

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA “ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ANÁLOGOS A GENES DE RESISTENCIA
NBS-LRR FRENTE A *PHYTOPHTHORA INFESTANS* EN UNA ACCESIÓN DE
LA VARIEDAD WIRA PASÑA (CIP 704270) DE *SOLANUM GONIOCALYX***

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE BACHILLER
EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA**

AUTORA:

JOHANA ALEJANDRA REÁTEGUI MIRANDA

ASESOR:

MSc. LIDIO EDGAR NEYRA VALDEZ

LIMA – PERÚ

2021

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	3
I. ESTADO DEL ARTE	7
1.1. Resistencia en plantas	7
1.1.1. Clasificación tradicional de la resistencia	7
1.1.1.1. Resistencia cualitativa	7
1.1.1.1.1. Los genes R poseen dominios NBS-LRR	8
1.1.1.2. Resistencia cuantitativa	10
1.1.2. Relación entre los genes R y los QRL	11
1.1.2.1. Análogos a genes de resistencia (RGAs)	12
1.2. <i>Phytophthora infestans</i> causa la enfermedad del tizón tardío en la papa ...	12
1.2.1. Características del patógeno y manifestaciones en la planta	12
1.2.2. Resistencia en plantas como método de control de la plaga en los países en desarrollo	13
1.2.3. Genes de resistencia en papa contra <i>Phytophthora infestans</i>	14
1.3. La transcriptómica en el estudio de resistencia en plantas	15
1.3.1. Empleo de la transcriptómica como herramienta para la búsqueda de genes de resistencia	15
1.3.2. Herramientas bioinformáticas comúnmente empleadas en la selección de RGAs	17
II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	18
III. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	19
IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
ANEXO	25

RESUMEN

La resistencia en plantas se clasifica en cualitativa y cuantitativa acorde a la resistencia fenotípica observada ante un patógeno. La cualitativa está dada por los genes *R*, que codifican a proteínas con el dominio NBS-LRR y confieren resistencia completa ante patógenos específicos. Por el contrario, la cuantitativa está dada por los *loci de resistencia cuantitativa* (QRL), que agrupan genes con menor efecto individual, pero en conjunto confieren amplia resistencia. Sin embargo, algunos genes *R* están localizados en QRL y confieren resistencia cuantitativa. Por ello, los homólogos a genes *R*, llamados *análogos a genes de resistencia* (RGAs), pueden ser considerados como *R* o parte de QRL, y es posible identificarlos en genomas secuenciados mediante herramientas bioinformáticas basándose en el dominio NBS-LRR.

La enfermedad del tizón tardío, causada por *Phytophthora infestans*, es la más devastadora del cultivo de la papa. En los países en desarrollo, donde el manejo con fungicidas es inadecuado y las pérdidas productivas amenazan la seguridad alimentaria de los agricultores, las plantas resistentes son una alternativa atractiva para una agricultura sostenible.

Se han identificado genes de resistencia a *P. infestans* en diferentes especies de papa para ser empleados en fitomejoramiento, así como RGAs. Sin embargo, no existen estudios genéticos de resistencia en papas nativas peruanas pese a la amplia diversidad existente. Como antecedente, una accesión de la variedad Wira Pasña (CIP 704270) de *Solanum goniocalyx* mostró resistencia fenotípica contra la cepa POX 67 de *P. infestans* y se ha realizado un análisis transcriptómico comparativo en hoja contra el patógeno con esta y una accesión susceptible de la misma especie. A partir de este análisis de RNA-seq, el objetivo del presente trabajo será **identificar RGAs NBS-LRR en la accesión resistente**

de la variedad Wira Pasña (CIP 704270) de *S. goniocalyx* mediante herramientas bioinformáticas, siendo esta aproximación empleada en estudios similares.

Palabras clave: gen R, NBS-LRR, QRL, *Phytophthora infestans*, papa

ABSTRACT

Resistance in plants is classified as qualitative and quantitative according to the phenotypic resistance observed against a pathogen. The qualitative resistance is given by the R genes, which encode proteins with the NBS-LRR domain and confer complete resistance to specific pathogens. On the other hand, the quantitative resistance is given by the *quantitative resistance loci (QRL)*, which group genes with less individual effect but together confer broad resistance. However, some R genes are located in QRL and confer quantitative resistance. For this reason, homologues to R genes, called *resistance gene analogs (RGAs)*, can be considered as R or part of QRL and based on the NBS-LRR domain it is possible to identify them in sequenced genomes using bioinformatics tools. The late blight, caused by *Phytophthora infestans*, is the most devastating disease of the potato crop. In developing countries, where fungicide management is inadequate and production losses threaten the food security of farmers, resistant plants are an attractive option for sustainable agriculture.

Resistance genes to *P. infestans* have been identified in different potato species to be used in plant breeding, as well as RGAs. However, there are no genetic studies of resistance in native Peruvian potatoes despite the wide existing diversity. As background information, an accession of the Wira Pasña variety (CIP 704270) of *Solanum goniocalyx* showed phenotypic resistance against the POX 67 strain of *P. infestans* and a comparative transcriptomic analysis in leaf against the pathogen with this and a susceptible accession of the same species has been carried out. From this RNA-seq analysis, the objective of the present work will be to identify NBS-LRR RGAs in the resistant accession of the Wira Pasña variety (CIP 704270) of *S. goniocalyx* using bioinformatic tools, being this approach used in similar studies.

Keywords: R gen, NBS-LRR, QRL, *Phytophthora infestans*, potato

I. ESTADO DEL ARTE

1.1. Resistencia en plantas

1.1.1. Clasificación tradicional de la resistencia

Según la resistencia fenotípica evidenciada ante un patógeno, esta puede ser clasificada en cualitativa o cuantitativa. La resistencia cualitativa refiere a una completa o alto nivel de resistencia, o a una segregación bimodal de los fenotipos en una progenie, clasificando a los individuos en resistentes o susceptibles. Por otra parte, la resistencia cuantitativa refiere a una parcial o bajo nivel de resistencia, o a una distribución continua entre los fenotipos resistentes y susceptibles en una progenie como resultado de la segregación de alelos de efecto variable en diferentes loci (1).

1.1.1.1. Resistencia cualitativa

También es llamada resistencia específica, hipersensible, completa o vertical (2). Esta es la resistencia a una especie de patógeno, o a una cepa de este, dada por una interacción gen-por-gen: cada gen de resistencia dominante (gen *R*) en el hospedero corresponde con un gen de avirulencia dominante (gen *avr*) en el patógeno. En este caso, la mayoría de genes *R* codifican a proteínas (proteínas *R*) citoplasmáticas que poseen un *sitio de unión de nucleótidos* (NBS) y dominios *repetidos ricos en leucina* (LRR), conocidas como proteínas NBS-LRR o NLRs (3). Debido a esto, los genes *R* pueden ser identificados mediante herramientas bioinformáticas (4).

En la mayoría de los casos, la resistencia mediada por genes *R* desencadena la respuesta hipersensible (HR), la cual consiste en la

muerte celular programada de las células infectadas para evitar la propagación del patógeno a los tejidos sanos, entre otras respuestas más (3).

1.1.1.1.1. Los genes R poseen dominios NBS-LRR

Muchos de los genes R en plantas pertenecen a la familia de *sitios de unión a nucleótidos ricos en repeticiones de leucina* (NBS-LRR: *nucleotide binding site leucine-rich repeat*) (5). Esto quiere decir que codifican a proteínas que contienen los dominios NBS y LRR. El dominio NBS es responsable de la unión e hidrólisis de ATP y GTP (6), mientras que el dominio LRR generalmente funciona como un detector de la invasión de patógenos.

La base del funcionamiento de la proteína NBS-LRR como detector es la interacción del dominio NBS, también llamado NB-ARC, con la mitad N-terminal del dominio LRR en ausencia del efector producido por el patógeno. Una vez que ocurre el reconocimiento del efector del patógeno por la mitad C-terminal del dominio LRR, el dominio NBS sufre un cambio conformacional de un estado condensado unido a ADP a un estado abierto unido a ATP, exponiendo de esta manera la parte N-terminal del dominio LRR y desencadenando reacciones hipersensibles downstream (5,7).

Las proteínas NBS-LRR también pueden contener otros dominios en los extremos amino y carboxilo terminal. Con

respecto a esto, se han encontrado tres tipos de dominios en el extremo N-terminal de las proteínas NBS-LRR: el *receptor Toll/Interleukin-1* (TIR), *Coiled-coil* (CC) y *resistencia a powdery mildew8* (RPW8). Por consiguiente, los genes de resistencia NBS-LRR se dividen en las subclases TIR-NBS-LRR (TNL), CC-NBS-LRR (CNL) y RPW8-NBS-LRR (RNL). Las proteínas TNL y CNL son responsables del reconocimiento específico de patógenos, mientras que las RNL ayudan en la transducción de señales de defensa downstream (5).

A su vez, las proteínas NBS-LRR en plantas también pueden ser divididas en cuatro categorías: típicas, truncas, con dominios atípicos y con ensamblaje atípico. Las proteínas típicas son las pertenecientes a las tres subclases antes mencionadas (TNL, CNL y RNL) y las truncas son aquellas a las que les falta al menos uno de los dominios TIR, CC o RPW8, o incluso los principales NBS o LRR. En cambio, las que poseen dominios atípicos tienen los dominios principales NBS y LRR pero ninguno de los dominios TIR, CC o RPW8, conteniendo en lugar de estos dominios como WRKY (unión a ADN), LIM, SD (especialmente encontrado en solanáceas), PK (dominio proteína kinasa), entre otros. Por otra parte, las de ensamblaje atípico pueden contener los dominios TIR, CC o RPW8 en el extremo C-terminal en lugar del N-terminal, o

presentar más de uno de esos dominios o de los principales NBS y LRR (8).

En cuanto a los mecanismos por los que las proteínas NBS-LRR reconocen al patógeno, estos pueden ser muy variados, existiendo mecanismos directos, indirectos, por dominios integrados o, en algunos casos, aún desconocidos. En el reconocimiento directo, ocurre una interacción directa entre el efector del patógeno y la proteína NBS-LRR. Por el contrario, en el mecanismo indirecto el reconocimiento se desencadena ya sea por la unión del efector a un componente del hospedero o por una modificación mediada por el efector en el componente, de manera que es percibido por la proteína NBS-LRR. Asimismo, en el caso de ser por dominios integrados, el reconocimiento se desencadena por la unión del efector a un dominio o por una modificación a este, estando este dominio integrado a una proteína NBS-LRR (9).

1.1.1.2. Resistencia cuantitativa

También es llamada resistencia general, no específica, de campo, incompleta u horizontal. Esta es la resistencia a diferentes patógenos. Está dada por muchos genes cuantitativos, los cuales se localizan en los *loci de resistencia cuantitativa* (QRL) e individualmente tienen un efecto parcial en la resistencia. Por lo tanto, evidencian una reducción en la magnitud de la enfermedad más que una ausencia de esta (2). A pesar de ello, la resistencia cuantitativa ha ganado mayor interés en los programas

de fitomejoramiento por ser considerada más duradera que la conferida por los genes *R* (1). Cabe resaltar que, a diferencia de los genes *R*, los QRL generalmente son identificados por mapeos de asociación (4). En adición, los genes cuantitativos contenidos en estos QRL también pueden ser identificados en base a candidatos seleccionados por tener alguna función en la ruta del ácido jasmónico, en base a un análisis transcriptómico comparativo entre dos genotipos con niveles contrastantes de resistencia cuantitativa (RNAseq) o por estudios de asociación de genoma completo (GWAS) (10).

1.1.2. Relación entre los genes *R* y los QRL

Una de las hipótesis que explica el mecanismo que subyace a la resistencia cuantitativa es la que afirma que son genes *R* “débiles”, dado que se han encontrado genes *R* co-localizados con QRL en varias especies de plantas, incluyendo papa (2,11,12). Además, se han encontrado QRL que confieren resistencia específica, incluso varios de estos se han identificado contienen como genes NBS-LRR. A su vez, también existen genes *R* que confieren resistencia parcial (2). Tal es el caso del gen *R8*, un NBS-LRR que se encontró en el QRL *dPI09c* junto con otros genes *R* de menor efecto y se demostró era el que confería la resistencia cuantitativa contra tizón tardío al locus (13). Por ello, se cree que la resistencia cualitativa y cuantitativa son parte de un proceso continuo en el que los genes de resistencia comienzan siendo genes *R*, cuya efectividad es reducida por la evolución del patógeno, y terminan convirtiéndose en componentes de un QRL (2).

Por otro lado, la detección del mismo locus como gen R o QRL puede ser explicada por factores tales como la forma alélica del gen (alelos de resistencia completa “derrotados” podrían ser detectados como QRL), la cepa del patógeno (conferir resistencia completa para un cepa pero para otras no), la escala que se emplea para evaluar la resistencia o el trasfondo genético (12).

1.1.2.1. Análogos a genes de resistencia (RGAs)

Los *análogos a genes de resistencia* (RGAs) son genes *R* potenciales, u homólogos a genes *R*, que poseen dominios conservados y características estructurales con roles específicos en las interacciones hospedero-patógeno. Estos RGAs pueden ser encontrados en genomas secuenciados mediante herramientas bioinformáticas y ayudan a co-localizar QRL en los mapeos (14) al ser empleados como marcadores para estos locus (12). Por otra parte, los RGAs se clasifican en dos grandes grupos: los genes NBS-LRR y los genes TM-LRR, que codifican a receptores intracelulares y receptores de membrana, respectivamente (14).

1.2. *Phytophthora infestans* causa la enfermedad del tizón tardío en la papa

1.2.1 Características del patógeno y manifestaciones en la planta

Phytophthora infestans es un oomiceto que causa la enfermedad del tizón tardío en la papa. La población global de este patógeno cambia constantemente, surgiendo nuevas cepas agresivas y asegurando que el tizón tardío continúe siendo una amenaza para la seguridad alimentaria (15).

En *P. infestans*, el ciclo asexual predomina y es el devastador, caracterizado por el rápido crecimiento de la población en tejidos vulnerables de la planta (16).

Las esporas asexuales, también llamadas zoosporas, son el agente propagador de la enfermedad. Estas son móviles, mononucleadas y sin pared, especializadas para la dispersión (17).

A nivel macroscópico, no hay síntomas visibles en la planta por al menos los primeros 2 días de infección. Luego de este tiempo, se pueden observar pequeñas manchas necróticas en el tejido. Pasados 1 o 2 días más, en presencia de temperaturas moderadas y humedad o agua, se forman los esporangióforos (hifa especializada que dará origen al esporangio que contiene las zoosporas) y el ciclo comienza otra vez (Ver **Fig. 1** del **ANEXO**). Son susceptibles hojas, tallos y tubérculos. Los esporangios se lavan de las lesiones en las hojas y caen al suelo teniendo contacto con los tubérculos. Los tubérculos infectados son vulnerables a pudrirse por acción de bacterias. Dada la corta duración del ciclo asexual y la capacidad del patógeno de infestar casi toda la planta, además de poder ser propagado a grandes distancias, en poco tiempo *P. infestans* puede destruir un cultivo completo (16).

1.2.1. Resistencia en plantas como método de control de la plaga en los países en desarrollo

El tizón tardío puede ser controlado de manera eficaz empleando fungicidas; sin embargo, muchos de estos presentan un riesgo para el ambiente y la salud, sobre todo en los países en desarrollo donde los agricultores de pequeña escala no emplean protección física al aplicarlos manualmente. A esto se suma el hecho de que en los países en desarrollo la enfermedad es manejada de manera deficiente por la alta presión que ejerce el patógeno, problemas de acceso a los fungicidas, abuso de la dosis de aplicación, el desconocimiento de la dinámica

de la enfermedad por parte de los agricultores, entre otros. Además, la cadena de comercialización muchas veces prioriza cultivares susceptibles en lugar de resistentes por preferir otros atributos. Por ello, una alternativa sostenible al uso de pesticidas es el desarrollo y empleo de cultivares altamente resistentes que cumplan con las demandas de producción del mercado. Para esto es necesario ampliar la base genética de la resistencia en papa para aumentar las probabilidades de encontrar resistencias duraderas (18).

1.2.1. Genes de resistencia en papa contra *Phytophthora infestans*

Los primeros genes de resistencia caracterizados contra *Phytophthora infestans* en papa fueron los 11 genes *R* (*R1-R11*) identificados en la especie mexicana *Solanum demissum*, los cuales fueron altamente explotados siendo transferidos a muchas otras especies de papa en los programas de cruce y fitomejoramiento (19). Además, al menos 20 QRL se han identificado en los 12 cromosomas del genoma de la papa secuenciado de *Solanum tuberosum* (4). Cabe resaltar los casos de genes *R* que se encontraron en QRL, como el gen NBS-LRR *R8* que se mencionó anteriormente confería la resistencia cuantitativa al locus *dPI09c* (13).

En adición, se han identificado genes de resistencia contra *Phytophthora infestans* en *Solanum phureja* (4,6), un pariente de *Solanum goniocalyx* (20). En un estudio realizado en 2012 en *Solanum phureja* (también llamado *Solanum tuberosum* grupo phureja y de la cual se cuenta con el genoma secuenciado), se anotaron 435 secuencias homólogas a genes *R* (RGAs) que contenían el dominio NBS, de los cuales 179 eran pseudogenes. Además, se encontraron 142 genes derivados de NBS, los cuales habían perdido este dominio, todo esto mediante

herramientas bioinformáticas (6). Por otro lado, en un estudio realizado en 2017 se asociaron mediante mapeo de asociación dos genes con QRL reportados para resistencia al tizón tardío, los genes *StTL15A* y *StGP28*, los cuales contenían SNPs (polimorfismos de nucleótido simple). El gen *StTL15A* se mapeó a una posición correspondiente al QRL *Pin6b* (*Ib6b* en tomate), mientras que el gen *StGP28* se localizó entre los QRL *Ib6a* y *Pin6b-Ib6b*. Sin embargo, estos dos genes asociados a QRL no poseían el dominio NBS (4).

1.3. La transcriptómica en el estudio de resistencia en plantas

1.3.1. Empleo de la transcriptómica como herramienta para la búsqueda de genes de resistencia

El análisis comparativo del transcriptoma de genotipos resistentes y susceptibles a un estrés proporciona nuevos conocimientos sobre los mecanismos de respuesta de la planta y permite identificar candidatos a genes de resistencia. En base a esto, se han encontrado genes NBS-LRR en las especies de maní silvestre *Arachis stenosperma* y *Arachis duranensis* con diferente nivel de resistencia al nemátodo de raíz *Meloidogyne arenaria*. En este caso, se buscaron genes NBS-LRR en ambas especies de maní ya que ninguna tenía baja susceptibilidad para la cepa de nemátodo empleada (*A. stenosperma* era altamente resistente y *A. duranensis* era moderadamente susceptible). Además, se consideraron como genes diferencialmente expresados (DEG) aquellos que tenían un valor p ajustado (FDR) < 0.05 con respecto al control, independientemente del fold-change, ya que en plantas la sobreexpresión de genes NBS-LRR generalmente es baja. Gracias a este punto de corte escogido, se encontraron 37 DEG NBS-LRR en *A. duranensis* y 27 en *A. stenosperma*, entre subexpresados y

sobrexpresados, de los cuales 12 eran comunes a ambas especies. Además, 4 genes NBS-LRR exclusivamente expresados en la especie altamente resistente *A. stenosperma* se localizaron dentro de clusters en el cromosoma Aradu. A09, el cual contiene un QRL para este nemátodo, sugiriendo un papel funcional para esta disposición física y su potencial participación en esta respuesta de defensa (21).

Por otra parte, la interacción de la papa con *Phytophthora infestans* también ha sido estudiada por análisis seriales de expresión diferencial (SAGE) (22,23) y por RNA-seq (24,25), en los que los DEG son una fuente de nuevos candidatos a genes de resistencia, tanto de genes R como de genes cuantitativos en QRL. Además, la expresión de genes no es la misma en los diferentes tejidos, pudiendo observarse una mayor expresión en hojas que en tubérculos para ciertos genes de resistencia, como es el caso del gen *RB* (24). Cabe resaltar que la transcriptómica en hoja es más estudiada para el caso de *P. infestans*, ya que el proceso invasivo comienza aquí y luego las esporas del patógeno se dispersan a los tubérculos de la papa (16).

En cuanto al tiempo de expresión de los genes NBS-LRR, no parece haber un patrón común a todos. Tal es el caso de los 4 genes NBS-LRR contra *P. infestans* encontrados en un análisis de transcriptómica para el perfil genético del genotipo SD20 de *Solanum tuberosum*. Estos genes se expresaron diferencialmente en distintos momentos de los tres tiempos evaluados (24, 48 y 72 horas post-inoculación). Cabe resaltar que en el RNAseq de este genotipo SD20 se empleó como punto de corte el fold-change > 2, ya que se trataba de un perfil genético de todo el transcriptoma y no una búsqueda específica de genes NBS-LRR (25),

siendo tal vez esta la razón por la cual se encontraron tan pocos genes NBS-LRR.

1.3.2. Herramientas bioinformáticas comúnmente empleadas en la selección de RGAs

Las aproximaciones computacionales para la predicción de las funciones proteicas son atractivas hoy en día dado lo costosas y prolongadas que pueden resultar las investigaciones experimentales de caracterización de proteínas. La minería y caracterización de los homólogos a genes R (RGAs) en plantas mediante herramientas bioinformáticas es posible gracias a las significativas características estructurales y a los dominios conservados que poseen las proteínas codificadas por estos genes. Para la identificación de RGAs y predicción de sus funciones son necesarias diversas herramientas bioinformáticas, tales como el alineamiento de secuencias, búsqueda con BLAST, análisis filogenético y análisis de dominios y motivos. En base a esto, la identificación y caracterización de RGAs generalmente sigue cuatro pasos:

1. Generar una base de datos de RGAs que incluya todos los RGAs y secuencias proteicas conocidas de plantas, las cuales deben estar curadas. Como ejemplo, se tienen las bases de datos GenBank y PRGdb.
2. Realizar una búsqueda BLAST contra la base de datos para identificar candidatos a RGA. Se debe usar un punto de corte bajo, pudiendo ser el valor E entre $1e^{-5}$ a 1 dependiendo del tamaño del genoma.
3. Ingresar los candidatos a RGA en diferentes softwares para detectar dominios conservados y motivos y realizar alineamientos. Se pueden emplear

diferentes softwares en paralelo, tales como pfam_scan.pl, InterproScan, HMMER, MEME, entre otros.

4. Crear un script de clasificación para agrupar a los candidatos a RGA en clases según sus dominios y motivos (14).

II. PROBLEMA

La diversidad es clave en la producción de alimentos, ya que contribuye a una agricultura sostenible mediante el acceso a la diversidad genética y al material necesario para impulsar la innovación y adaptación a nuevos procesos. En el Perú, las papas nativas se han ido desarrollado comercialmente en los últimos años, generando ingresos para los pequeños productores. Además, las papas nativas pueden ser una fuente complementaria de hierro y zinc, sobre todo para las poblaciones vulnerables (26). Sin embargo, las plagas y enfermedades disminuyen el desarrollo nutricional y económico de los productores, sobre todo si no se tiene un adecuado manejo sanitario. Como consecuencia, los pequeños productores emplean fungicidas de manera indiscriminada que dañan la salud y el ambiente (18) o se ven forzados a buscar variedades de papa de mayor resistencia y rendimiento, dejando de cultivar las papas nativas y ocasionando la pérdida del germoplasma en ciertas zonas (27). Es por ello que pese a existir variedades resistentes de papa altamente comerciales, es necesario encontrar resistencias en papas nativas peruanas.

La principal enfermedad que afecta el cultivo de la papa es el tizón tardío, causada por el oomiceto patógeno *Phytophthora infestans* (4). Dada la capacidad del patógeno de invadir hojas, tallo y tubérculos, su rápido desarrollo y fácil propagación, este puede llegar a destruir un cultivo completo en poco tiempo (16). Por otra parte, si bien existen estudios genéticos en papas comerciales, como *S. phureja*, en los que se han identificado

genes de resistencia NBS-LRR contra *P. infestans* (6), en papas nativas solo se han realizado estudios de resistencia fenotípica. En uno de estos estudios, dos accesiones, una de la variedad Wira Pasña (CIP 704270) y otra de la variedad Pampina (CIP 703831), ambas de la especie *Solanum goniocalyx*, resaltaron al mostrar resistencia fenotípica contra la cepa POX 67 de *P. infestans*, teniendo para ambos casos un valor de susceptibilidad de solo 2.85 en la escala de Yuen y Forbes (escala que tiene números ascendentes para un aumento en la susceptibilidad y cuyo cálculo requiere de un control susceptible común), en la que un valor de 9 era el de mayor susceptibilidad (28). La variedad Wira Pasña ya se comercializa en los supermercados de Lima (26), de manera que es una opción atractiva para la búsqueda de genes de resistencia.

Cabe resaltar que a la fecha no existen estudios publicados en los que se evalúe a nivel molecular la presencia de genes de resistencia frente a *P. infestans* en *S. goniocalyx*. Sin embargo, la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en colaboración con el Centro Internacional de la Papa, ha realizado un análisis transcriptómico comparativo en hoja entre una variedad resistente (Wira Pasña) y una susceptible de *S. goniocalyx* frente a *P. infestans* (no publicado). Debido a esto, la identificación mediante herramientas bioinformáticas de *análogos a genes de resistencia* (RGA) en la variedad Wira Pasña de *S. goniocalyx* es factible y podría fortalecer los programas de mejoramiento genético en el Perú. Por lo tanto, **el objetivo del presente trabajo será identificar RGAs NBS-LRR en la accesión resistente de la variedad Wira Pasña (CIP 704270) de *S. goniocalyx* mediante herramientas bioinformáticas a partir del análisis de RNA-seq comparativo previo con la variedad susceptible.**

III. ESTRATEGIA DE ABORDAJE

Se buscarán *análogos a genes de resistencia* (RGA) NBS-LRR en la accesión CIP 704270 de la variedad Wira Pasña de *S. goniocalyx* contra la cepa POX 67 de *P. infestans* en base a un análisis transcriptómico en hoja ya realizado. Para ello, se trabajará con los genes diferencialmente expresados (DEG) en la variedad Wira Pasña a las 24, 48 y 72 horas post inoculación (hpi) del patógeno y que no se hayan encontrado en la variedad susceptible Sumaq Perqa (CIP 703777). Cabe resaltar que la elección de los tiempos se basa en la identificación de RGAs NBS-LRR en estos tres momentos en el genotipo SD20 de *S. tuberosum* en un estudio realizado en el 2018 (25). Además, al tratarse de una búsqueda de genes NBS-LRR, se considerarán como diferencialmente expresados los transcritos que presenten un valor p ajustado (FDR) < 0.05 en relación al control (tiempo 0, pre-inoculación), ya que este tipo de genes generalmente tiene un bajo fold-change, de manera que se podrían perder muchos NBS-LRR si se empleara como punto de corte el fold-change > 2 usado comúnmente en los análisis transcriptómicos (21). Luego de esto, se empleará la metodología que se aplicó para la identificación de RGAs NBS-LRR en el genoma de *S. phureja* en un estudio del 2012. Para ello, se examinarán las secuencias proteicas predichas y depositadas en el The Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC) para estos genes mediante el software HMMER usando el Modelo Oculto de Markov (HMM) correspondiente a la familia NBS (NB-ARC) de la base de datos Pfam (PF00931; <http://pfam.xfam.org/>). De los candidatos obtenidos, las proteínas con alta calidad (<1e-60) serán alineadas mediante CLUSTAL W para crear un nuevo HMM específico de estos NBS empleando la herramienta “hmmbuild”. Con este nuevo modelo específico para *S. goniocalyx*, se volverá a examinar las secuencias proteicas. Se escogerán como proteínas candidatas las que presenten un umbral < 1e-2. Por otra parte, los dominios asociados TIR y LRR serán detectados en estas proteínas candidatas mediante el software HMMER, empleando los dominios sin procesar de la base de datos

Pfam. Posteriormente, se hará la validación mediante los dominios conservados en el NCBI y el software MEME. Además, para identificar el dominio CC se empleará el programa MARCOIL con un umbral de probabilidad de 90 y posteriormente validado con PAIRCOIL2 empleando un punto de corte $p < 0.025$ (6). Finalmente, se realizará un análisis de expresión por qRT-PCR para la validación de los RGAs evaluando su expresión a las 24, 48 y 72 hpi en comparación con el tiempo 0 (pre-inoculación) (21,24).

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pilet-Nayel M-L, Moury B, Caffier V, Montarry J, Kerlan M-C, Fournet S, et al. Quantitative Resistance to Plant Pathogens in Pyramiding Strategies for Durable Crop Protection. *Front Plant Sci.* 2017;8.
2. Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci.* 2009;14(1):21–29.
3. Balint-Kurti P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Mol Plant Pathol.* 2019;20(8):mpp.12821.
4. Álvarez MF, Angarita M, Delgado MC, García C, Jiménez-Gomez J, Gebhardt C, et al. Identification of Novel Associations of Candidate Genes with Resistance to Late Blight in *Solanum tuberosum* Group Phureja. *Front Plant Sci.* 2017;8.
5. Shao Z-Q, Xue J-Y, Wang Q, Wang B, Chen J-Q. Revisiting the Origin of Plant NBS-LRR Genes. *Trends Plant Sci.* 2019;24(1):9–12.
6. Lozano R, Ponce O, Ramirez M, Mostajo N, Orjeda G. Genome-Wide Identification and Mapping of NBS-Encoding Resistance Genes in *Solanum tuberosum* Group Phureja. Ahlenstiel G, editor. *PLoS One.* 2012;7(4):e34775.
7. Takken FL, Govere A. How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Curr Opin Plant Biol.* 2012;15(4):375–384.

8. Li X, Kapos P, Zhang Y. NLRs in plants. *Curr Opin Immunol.* 2015;32:114–121.
9. Kourelis J, van der Hoorn RAL. Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *Plant Cell.* 2018;30(2):285–299.
10. Mosquera T, Alvarez MF, Jiménez-Gómez JM, Muktar MS, Paulo MJ, Steinemann S, et al. Targeted and Untargeted Approaches Unravel Novel Candidate Genes and Diagnostic SNPs for Quantitative Resistance of the Potato (*Solanum tuberosum* L.) to *Phytophthora infestans* Causing the Late Blight Disease. Yin T, editor. *PLoS One.* 2016;11(6):e0156254.
11. Gebhardt C, Valkonen JPT. Organization of Genes Controlling Disease Resistance in the Potato Genome. *Annu Rev Phytopathol.* 2001;39(1):79–102.
12. Danan S, Veyrieras JB, Lefebvre V. Construction of a potato consensus map and QTL meta-analysis offer new insights into the genetic architecture of late blight resistance and plant maturity traits. *BMC Plant Biol.* 2011;11.
13. Jiang R, Li J, Tian Z, Du J, Armstrong M, Baker K, et al. Potato late blight field resistance from QTL dPI09c is conferred by the NB-LRR gene R8. *J Exp Bot.* 2018;69(7):1545–55.
14. Sekhwal M, Li P, Lam I, Wang X, Cloutier S, You F. Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. *Int J Mol Sci.* 2015;16(8):19248–90.
15. Whisson SC, Boevink PC, Wang S, Birch PR. The cell biology of late blight disease. *Curr Opin Microbiol.* 2016;34:127–135.
16. Fry W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol Plant Pathol.* 2008;9(3):385–402.
17. Judelson HS, Blanco FA. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(1):47–58.

18. Forbes GA, Huarte M. La resistencia al tizón tardío como herramienta de control en los países en desarrollo. *Rev Latinoam la Papa*. 2014;18(2):37–58.
19. Akino S, Takemoto D, Hosaka K. *Phytophthora infestans*: a review of past and current studies on potato late blight. *J Gen Plant Pathol*. 2014;80(1):24–37.
20. Soto Torres JV. Análisis de la diversidad genética de papa nativa (*Solanum* spp.) de los departamentos de Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huancavelica y Puno-Perú, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2006.
21. Zotta-Mota AP, Vidigal B, Danchin EGJ, Coiti-Togawa R, Leal-Bertioli SCM, Bertioli DJ, et al. Comparative root transcriptome of wild *Arachis* reveals NBS-LRR genes related to nematode resistance. *BMC Plant Biol*. 2018;18(1):159.
22. Draffehn AM, Li L, Krezdorn N, Ding J, Lübeck J, Strahwald J, et al. Comparative transcript profiling by SuperSAGE identifies novel candidate genes for controlling potato quantitative resistance to late blight not compromised by late maturity. *Front Plant Sci*. 2013;4.
23. Gyetvai G, Sønderkær M, Göbel U, Basekow R, Ballvora A, Imhoff M, et al. The transcriptome of compatible and incompatible interactions of potato (*Solanum tuberosum*) with *Phytophthora infestans* revealed by DeepSAGE analysis. *PLoS One*. 2012;7(2).
24. Gao L, Bradeen JM. Contrasting Potato Foliage and Tuber Defense Mechanisms against the Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans*. Wong S-M, editor. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159969.
25. Yang X, Guo X, Yang Y, Ye P, Xiong X, Liu J, et al. Gene profiling in late blight resistance in potato genotype SD20. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
26. Ordinola M, Fonseca C, Vela AM, Devaux A. Desarrollando innovaciones para

- la seguridad alimentaria y nutricional con base en la biodiversidad. International Potato Center; 2014.
27. Rodríguez Garate VS. Evaluación de la incidencia de plagas y enfermedades en el rendimiento de 100 entradas de papas nativas (*Solanum spp*) en la comunidad campesina de Llullucha distrito de Ocongate - Quispicanchi - Cusco. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2018.
28. Pérez W, Ñahui M, Ellis D, Forbes GA. Wide Phenotypic Diversity for Resistance to *Phytophthora infestans* Found in Potato Landraces from Peru. *Plant Dis.* 2014;98(11):1530–1533.

ANEXO

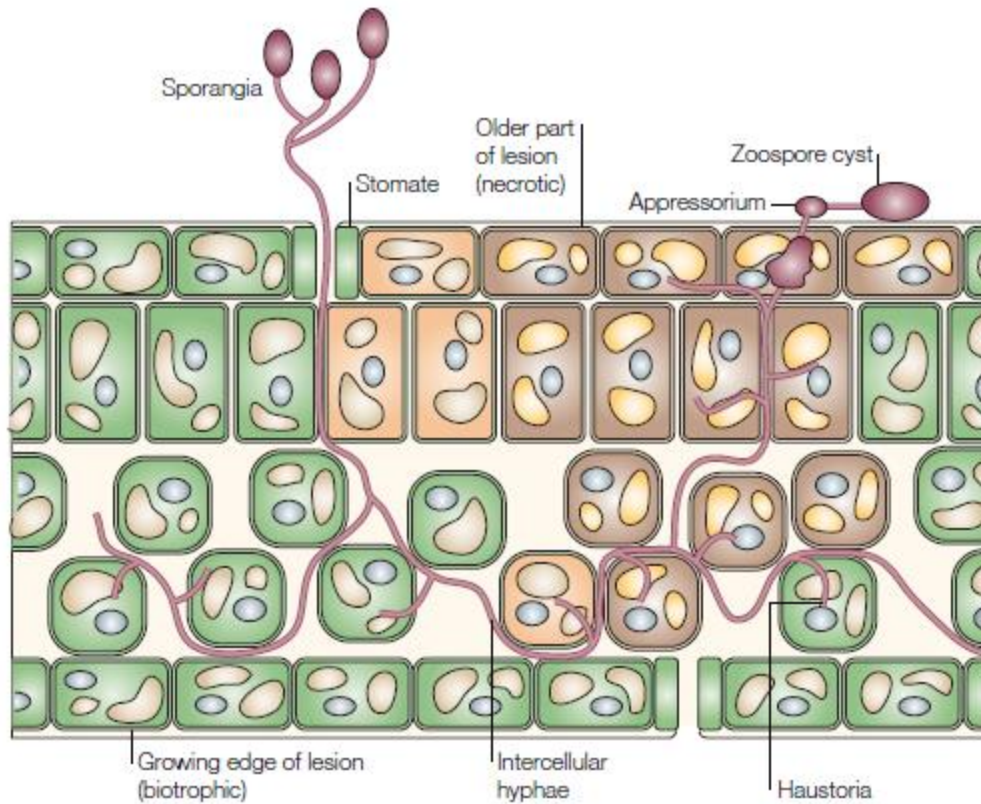


Fig. 1. Proceso de infestación por *Phytophthora infestans*. Extraído de Judelson HS, Blanco FA. *The spores of Phytophthora: weapons of the plant destroyer. Nat Rev Microbiol.* 2005;3(1):47–58.