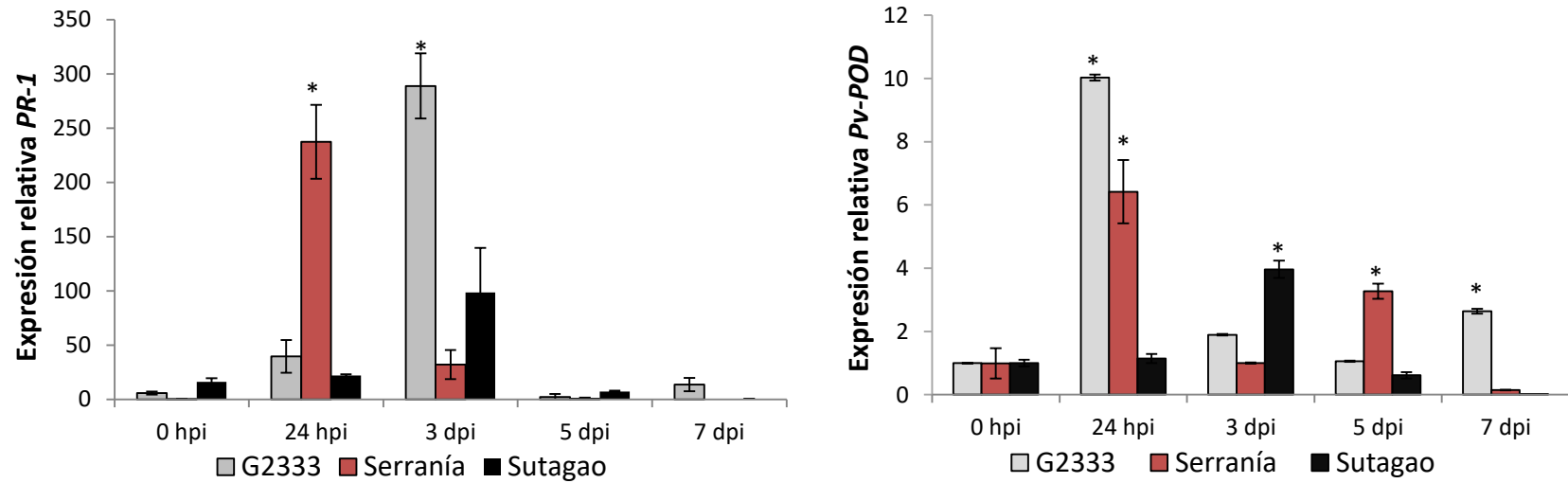


Figura 3-1: Expresión relativa de los genes *PR-1* y *PvPOD* de *Phaseolus vulgaris* L. en los frijoles G2333, Serranía y Sutagao durante su interacción con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. El análisis de expresión se llevó a cabo realizando una qPCR en tiempo real. El gen *PvEF1- α* de *P. vulgaris* L. fue usado como gen de referencia. Las hojas fueron colectadas a las 0 y 24 hpi y a los 3, 5 y 7 dpi. Las barras de error representan la media SD de $n=3$. Los asteriscos indican las diferencias significativas ($P \leq 0.05$ por Tukey).

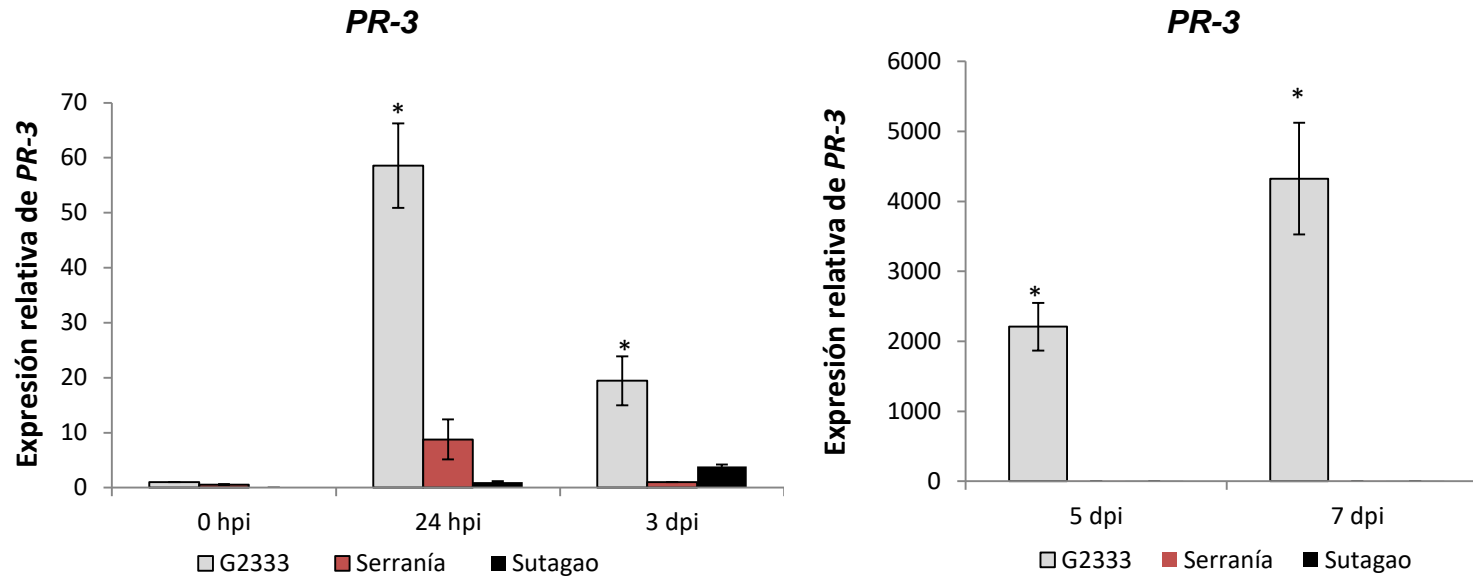


Figura 3-2: Expresión relativa del gen *PR-3* de *Phaseolus vulgaris* L. en los frijoles G2333, Serranía y Sutagao durante su interacción con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. El análisis de expresión se llevó a cabo realizando una qPCR en tiempo real. El gen *PvEF1-α* de *P. vulgaris* L. fue usado como gen de referencia. Las hojas fueron colectadas a las 0 y 24 hpi y a los 3, 5 y 7 dpi. Las barras de error representan la media SD de $n=3$. Los asteriscos indican las diferencias significativas ($P \leq 0.05$ por Tukey).

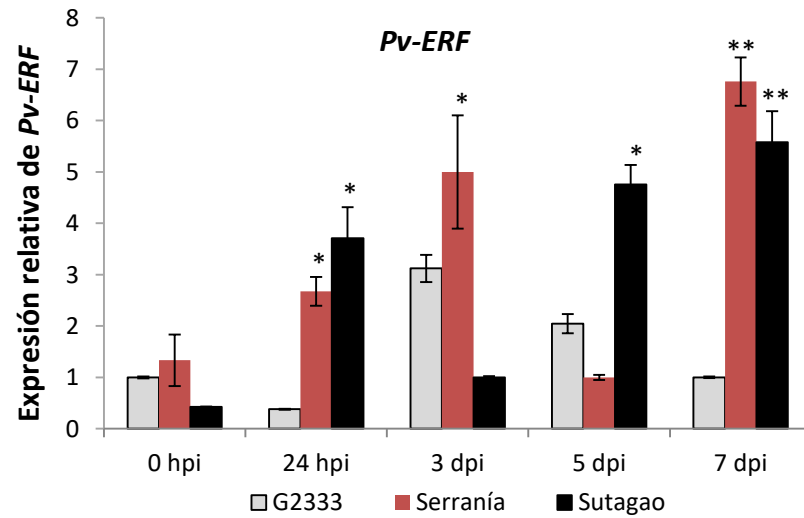
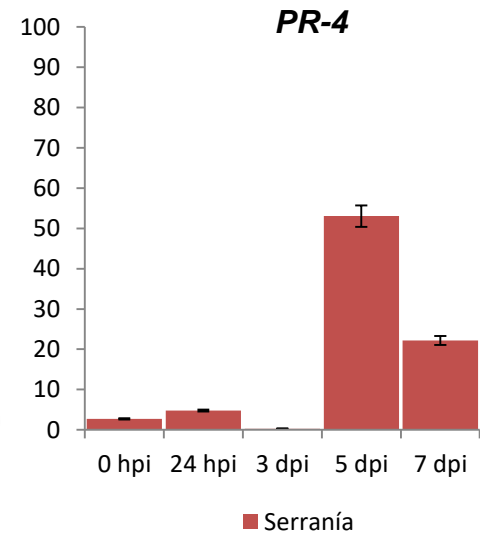
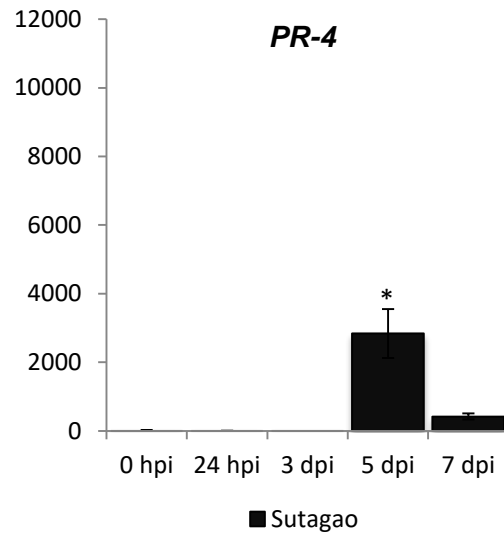
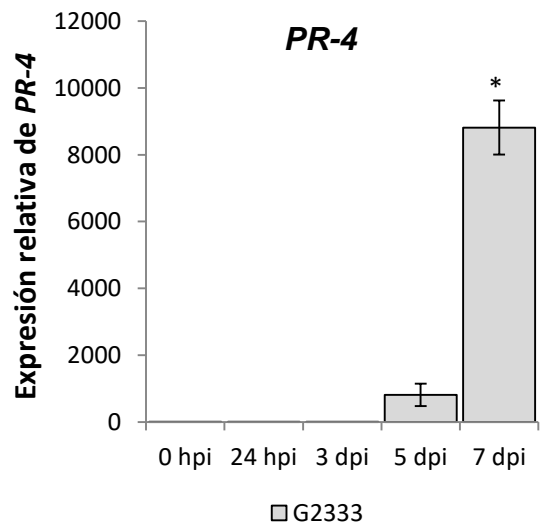


Figura 3-3: Expresión relativa de los genes *PR-4* y *PV-ERF* de *Phaseolus vulgaris* L., en los frijoles G2333, Serranía y Sutagao durante su interacción con la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*. El análisis de expresión se llevó a cabo realizando una qPCR en tiempo real. El gen *PvEF1-α* de *P. vulgaris* L. fue usado como gen de referencia. Las hojas fueron colectadas a las 0 y 24 hpi y a los 3, 5 y 7 dpi. Las barras de error representan la media SD de $n=3$. Los asteriscos indican las diferencias significativas ($P \leq 0.05$ por Tukey).

3.5 Discusión

Las plantas al ser organismos sésiles están expuestas a múltiples estreses que pueden provocar pérdidas en la producción agrícola. No obstante, estos organismos han desarrollado diversos mecanismos celulares que le permiten contrarrestar las condiciones adversas ocasionadas por un factor de tipo biótico o abiótico. Estas respuestas generalmente hacen parte de redes complejas que activan cambios en la membrana celular, vías de señalización, expresión de genes y regulación de procesos metabólicos (Ali et al., 2017a). En el presente estudio se analizó la expresión de algunos genes de defensa en *P. vulgaris* L. frente a un agente estresante como lo es *C. lindemuthianum*. Para ello, se utilizaron dos materiales de frijol que mostraron resistencia a la raza 7 del patógeno y uno susceptible. Los frijoles resistentes, G2333 y Serranía que indicaron portar los genes *Co-4²* y *Co-5*, y el frijol sutagao que reveló la ausencia del locus *Co-5* y una delección en el alelo *Co-4²*, en el gen *COK-4*, fueron utilizados para evaluar la relación de ambos genes *Co* con la activación temprana de mecanismos de defensa.

Para esta evaluación, se analizaron los niveles de expresión de algunos genes que codifican para proteínas PRs y enzimas que participan en la inducción de respuestas contra patógenos (Sudisha et al., 2011). Entre las PRs se evaluaron *PR-1* y dos quitinasas, *PR-3* y *PR-4*, las cuales se expresaron diferencialmente a las 24 hpi y a los 3, 5 y 7 dpi en los materiales de frijol (Figura 3-1, 3-2 y 3-3). *PR-1* y *PR-3* fueron inducidas tempranamente en los frijoles resistentes G2333 y en Serranía a partir de las 24 hpi, en contraste al frijol Sutagao que mantuvo bajos niveles. Estos resultados indican que una vez dada la detección del patógeno se induce la síntesis de proteínas hidrolíticas (quitinasas) y compuestos antifúngicos, para restringir al hongo en el sitio de infección y activar otras vías de defensa mediante el reconocimiento de ligandos provenientes del daño generado en *C. lindemuthianum* (Islam, et al., 2010). Se ha descrito que las

proteínas PR-3 son una familia de quitinasas que son secretadas en el apoplasto para degradar componentes de la pared celular de hongos, de manera que, inhiben el crecimiento y progresión del microorganismo (Islam, et al., 2010; Sudisha et al., 2011; Ali, et al., 2018). No obstante, también se les ha vinculado debido a su actividad lítica, con la liberación de elicitores provenientes de la pared celular del agente infeccioso, para estimular la inducción de respuestas de defensa en las células adyacentes y así acelerar los mecanismos asociados con resistencia (Datta, et al., 1999).

Adicionalmente, otros de los genes evaluados fueron *PR-1* y *PvPOD*. *PR-1* es considerado como un indicador de señalización del ácido salicílico (AS), ha sido descrito como un gen que codifica para proteínas de función antifúngica (Ali et al., 2018), y asociado a inmunidad inducida como respuestas de hipersensibilidad y resistencia sistémica adquirida (SAR), las cuales hacen parte de los mecanismos activados en plantas que muestran resistencia a patógenos (Ali et al., 2017b). Este gen mostró cambios de expresión a las 24 hpi en Serranía y a los 3 dpi en G2333 los cuales fueron resistentes a la raza 7 de *C. lindemuthianum*, demostrando que durante estos tiempos la vía hormonal inducida fue la del AS, hecho que contrastó en el cultivar susceptible Sutagao que evidenció bajos niveles de expresión del gen respecto a los frijoles resistentes.

PvPOD que codifica para una peroxidasa, también mostró incrementos a las 24 hpi en los materiales resistentes G2333 y Serranía, con respecto al frijol susceptible Sutagao, el cual reveló bajos niveles en este tiempo. Las peroxidases son un grupo de enzimas de actividad antioxidante, que actúan sobre sustratos como H_2O_2 para generar modificaciones en la pared celular en respuesta a patógenos (Smirnov y Arnaud, 2019). El H_2O_2 acompañado por incrementos de peroxidases favorece la síntesis de lignina, el cual es un complejo de polímeros formados por una mezcla de fenil propanoides que se almacena en el apoplasto para el reforzamiento de la pared celular, de modo que, la lignina se une a polímeros de celulosa, hemicelulosa y a glicoproteínas en los estados tempranos de infección de hongos para limitar el ingreso y crecimiento de estructuras infectivas (Dzhavakhiya, et al., 2007). El cultivar susceptible Sutagao a los 3 dpi mostró incrementos significativos de *PvPOD* en comparación a los resistentes G2333 y Serranía, sin embargo, dicho incremento fue menor en relación a las 24 hpi, indicando esto una respuesta tardía en comparación a los frijoles resistentes.

Los cambios en *PR-1*, *PR-3* y *PvPOD* a las 24 hpi en G2333 y Serranía, coincide con la etapa de penetración del patógeno (previamente evaluada), respuesta que podría vincularse con la vía hormonal del AS, ya que se ha reportado que bajo aplicaciones exógenas de esta hormona, se inducen los genes *PR-1*, *PR-3*, *PR-5* y peroxidasas contra *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* en cebada (Yang et al., 2015). Por lo tanto, se puede inferir que en los primeros tiempos de evaluación (24 hpi y 3 dpi), la vía hormonal inducida en la planta frente a *C. lindemuthianum* es la del AS.

Sin embargo, *PR-3* y *PR-4* mostraron mayores niveles de expresión a los 5 y 7 dpi en el parental resistente G2333 (Figura 3-2 y 3-3). Tanto *PR-3* como *PR-4* están asociadas a la vía hormonal del ácido jasmónico (AJ) (relacionado con defensa a patógenos necrótrofos y heridas), para el establecimiento de una resistencia local adquirida (Ali, et al., 2018). Se ha reportado que *PR-4* es inducida bajo tratamientos con ABA (ácido abscisico) y metil jasmonato y es reprimido con ácido salicílico (AS), etileno o H₂O₂ (Wang, et al., 2011). *PR-4* ha sido catalogada como una quitinasa con actividad antifúngica de amplio espectro contra hongos como *Rhizoctonia solani*, *R. cerealis*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum* y *Trichoderma reesei* (Kang, et al., 2017). De acuerdo a los resultados obtenidos en G2333, *PR-4* tuvo una alta expresión a los 5 y 7 dpi, indicando que en estos tiempos de evaluación se activaron vías relacionadas con AJ (esencial para la activación de PRs dependientes de esta fitohormona). Cabe señalar que estas vías hormonales son antagónicas, ya que la inducción de AS y AJ se dio en diferentes momentos de la interacción entre *P. vulgaris* y *C. lindemuthianum*, para lograr una mayor resistencia al patógeno.

El gen *PV-ERF* que codifica para factores de transcripción asociados en respuesta a etileno, se expresó en todos los materiales de frijol evaluados. En el parental resistente G2333 sus niveles fueron bajos a los 5 y 7 dpi, mientras que los cultivares Serranía y Sutagao mostraron incrementos significativos a las 24 hpi y 3 dpi (Figura 3-3). El etileno es una fitohormona de acción sinérgica con AS y AJ, puede favorecer la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (SIR), de modo que regula positivamente la expresión de genes vinculados con defensa, entre éstos, algunos PRs como *PR-1* asociado a AS (Yang et al., 2015). La inducción del gen *PV-ERF* durante la interacción *P. vulgaris* - *C. lindemuthianum* aún no nos es clara, de manera que se debe estudiar junto con otros genes dependientes de etileno para conocer su papel en la defensa contra *C. lindemuthianum*.

Todos estos resultados revelan que los loci *Co-4*² y *Co-5* presentes en el parental G2333 y en el cultivar Serranía, son necesarios para la inducción temprana de mecanismos de defensa, ya que la inducción de *PR-1*, *PR-3* y *PvPOD* muestra hacer parte de las primeras respuestas activadas por la planta una vez se ha dado la detección de *C. lindemuthianum*. En contraste a estos resultados, el cultivar susceptible Sutagao mostró menores incrementos de los genes *PR-1*, *PR-3* y *PvPOD*, pudiéndose esto asociar a la delección presentada en el gen *COK-4* y a la ausencia del marcador asociado al locus *Co-5*, lo cual pudo haber favorecido el ingreso y posteriormente el establecimiento de la raza 7 de *C. lindemuthianum* en el tejido vegetal. Estos hallazgos evidencian que tanto *COK-4* como *Co-5* participan en la detección temprana del microorganismo y la activación de la inmunidad en *P. vulgaris* L.

3.6 Referencia bibliográfica

Ali, S., Mir, Z., Bhat, J., Chandrashekar, N., Papolu, P., Rawat, S., Grover, A. (2017a) Identification and comparative analysis of *Brassica juncea* pathogenesis-related genes in response to hormonal, biotic and abiotic stresses. *Acta Physiol. Plant.*, 39 (12): 1-15. doi:10.1007/s11738-017-2565-8.

Ali, S., Mir, Z., Bhat, J., Tyagi, A., Chandrashekar, N., Yadav, P., Rawat, S., Sultana, M., Grover, A. (2017b). Isolation and characterization of systemic acquired resistance marker gene *PR1* and its promoter from *Brassica juncea*. *3 Biotech*, 8 (1). doi:10.1007/s13205-017-1027-8.

Ali. S., Ganai, B., Kamili, A., Bhat, A., Mir, Z., Bhat, J., Tyagi, A., Islam, S., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., Grover, A. (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212–213: 29-37. doi: 10.1016/j.micres.2018.04.008.

Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (1999) Occurrence and Properties of Plant Pathogenesis-Related Proteins. *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. 1st Edition. p.1-20 doi.org/10.1201/9781420049299.

De Queiroz, C.B., Correia, H.L., Santana, M.F., Batista, D.S., Vidigal, P.M., Brommonschenkel, S.H., de Queiroz, M. (2019) The repertoire of effector candidates in

Colletotrichum lindemuthianum reveals important information about *Colletotrichum* genus lifestyle. Appl Microbiol Biotechnol. doi: 10.1007/s00253-019-09639-9.

Dzhavakhiya, V.G., Ozeretskoykaya, O.L., Zinovyeva, S.V. (2007). Immune response. Comprehensive and Molecular Phytopathology, 265–314. doi:10.1016/b978-044452132-3/50014-6.

Fontenelle, M., Santana, M., Clossen, A., Bazzoli, D., Bromonschenkel, S., Araújo, E., Queiroz M. (2017) Differential expression of genes during the interaction between *Colletotrichum lindemuthianun* and *Phaseolus vulgaris*. Eur J Plant Pathol 147: 653. doi:10.1007/s10658-016-1033-4.

Guerrero, M., Rodríguez, M., Rodríguez, R., González, M., Sanchez, F., Jiménez, F. (2011). Differential expression of *Phaseolus vulgaris* genes induced during the interaction with *Rhizoctonia solani*. Plant Cell Rep (2011) 30:1465–1473, DOI 10.1007/s00299-011-1055-5.

Gust, A., Pruitt, R., Nürnberger, T. (2017) Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. Trends in Plant Science, 22(9), 779–791. doi:10.1016/j.tplants.2017.07.005.

Han, G. (2018) Origin and evolution of the plant immune system. New Phytologist 222: 70–83. doi: 10.1111/nph.15596.

Heil, M., Land, W. (2014) Danger signals – damaged-self recognition across the tree of life. Front. Plant Sci. 5: 578. doi: 10.3389/fpls.2014.00578.

Herrera-Vásquez A, Salinas, P., Holuigue, L. (2015) Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. Front. Plant Sci. 6:171. doi: 10.3389/fpls.2015.00171.

Islam, M. A., Sturrock, R.N., Williams, H.L., Ekramoddoullah, A.K. (2010) Identification, Characterization, and Expression Analyses of Class II and IV Chitinase Genes from Douglas-Fir Seedlings Infected by *Phellinus sulphurascens*. Phytopathology, 100 (4): 356-66. doi:10.1094/PHYTO-100-4-0356.

Jones, J., Dangl, J. (2006) The plant immune system. Nature. 444: 323-329. doi:10.1038/nature05286.

Kang, J.N., Park, M.Y., Kim, W.N., Kang, H.G., Sun, H.J., Yang, D.H., Ko, M.S, Lee, H.Y. (2017). Resistance of transgenic zoysiagrass overexpressing the zoysiagrass class II chitinase gene *Zjchi2* against *Rhizoctonia solani* AG2-2 (IV). Plant Biotechnology Reports, 11(4): 229–238. doi:10.1007/s11816-017-0445-8.

Kimura, S., Waszczak, C., Hunter, K., Wrzaczek, M. (2017) Bound by Fate: The Role of Reactive Oxygen Species in Receptor-Like Kinase Signaling. The Plant Cell, Vol. 29: 638–654. doi: 10.1105/tpc.16.00947.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 2 5(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Mayo, S., Gutiérrez, S., Malmierca, MG., Lorenzana, A., Campelo, MP., Hermosa, R., Casquero, PA. (2015) Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. In growth of vean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. Front. Plant Sci. 6: 685. doi: 10.3389/fpls.2015.00685.

Miklas, P.N., Kelly, J.D., Beebe, S.D., Blair, M.W. (2006). Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. Euphytica 147: 105–131.

Oliveira, MB., de Andrade, RV., Grossi-de-Sá, MF., Petrofeza, S. (2015) Analysis of genes that are differentially expressed during the *Sclerotinia sclerotiorum*–*Phaseolus vulgaris* interaction. Front. Micro biol. 6: 1162. doi:10.3389/fmicb.2015.01162.

Pastor-Corrales M. (1991) Estandarización de variedades diferenciales y designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. Phytopathology 81: 694.

Padder, B., Sharma, P., Awale, H., Kelly, J. (2017) *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. Plant Pathol. 99 (2): 317-330. doi:10.4454/jpp.v99i2.3867.

Pedroza-P, M., Rodriquez-A, K., Ligarreto-M, G., Rincón-R, L., González-A, A. (2019) Deleción en el gen de resistencia *Co-4²* de *Phaseolus vulgaris* L. afecta la activación temprana de defensa contra *Colletotrichum lindemuthianum* REV. Fitopatología Colombiana, memorias. 43 (2): 181.

Smirnoff, N., Arnaud, D. (2019) Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*. 221: 1197–1214. doi: 10.1111/nph.15488.

Sudisha, J., Sharathchandra, R.G., Amruthesh, K.N., Kumar, A., Shetty, H.S. (2011). Pathogenesis Related Proteins in Plant Defense Response. *Plant Defence: Biological Control*, 379–403. doi:10.1007/978-94-007-1933-0_17.

Wang, N., Xiao, B., Xiong, L. (2011). Identification of a cluster of *PR4*-like genes involved in stress responses in rice. *Journal of Plant Physiology*, 168 (18): 2212–2224. doi:10.1016/j.jplph.2011.07.013.

Yang, Y.X., Ahammed, G., Wu, C., Fan, S., Zhou, Y.H. (2015). Crosstalk among Jasmonate, Salicylate and Ethylene Signaling Pathways in Plant Disease and Immune Responses. *Current Protein and Peptide Science*, 16(5): 450–461. doi:10.2174/1389203716666150330141638.

3.7 Material suplementario

Tabla suplementaria 3-1: Oligonucleótidos de *Phaseolus vulgaris* L. utilizados para el análisis de PCR en tiempo real.

Gen	Función del gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5'-3') ^a	Referencia
<i>PvEF1-α</i>	Factor de elongación 1	<i>EF1 α -F</i>	CGGGTATGCTGGTGACTTTT	Mayo et al., 2015
		<i>EF1 α -R</i>	CACGCTTGAGATCCTTGACA	
<i>PR-1</i>	Antifúngico	<i>PR1 -F</i>	TGGTCCTAACGGAGGATCAC	Mayo et al., 2015
		<i>PR1 -R</i>	TGGCTTTTCCAGCTTTGAGT	
<i>PR-3</i>	Quitinasa	<i>PR3 -F</i>	ATTGTTGTGCCAATCCCTTT	Oliveira et al., 2015
		<i>PR3 -R</i>	CACCGCCATACAGTTCAAAA	
<i>PR-4</i>	Quitinasa	<i>PR4 -F</i>	CGCAGTGAGTGCATATTGCT	Mayo et al., 2015
		<i>PR4 -R</i>	TGTTTGTCCACCCTCAAGCAC	
<i>Pv-POD</i>	Peroxidasa II	<i>POD -F</i>	TCCTTTTCAGCACTTTCACT	Oliveira et al., 2015
		<i>POD -R</i>	AGAAAGCAGTGTTCTTGTGG	
<i>α -Actina</i>	Actina	<i>α -Actina -F</i>	GAGCTATGAATTGCCTGATGG	Mayo et al., 2015
		<i>α -Actina -R</i>	CGTTTCATGAATTCCAGTAGC	
<i>PvERF</i>	Factor de transcripción de respuesta a etileno	<i>ERF -F</i>	TCGGTATAGAGGGATTCCGGAGAA	Guerrero et al., 2011
		<i>ERF -R</i>	TCATTTGGGAAGTTAAGAATGGCTC	

^a Cada una de las secuencias de oligonucleótidos fueron comparadas contra la base de datos del GenBank mediante la herramienta BLASTN para confirmar su función, tamaño del producto amplificable y su homología con *P. vulgaris* L.

4. Discusión final

En la interacción planta-patógeno se desata una batalla de dos organismos por sobrevivir. El primero evitará ser enfermado utilizando armas físicas y químicas para bloquear el ingreso del potencial invasor. Así mismo, el segundo generará los mecanismos necesarios para bloquear la defensa y poder infectar (De Queiroz, et al., 2018). En este trabajo, se evaluaron ambos tipos de mecanismos vegetales, barreras físicas y químicas que son inducidas en la planta para evitar el progreso de un patógeno. Para ello se analizaron deposiciones de calosa, producción de H_2O_2 en los sitios de ataque e inducción de genes relacionados con defensa. Esto en relación con la presencia o ausencia de genes de resistencia *Co* de *P. vulgaris* L. a *C. lindemuthianum*.

Nuestros resultados indican que el marcador molecular SAS13 asociado al alelo *Co-4²* codifica para un receptor tipo quinasa (RLK) nombrado como COK-4, que de acuerdo a su homología con RLKs de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* tiene como función probable la detección de ligandos asociados a daño en la pared celular vegetal (DAMPs), dada su similitud con la proteína FERONIA que presenta dominios tipo malectina y está involucrada en la detección de pectina (Nissen et al., 2015). Además, se sugiere que podría interactuar con otros receptores de PAMPs o MAMPs durante la interacción planta-patógeno (Feng et al., 2018; Franck et al., 2018). El gen *COK-4* se encontró mutado en el cultivar Sutagao, además de la ausencia del marcador asociado a *Co-5*. Posteriormente mediante ensayos de patogenicidad, se determinó que dicho material de frijol fue susceptible a la raza 7 de *C. lindemuthianum*, en contraste a G2333 y el cultivar Serranía, que presentaron los loci *Co-4²* y *Co-5*. Los incrementos en la producción de H_2O_2 y deposiciones de calosa en G2333 y en el cultivar Serranía fueron evidentes a las 24 hpi y 3 dpi. Estos resultados indican que en los materiales de frijol resistentes, una vez efectuado los intentos de penetración del patógeno la planta fue capaz de detectar moléculas conservadas tipo PAMPs y de origen vegetal, mediante RLKs y PRRs que indujeron tempranamente la acumulación de compuestos antimicrobianos como H_2O_2 en el apoplasto y reforzamiento de la pared celular por deposición de calosa, para bloquear el ingreso del hongo (Kadota et al., 2015; Saxena et al., 2016). El H_2O_2 es considerado un segundo mensajero que participa tanto en la PTI (PAMP-Triggered Immunity) como en la ETI (Effector-Triggered Immunity) para permitir la expresión de genes relacionados con defensa (Kadota et al., 2015). Se ha descrito que la síntesis de AS está vinculada con la

producción de H_2O_2 , presenta un papel dual en los estadios iniciales de la infección. En una primera fase el AS permite la producción de H_2O_2 , pero posteriormente induce la reducción de sus niveles por la acción de enzimas anti-oxidantes como la glutatióna peroxidasa y peroxidases para regular la transcripción de genes de defensa y producción de lignina (Potters et al., 2010; Kapoor et al., 2015; Herrera-Vásquez et al., 2015; Yang et al., 2015). El gen de la peroxidasa, *PvPOD*, se expresó tempranamente (24 hpi) en los frijoles resistentes G2333 y Serranía, confirmando que dichos procesos metabólicos fueron ejecutados posterior a la detección del patógeno. En contraste, el cultivar susceptible Sutagao no mostró cambios en la producción de H_2O_2 , en deposiciones de calosa y en la expresión de genes como *PR-1*, *PR-3* (quitinasas) y *PvPOD* durante las 24 hpi. De manera que, estos resultados junto con las evaluaciones histológicas realizadas, indican que *C. lindemuthianum* inicia los intentos de penetración cerca de las 24 hpi con la formación de la puntilla de penetración del apresorio. A partir de este tiempo, el hongo comienza el establecimiento de su hifa biótrofa con la formación de la vesícula infectiva e hifas primarias en el material susceptible. En contraste, el frijol resistente G2333 acumuló H_2O_2 y calosa debajo del apresorio a las 24 hpi inhibiendo la penetración y la formación de la vesícula infectiva. Esto demuestra que el cultivar Sutagao no detectó tempranamente al patógeno para la inducción de respuestas de defensa, lo cual favoreció el progreso de la infección del hongo y el desarrollo de la enfermedad, a diferencia de G2333 que se mostró resistente a la raza 7 de *C. lindemuthianum*.

La fuerte inducción de *PR-4* (quitinasas), en Sutagao a los 5 y 7 dpi, podría interpretarse como una activación tardía de mecanismos de defensa, intentos en limitar la invasión del patógeno. Sin embargo, en las evaluaciones de patogenicidad a los 9 dpi las plantas evaluadas en su gran mayoría murieron. De modo que, la expresión significativa de *PR-4* en el frijol resistente G2333 estaría asociado a una resistencia local inducida y al fortalecimiento de la defensa ante la presencia de la raza 7 de *C. lindemuthianum* (Ali et al., 2018).

Con base a los resultados obtenidos en esta investigación se muestran dos modelos biológicos que representan algunos de los mecanismos de defensa inducidos en una planta resistente (Figura 4-1) y en una planta susceptible (Figura 4-2) durante la interacción *P. vulgaris* L. – raza 7 de *C. lindemuthianum*.

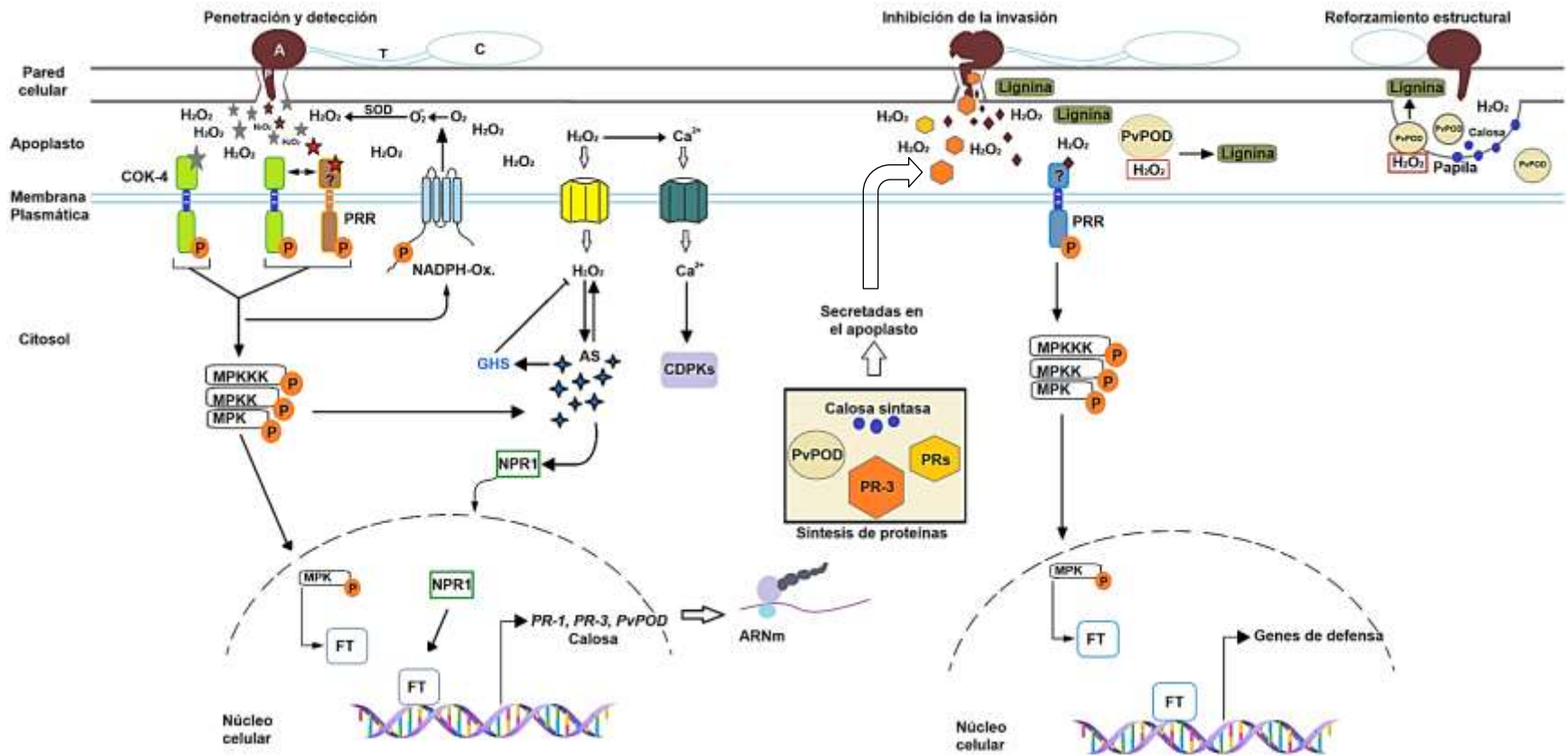


Figura 4.1: Modelo de detección e inducción de respuestas tempranas de defensa durante la interacción *Phaseolus vulgaris* – *Colletotrichum lindemuthianum* a partir de las 24 horas posteriores a la inoculación en una planta resistente. Durante los eventos de penetración del patógeno, el receptor COK-4 tipo RLK homólogo a FER, detecta DAMPs provenientes de la pared celular o llega a interactuar con PRRs de PAMPs, lo cual permite la activación de cascadas de señalización tipo MAPK y de NADPH-oxidasa que está localizada en la membrana celular para la producción de H₂O₂, lo cual generará cambios en el flujo de iones Ca²⁺ hacia el citosol. Así mismo, el ingreso de H₂O₂ induce vías de señalización hormonal como AS, la cual controlará los niveles de H₂O₂ mediante glutatona peroxidasa. El incremento de AS permitirá la activación de reguladores de transcripción como NPR1 para la inducción de genes *PRs* y peroxidasas. Las enzimas sintetizadas serán transportadas al apoplasto para inhibir el crecimiento del patógeno, generar modificaciones en la pared celular y activar otras PRRs. **C**, conidia; **T**, tubo germinativo; **A**, apresorio; **P**, puntilla de penetración; **RLK**, receptor tipo quinasa; **PRR**, receptor de reconocimiento de PAMPs; **SOD**, superóxido dismutasa; **MPK**, proteína quinasa activada por mitógenos; **MPKK**, MAPK quinasa; **MPKKK**, MAPKK quinasa; **AS**, ácido salicílico; **GHS**, glutatona peroxidasa; **CDPK**, proteína quinasa dependiente de calcio; **NPR1**, NONEXPRESSER PR GENES1; **PvPOD**, peroxidasa de *P. vulgaris* L.; **PR-3**, quitinasa; **PRs**, proteínas relacionadas con defensa inducible. Este modelo fue realizado teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la literatura revisada.

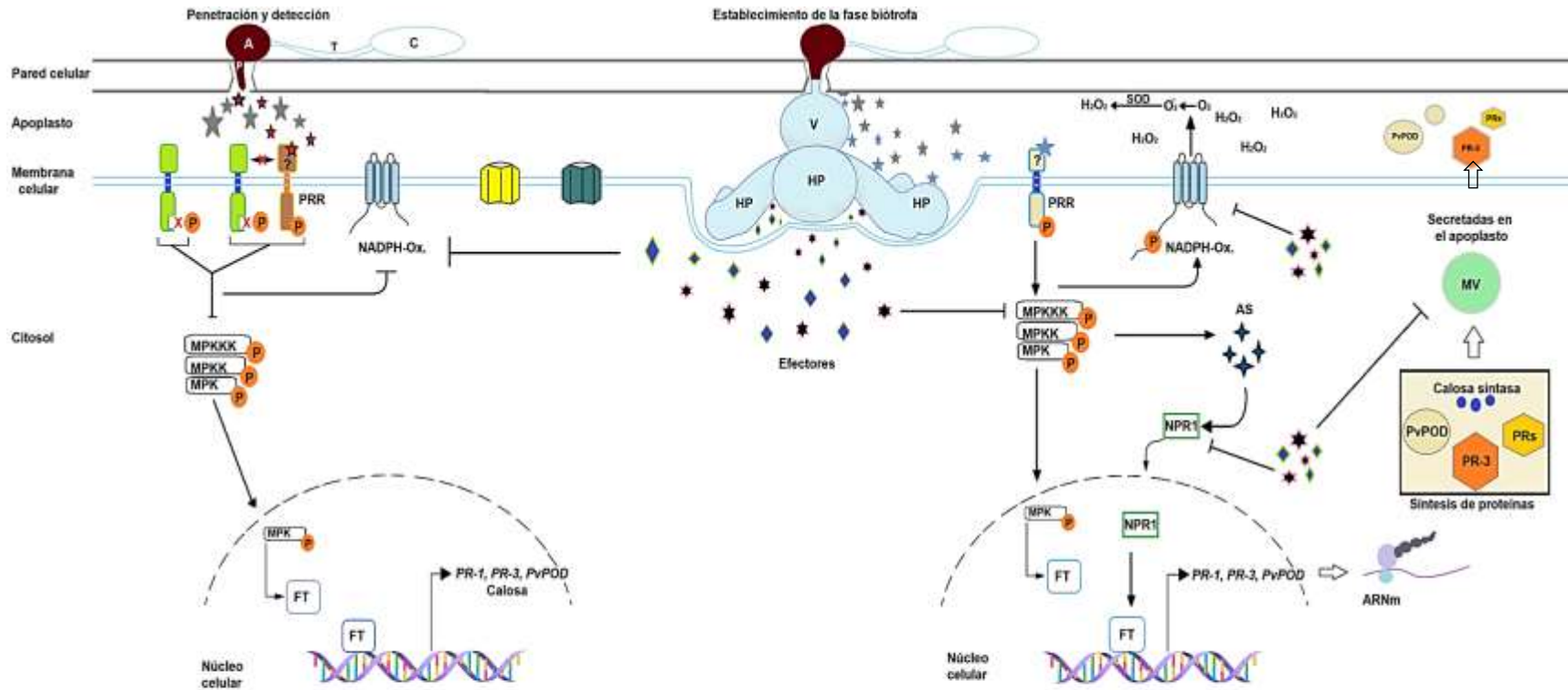


Figura 4-2: Modelo de penetración y establecimiento de la fase biótrofa de *Colletotrichum lindemuthianum* en plantas susceptibles de *Phaseolus vulgaris* L. La mutación en los sitios de catalíticos y de unión de ATP en la proteína COK-4 tipo RLK homólogo a FER, afecta los eventos de fosforilación del dominio quinasa, por tanto, cascadas de señalización tipo MPK, la interacción con PRRs de PAMPs y la activación de NADPH-oxidasa es alterada, favoreciendo el ingreso y el establecimiento de la fase biótrofa del hongo. El desarrollo de la vesícula infectiva e hifas primarias actúan como plataformas que liberan proteínas efectoras y metabolitos secundarios, los cuales son movilizados hasta el citosol y actúan sobre blancos de la planta para inhibir respuestas de defensa en el hospedero. Cabe destacar que las moléculas involucradas en inmunidad como H₂O₂, PvPOD, PR-3 y PR-1 son inducidas tardíamente. **C**, conidia; **T**, tubo germinativo; **A**, apresorio; **P**, puntilla de penetración; **V**, vesícula de infección; **HP**, hifa primaria; **RLK**, receptor tipo quinasa; **PRR**, receptor de reconocimiento de PAMPs; **MPK**, proteína quinasa activada por mitógenos; **MPKK**, MAPK quinasa; **MPKKK**, MAPKK quinasa; **AS**, ácido salicílico; **NPR1**, NONEXPRESSER PR GENES1; **MV**, movimiento por vesículas, proteínas secretoras; **PvPOD**, peroxidasa de *P. vulgaris* L.; **PR-3**, quitinasa; **PRs**, proteínas relacionadas con defensa inducible. Este modelo fue realizado teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la literatura revisada.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El presente estudio permitió determinar que las deposiciones de calosa y el H₂O₂ son inducidos tempranamente en los sitios de ataque del patógeno en frijoles resistentes al ser sometidos a la infección de la raza 7 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Se sugiere que el gen *COK-4* y el locus *Co-5* participan en la activación temprana de la inmunidad vegetal en variedades de frijol común que presentan genes de resistencia a *C. lindemuthianum*.

Se comprobó que en materiales de frijol común resistentes a *C. lindemuthianum*, la vía hormonal inducida durante las primeras horas de sometimiento a la infección del patógeno, es la del ácido salicílico, seguida días después por la del ácido jasmónico, para una mayor resistencia al hongo.

5.2 Recomendaciones

Realizar estudios enfocados en identificar regiones codificantes asociadas al gen *Co-5* y evaluar su papel en la resistencia a razas andinas de *C. lindemuthianum*.

Evaluar la expresión y validar la función del gen *COK-4* en variedades de frijol común resistentes y susceptibles al patógeno, bajo la infección de *C. lindemuthianum*.

Comprobar la interacción entre el receptor *COK-4* con receptores de reconocimiento de PAMPs durante la interacción frijol común-*C. lindemuthianum*.

Analizar el papel de la hormona de etileno en la inducción de resistencia o susceptibilidad al hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum*.

Mantener el uso de marcadores moleculares asociados a los genes *Co* en cultivares liberados en campo para la selección de material vegetal resistente a *Colletotrichum lindemuthianum* y con características comerciales deseables.

5.3 Referencia bibliográfica

Ali. S., Ganai, B., Kamili, A., Bhat, A., Mir, Z., Bhat, J., Tyagi, A., Islam, S., Mushtaq, M., Yadav, P., Rawat, S., Grover, A. (2018) Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212–213: 29-37. doi: 10.1016/j.micres.2018.04.008.

De Queiroz, C.B., Correia, H.L., Santana, M.F., Batista, D.S., Vidigal, P.M., Brommonschenkel, S.H., de Queiroz, M. (2019) The repertoire of effector candidates in *Colletotrichum lindemuthianum* reveals important information about *Colletotrichum* genus lifestyle. *Appl Microbiol Biotechnol*. doi: 10.1007/s00253-019-09639-9.

Feng, W., Kita, D., Peaucelle, A., Cartwright, H., Doan, V., Duan, Q., Ming-Che Liu, Maman, J., Steinhorst, L., Schmitz-Thom, I., Yvon, R., Kudla, J., Hen-Ming Wu, Cheung, A., Dinneny, J. (2018) The FERONIA Receptor Kinase Maintains Cell-Wall Integrity during Salt Stress through Ca^{2+} Signaling. *Curr Biol*. 28 (5): 666–675. doi:10.1016/j.cub.2018.01.023.

Franck, C.M., Westermann, J., Boisson-Dernier, A. (2018). Plant Malectin-Like Receptor Kinases: From Cell Wall Integrity to Immunity and Beyond. *Annual Review of Plant Biology*, 69 (1): 301–328. doi:10.1146/annurev-arplant-042817-040557.

Herrera-Vásquez A, Salinas, P., Holuigue, L. (2015) Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Front. Plant Sci.* 6:171. doi: 10.3389/fpls.2015.00171.

Kadota, Y., Shirasu, K., Zipfel, C. (2015) Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiol.* 56 (8): 1472–1480 doi:10.1093/pcp/pcv063.

Kapoor, D., Sharma, R., Handa, N., Kaur, H., Rattan, A., Yadav, P., Gautam, V., Kaur, R., Bhardwaj, R. (2015) Redox homeostasis in plants under abiotic stress: role of electron carriers, energy metabolism mediators and proteinaceous thiols. *Front. Environ. Sci.* 3:13. doi: 10.3389/fenvs.2015.00013.

Nissen, K., Willats, W., Malinovsky, F. (2015) Understanding CrRLK1L Function: Cell Walls and Growth Control. *Trends Plant Sci.* 21 (6): 516-527. doi:10.1016/j.tplants.2015.12.004.

Potters, G., Horemans, N., Jansen, M.A. (2010) The cellular redox state in plant stress biology – A charging concept. *Plant Physiol Biochem.* 48 (5): 292-300. doi:10.1016/j.plaphy.2009.12.007.

Saxena, I., Srikanth, S., Chen, Z. (2016) Cross Talk between H₂O₂ and Interacting Signal Molecules under Plant Stress Response. *Front. Plant Sci.* 7:570. doi: 10.3389/fpls.2016.00570.

Yang, Y.X., Ahammed, G., Wu, C., Fan, S., Zhou, Y.H. (2015). Crosstalk among Jasmonate, Salicylate and Ethylene Signaling Pathways in Plant Disease and Immune Responses. *Current Protein and Peptide Science*, 16(5): 450–461. doi:10.2174/1389203716666150330141638.