



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO VÍCTOR ALZAMORA CASTRO

IDENTIFICACIÓN DE GENES
REGULADOS DIFERENCIALMENTE EN
RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR
Globodera pallida EN UNA VARIEDAD
DE PAPA RESISTENTE Y OTRA
SUSCEPTIBLE AL NEMÁTODO

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

Hans Carreño Fernández

LIMA – PERÚ
2017

ASESOR: Carlos Merino Méndez

DEDICATORIA

A mi papá, mamá y hermano por los ánimos, el apoyo brindado y cariño.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar a mi lado siempre y apoyarme en aquellos momentos de debilidad.

A los profesores de la UPCH quienes me guiaron en el avance de la maestría y la tesis. A los compañeros de la maestría por estar siempre pendiente de mi avance académico. A mis amigos del laboratorio de la Unidad de Genómica por los ánimos, consejos y apoyo brindado. Y por último a aquellos amigos y familiares que, a pesar de la distancia, mostraron su preocupación e interés en mi desarrollo profesional. A todos ustedes les dedico estas líneas.

**Financiado por el Programa
Nacional de Innovación para la Competitividad y
Productividad (Innovate Perú), bajo el contrato
126-FINCyT-IB-2013**

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	4
IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	7
OBJETIVOS.....	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVO ESPECÍFICO	9
I. ANTECEDENTES	10
II. MARCO TEÓRICO	13
2.1 NEMÁTODO QUISTE DE LA PAPA – <i>Globodera pallida</i>	13
<i>pallida</i>	13
2.1.1 Historia.....	13
2.1.2 Clasificación taxonómica	14
2.1.3 Origen y distribución	15
2.1.4 Morfología	19
2.1.5 Factores bióticos y abióticos que afectan al desarrollo del nemátodo.....	24
2.2. CULTIVO DE PAPA	25
2.2.1. Origen del cultivo de la papa	25
2.2.2. Clasificación taxonómica de la papa	26
2.2.3. Variedades nativas y mejoradas	26
2.2.4. Ciclo de vida de la papa	28
2.2.5. Ciclo biológico del nemátodo quiste en papa	30

2.2.6. Síntomas de ataque	33
2.3.GENES DE RESISTENCIA.....	34
2.3.1. Genes de resistencia a <i>Globodera pallida</i>	39
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
3.1. Ubicación geográfica	42
3.2. Materiales	42
3.2.1. Material biológico	42
3.3. Flujogramas de trabajo	44
3.4. Metodología	46
3.4.1. Obtención de quistes de <i>Globodera pallida</i>	46
3.4.2. Identificación del género y especie de <i>Globodera pallida</i> ..	48
3.4.3. Estimulación de quistes de <i>Globodera pallida</i>	50
3.4.4. Estandarización de los ensayos de infección en plántulas <i>in vitro</i>	53
3.4.5. Coloración de nemátodos en raíces con fucsina ácida	54
3.4.6. Cultivo de plantas en sistema aeropónico	55
3.4.7. Ensayos de infección en plantas de sistema aeropónico	56
3.4.8. Extracción de ARN a partir de raíces	58
3.4.9. Secuenciamiento por RNA-Seq	59
3.4.10. Análisis de secuencias	61
3.4.11. Análisis de datos	65
IV. RESULTADOS.....	67
4.1. Evaluación del grado de infección de Juveniles 2 (J ₂) de <i>Globodera pallida</i>	67

4.2. Cuantificación de la expresión de genes relacionados a la resistencia a <i>Globodera pallida</i> a nivel de raíces	71
4.3. Resultados del análisis de datos	75
V. DISCUSIÓN.....	86
VI. CONCLUSIONES.....	97
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
VIII. ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pérdidas en el rendimiento (Toneladas métricas Tm) causadas por <i>Globodera spp.</i> en 10 departamentos andinos de Perú.	19
Figura 2. Estadios de nematodos parásitos de plantas.	20
Figura 3. Representación esquemática del Juvenil 2 (J ₂) de <i>Globodera pallida</i> . ..	21
Figura 4. Etapa de diferenciación sexual en el ciclo biológico de <i>Globodera pallida</i>	23
Figura 5. Diferenciación morfológica entre el macho y la hembra de <i>Globodera pallida</i>	23
Figura 6. Huevos y J ₂ en el interior de un quiste de <i>Globodera pallida</i> . Aumento visual de 400X.	24
Figura 7. Estados de crecimiento del cultivo de papa.	30
Figura 8. Ciclo biológico de <i>Globodera pallida</i>	32
Figura 9. Interacción específica de genes de resistencia.	35
Figura 10. Proteínas codificadas por genes de resistencia.	37
Figura 11. Principales clases de resistencia de la planta, de acuerdo a la disposición de los dominios funcionales.	37
Figura 12. Aparato de Fenwick.	47
Figura 13. Visualización de quistes de <i>Globodera pallida</i> mediante estereoscopio Carl Zeiss Stemi™ DV4.	47
Figura 14. Condiciones de PCR.	50
Figura 15. Diseño del aparato de desinfección de quistes de <i>Globodera pallida</i> ..	52
Figura 16. Esquema del sistema de estimulación de quistes de <i>Globodera pallida</i>	52

Figura 17. Sistema de estimulación de quistes de <i>Globodera pallida</i>	53
Figura 18. Ubicación de la planta in vitro sobre el agar agua al 2%	54
Figura 19. Sistema Aeropónico.....	56
Figura 20. Diseño Experimental.	57
Figura 21. Puntos de inoculación en una planta de sistema aeropónico (Unidad Experimental).....	58
Figura 22. Secuenciamiento por RNA-Seq empleando la tecnología NGS Illumina.	61
Figura 23. Productos de amplificación de las regiones ITS de las especies <i>Globodera rostochiensis</i> y <i>Globodera pallida</i>	68
Figura 24. Raíces infectadas coloreadas con fucsina ácida para la identificación de Juveniles 2 /J2) de <i>Globodera pallida</i> (campo visual 400X).....	69
Figura 25. Ingreso de J ₂ de <i>G. pallida</i> en las raíces de los tratamientos a las 24 horas post - inoculación en las variedades Chimbina Colorada y María Huanca. .	70
Figura 26. Ingreso de J ₂ de <i>G. pallida</i> en las raíces de los tratamientos a las 72 horas pos inoculación en las variedades Chimbina Colorada y María Huanca.	71
Figura 27. Calidad de ARN total de las muestras extraídas a partir de raíces de la variedad Chimbina Colorada.	72
Figura 28. Calidad de ARN total de las muestras extraídas a partir de raíces de la variedad María Huanca	72
Figura 29. Reporte del Programa Fast QC.....	73
Figura 30. Cantidad de genes expresados en las variedades María Huanca (MH) y Chimbina Colorada (CC).	74

Figura 31. Cantidad de genes que se sobre expresaron (Fold change ≥ 2) entre el tratamiento control y el de infección en ambas variedades de papa.	77
Figura 32. Cantidad de genes que se inhibieron (Fold change ≤ -2) entre el tratamiento control y el de infección en ambas variedades de papa.	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de <i>Globodera rostochiensis</i> y <i>Globodera pallida</i> en África, Asia, Europa y Oceanía.....	17
Tabla 2. Distribución de <i>Globodera rostochiensis</i> y <i>Globodera pallida</i> en varios países de América. Fuente:	18
Tabla 3. Niveles de infestación por <i>Globodera sp.</i> (Huevos + J ₂) en muestras de suelo de diferentes departamentos andinos del Perú.....	19
Tabla 4. Relación de genes de resistencia a <i>Globodera rostochiensis</i> y <i>G. pallida</i>	41
Tabla 5. Primers empleados para la identificación de especies del género <i>Globodera spp.</i>	49
Tabla 6. Componentes de PCR.	49
Tabla 7. Concentraciones de ADN a partir de quistes de <i>Globodera sp.</i>	67
Tabla 8. Conteo de juveniles 2 de <i>Globodera pallida</i> en raíces infectadas en los tratamientos a las 24 horas y 72 horas post - inoculación (pi).	70
Tabla 9. Concentraciones de ARN total a partir de raíces.	72
Tabla 10. Total de secuencias de buena calidad por librería, analizadas por los programas FastQC y Fast_X.....	73
Tabla 11. Rangos de la Prueba de Mann-Whitney entre los tratamientos post – infección (pi) en las variedades Chimbina Colorada y María Huanca, con respecto al conteo de J ₂ de <i>Globodera pallida</i>	76
Tabla 12. Estadísticos de contraste de la Prueba de Mann-Whitney entre los tratamientos post – infección (pi) en las variedades Chimbina Colorada y María Huanca, con respecto al conteo de J ₂ de <i>G. pallida</i>	77

Tabla 13. Genes que se comportaron de manera opuesta a nivel de expresión en ambas variedades de papa y genes que incrementaron o disminuyeron su expresión exclusivamente en la variedad María Huanca.....	80
Tabla 14. Genes R involucrados en la resistencia a <i>Globodera pallida</i>	84

ABSTRACT

One of the pathogen with the highest attack incidence in potato crop is *Globodera pallida* known as “cyst nematode potato” which it not only decreases crop productivity but also has a high impact on food security. The search for resistance genes on potatoes varieties to this nematode is an alternative to manage this disease. In the present investigation, we performed infection tests by inoculating stage 2 juveniles (J₂) of *G. pallida* on roots potatoes from Maria Huanca and Chimbina Colorada varieties, provided by the International Potato Center (CIP) who classified as resistance and susceptible to *G. pallida*, respectively. Infected roots were evaluated at 24 and 72 hours post - inoculation (pi), by measuring J₂ quantity that enters to the root under microscope. In addition, RNA extraction from infected roots was done in order to perform RNA-Sequencing, through bioinformatics programs genes were identified and also transcripts expression related to defense were quantified in both varieties. The results showed 100 candidates genes related to *G. pallida* resistance that were expressed differently between varieties Maria Huanca and Chimbina Colorada. To conclude, the resistant variety María Huanca has a superior mechanism of resistance against the juvenile infective nematode (J₂) in contrast to Chimbina Colorada variety, which is reflected in an increase of gene expression related to biotic resistance and a smaller amount of J₂ in infected roots.

Keywords: *Globodera pallida*, Chimbina Colorada variety, María Huanca variety, resistance to biotic stress, RNA-Seq.

RESUMEN

Uno de los patógenos que atenta contra la productividad del cultivo de papa y, por ende, a la seguridad alimentaria de la población es el nematodo fitoparásito *Globodera pallida*, conocido como el “nematodo del quiste de la papa”. La búsqueda de variedades de papa con genes de resistencia a este nematodo es una alternativa de control para el manejo de esta enfermedad. En la presente investigación se realizaron pruebas de infección, inoculando estadíos juveniles 2 (J₂) de *G. pallida* en raíces de plantas de las variedades María Huanca y Chimbina Colorada, proporcionadas por el Centro Internacional de la Papa (CIP), catalogadas como resistente y susceptible al nematodo, respectivamente. Se evaluaron raíces infectadas a las 24 y 72 horas post - inoculación (pi), mediante la cuantificación bajo microscopio de J₂ que ingresaron a la raíz. Además, se realizaron extracciones de ARN de las raíces infectadas que fueron punto de partida para el proceso de secuenciamiento por RNA-Seq. Los datos provenientes de la secuenciación se analizaron mediante programas bioinformáticos, identificando y cuantificando transcritos relacionados a la defensa, basado en los perfiles de expresión génica durante la interacción planta – nemátodo. Se identificaron 100 genes regulados diferencialmente en respuesta a la infección por *G. pallida* que se expresaron de manera opuesta entre las variedades María Huanca y Chimbina Colorada. Se concluye que la variedad resistente María Huanca expresa genes que ejercen resistencia al estadio juvenil infectivo (J₂) del nematodo corroborada por los cambios de la expresión de dichos genes, y las diferencias significativas en la cantidad de J₂ encontradas en raíces de las variedades de papa evaluadas.

Palabras clave: *Globodera pallida*, Chimbina Colorada, María Huanca, resistencia, RNA-Seq.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de papa tiene una producción mundial de 300 millones de toneladas al año. Esta cifra puede fluctuar de acuerdo a las tecnologías de producción de cada país y las condiciones meteorológicas que determinan la tuberización, la aparición de plagas y enfermedades (Eguilor., 2010). Entre los años 2000 y 2006, la producción nacional de papa se ha mantenido estable en 3.2 millones toneladas (CENAGRO., 2012).

Como todo cultivo, la papa posee una gama de patógenos (bacterias, virus, nemátodos e insectos) que atentan contra la planta y su producción, causando un impacto negativo a nivel social y económico. Los nemátodos vienen a ser uno de los grupos que ocasionan daños severos. Los géneros *Meloidogyne* y *Globodera* son los máximos representantes de aquellos nemátodos formadores de agallas o nódulos y de quistes en raíces, respectivamente. Las especies del género *Globodera*, que se clasifican dentro del grupo de los nemátodos quiste de la papa, fueron reportados por primera vez en el Perú en 1952 con las investigaciones de Willie y Segura. Dentro de las especies de *Globodera* identificadas en papa se tiene a: *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida* y *Globodera tabacum*. Las especies *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis* están ampliamente distribuidas en la región Andina del Perú, causando importantes pérdidas económicas en el rendimiento de papa (US \$ 128.393.257) (Franco., 2008), siendo en términos porcentuales una pérdida de 58% a nivel de producción.

Globodera pallida es la especie predominante en el Perú dentro de su género, distribuido exclusivamente en los departamentos de Cajamarca, La Libertad, Junín, Ayacucho, Huancavelica, Huánuco, Apurímac y Cusco (Franco., et al. 2011). Esta diseminación del nemátodo en la región andina se debe a la deficiencia del manejo integrado de la plaga por parte del agricultor, como también a la inexistencia de métodos de erradicación del nemátodo. La estrategia de reproducción empleado por el nematodo, permite que los campos del cultivo de papa se encuentren infestadas con quistes, los cuales alojan huevos y estadíos juveniles que

aseguran la continuidad del ciclo de vida de *G. pallida*. El segundo estadio Juvenil 2 (infectivo) cumple una tarea importante en el reconocimiento del hospedero. Debido a la presencia del exudado radicular (Mulder., 1996) durante este estadio, la larva emerge del huevo y, por ende, del quiste para localizar la raíz y penetrar en la zona de elongación. Los nemátodos se desplazan en el interior de la raíz, e inducen el desarrollo de grandes células multinucleadas denominados sincitios (Crozzoli., 1994). Los sincitios proporcionan alimento, permitiendo que el nemátodo alcance los estadios tercero y cuarto hasta su forma adulta, donde se realiza la diferenciación sexual (Fullaondo., 1998). En esta etapa la hembra comienza a ensancharse a medida que los ovarios aumentan de tamaño, originando la ruptura de las células de la raíz y llegando a ser visibles fuera de esta (Mulder., 1996). Mientras tanto, los machos que conservan su forma elongada, abandonan la raíz y fecundan a las hembras (Franco., 1986). La hembra muere y esta se convierte en un quiste, caracterizado por resistir las condiciones adversas del medio ambiente. En su interior se puede encontrar desde unos pocos hasta 600 huevos de *G. pallida* (Franco., 1994).

La presencia de quistes a nivel de raíz, los parches cloróticos a nivel de hojas y el retraso en el crecimiento de la planta de papa, son consecuencias de la infestación por *Globodera pallida*, (Guile., 1970). Una vez que *G. pallida* se establece en el campo de cultivo es imposible eliminarla, ocasionando reducción a nivel de rendimiento. Su importancia económica es cada vez mayor debido a su creciente diseminación a través de tubérculos-semilla y a la disminución del periodo de rotación de cultivos (Delgado de la Flor., et al. 1991).

Dado el alarmante panorama acerca de las consecuencias que originaría *Globodera pallida* en el cultivo de papa, el Centro Internacional de la Papa (CIP) en el año 1987 liberó un clon denominado María Huanca, como resultado de una serie de pruebas relacionados al comportamiento y resistencia hacia el nematodo quiste de la papa. El rendimiento de esta variedad fluctuó entre 30 t/ha y 60 t/ha en estaciones experimentales y entre 20 t/ha y 30t/ha

en campos de agricultores (Llontop., et al. 1989). Al realizar el análisis fenotípico de las pruebas de infección en maceta y placa petri, enfrentando la variedad María Huanca y el nemátodo *G. pallida*, se demostró la reducción considerable de hembras observadas en raíces. (Llontop., et al. 1989).

La particularidad de esta variedad de papa con respecto a la resistencia al nemátodo quiste, se basa fundamentalmente a un aspecto molecular que involucra la expresión de genes relacionados a la resistencia. Tal es el caso de los genes R, especializados en el reconocimiento de efectores patogénicos específicos generados por el agente causal de la enfermedad (Belkhadir., et al. 2004). Estos genes poseen dominios funcionales: NBS, Nucleotide-binding site (sitio de unión al nucleótido) y LRR, Leucine rich repeats (secuencias repetidas ricas en Leucina). Este último dominio determina la especificidad de reconocer agentes patogénicos. Así también existen otros grupos de genes que estarían involucrados en la resistencia a *Globodera pallida*, como es el caso de genes relacionados a la regulación de la transcripción, a las rutas de señalización de resistencia, al mecanismo de defensa y a la regulación del ciclo celular (Jolivet., et al. 2007).

Por tal motivo, el presente trabajo de tesis tiene por objetivo identificar genes regulados diferencialmente en respuesta a la infección por *Globodera pallida* comparando la respuesta de plantas susceptibles (Variedad Chimbina Colorada) y resistentes (Variedad María Huanca) al nematodo durante la infección.

JUSTIFICACIÓN

La gran riqueza en diversidad del cultivo de papa en el Perú ha sido preservada, en gran medida,

gracias a las prácticas tradicionales de los agricultores en los centros de origen de este cultivo. El cuidado de la semilla permitió mantener la gran cantidad de variedades, adaptadas a distintas altitudes, temperaturas y suelos (Borba., 2008).

Actualmente, 730 000 familias dependen del cultivo de papa en 19 de las 24 regiones del país (Fonseca et al., 2014). Según el Ministerio de Agricultura y Riego, en el año 2014 la producción del cultivo de papa se extendió a más de 317,000 hectáreas a nivel nacional. El rendimiento fue de 14.7 toneladas en promedio por hectárea, lo que generó de modo directo más de 110,000 puestos de trabajo productivo para miles de campesinos. El alto contenido de nutrientes, la adaptación a ambientes marginales, el bajo costo y la alta productividad, permite que el cultivo de papa sea una de las principales fuentes de alimentos e ingresos para las personas de bajos recursos económicos. Por tal razón, el mejoramiento en el rendimiento y en el cuidado fitosanitario durante su cultivo son esenciales para alcanzar independencia económica y seguridad alimentaria (Chávez., 2008).

Uno de los agentes que atenta contra la productividad del cultivo de papa y por ende a la seguridad alimentaria de la población es *Globodera pallida*. La repercusión que origina este nemátodo en el cultivo de papa es corroborado por el descenso de la producción y el rendimiento del cultivo, disminución del peso y del tamaño de los tubérculos que está muy relacionado al número de huevos de nematodos por unidad de suelo (Mendoza., 2008). Este nemátodo ha co-evolucionado con su hospedante y se caracteriza por infectar a nivel de raíces, causando una pérdida económica calculada en US\$ 128'000.00 en la producción de papa en el Perú. Factores como los medios de diseminación del quiste del nemátodo, la no disponibilidad de medidas de control y el rechazo o desconocimiento por parte de ciertos productores a las semillas certificadas y variedades resistentes, permiten que *Globodera pallida* impacte contra

el cultivo de papa y tenga importancia a nivel de sanidad vegetal. (Franco., 2010).

Teniendo en cuenta el panorama descrito, se realizaron investigaciones relacionadas a la resistencia del nemátodo, basándose en el manejo integrado de *Globodera pallida* que en un principio fue desarrollado por el Centro Internacional de la Papa (Franco., 1994). Posteriormente se reportaron resultados basados en el cruzamiento de especies susceptibles y resistentes al nemátodo, que señalaron a la vez a la variedad María Huanca como resistente a *Globodera pallida*. Sin embargo, aún no se tienen estudios a nivel molecular acerca de genes de resistencia a *G. pallida* en papa nativa del Perú, como resultado de la interacción planta-patógeno. La importancia de relacionar los genes regulados diferencialmente en respuesta a la infección por *G. pallida*, mediante el análisis transcriptómico, con el aspecto fenotípico que presenta la planta al interactuar con el nemátodo, contribuiría al avance del conocimiento de la interacción planta nemátodo. Adicionalmente, la expresión diferencial de genes relacionados a la resistencia a *G. pallida* permitiría conocer a priori las estrategias de defensa que desarrolla la planta a nivel molecular, reflejada en la variación de la infestación del nemátodo a nivel de raíz.

Los resultados y conclusiones que se generen de esta clase de estudios, conllevan a contribuir a diseñar estrategias de control de *Globodera pallida*, aportando información molecular a los programas de mejoramiento genético. Este tipo de estudios dan a conocer genes regulados diferencialmente en respuesta a este nemátodo e incentivan la búsqueda de estos genes en otras variedades de papa nativa. Por consiguiente, el manejo integrado del nemátodo en el cultivo de la papa será beneficiado, logrando disminuir los casos de infección por *G. pallida* y aumentando el rendimiento y producción del cultivo de la papa de manera eficiente y sustentable.

IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

A nivel mundial, se ha venido desarrollando diferentes técnicas para poder hallar genes de resistencia, implicados en la atenuación de la invasión del estadio infectivo Juvenil 2 (J₂) de *Globodera pallida* en raíces de papa. También el uso de diferentes variedades de papa fue tomado en consideración, debido a que cada germoplasma posee un acervo genético característico de genes relacionado a la resistencia al nemátodo. Como parte de estas iniciativas, se demostró que, en el genoma de la papa, existen genes involucrados en la resistencia a virus, nemátodos, bacterias y hongos (Lozano et al., 2012).

En el caso de los genes relacionados a la resistencia a *Globodera pallida*, no ofrecen una resistencia absoluta o total frente al nemátodo, puesto que los factores de mutación y virulencia, por parte de los genes y agentes patogénicos, respectivamente, originan que ciertas variedades de papa sean susceptibles a enfermedades. Otro aspecto que aún falta profundizar, es la acción que tienen los genes relacionados a la resistencia, debido a que estos podrían estar expresándose de manera conjunta o no para evitar la invasión de *G. pallida*. Este panorama indicaría que existen grupos de genes con mayor o menor implicancia a la resistencia, de acuerdo a la modulación de expresión de genes por parte de los J₂ en el hospedero.

Se tiene conocimiento que el Perú posee más de 3000 variedades de papas nativas y cierto número de variedades mejoradas resistentes a estrés biótico y abiótico. Estos germoplasmas poseen cualidades fenotípicas y genotípicas interesantes, que aún no fueron estudiadas a profundidad, y que podrían brindar información de primera mano acerca de posibles genes candidatos implicados en la resistencia a *G. pallida*. Es por esta razón que es obligatorio buscar grupos de genes candidatos que ofrezcan resistencia al nemátodo, para así colaborar en el fortalecimiento de los programas de mejoramiento genético y manejo integrado de plagas en el cultivo de papa.

Las técnicas de secuenciamiento masivo como herramienta para la búsqueda, comprensión y determinación de genes de resistencia, se encuentran a disposición a nivel mundial. Sin embargo, en el Perú no son utilizadas para la búsqueda de genes relacionados a la resistencia a *G. pallida* en germoplasma peruano, considerando que el país fue centro de origen de la papa y de este nemátodo. Por tal motivo, se considera necesario investigar a profundidad a las variedades de papas nativas y mejoradas del Perú, para determinar los genes relacionados a la resistencia que poseen, para colaborar con el mejoramiento genético del cultivo, con miras a una protección fitosanitaria contra *G. pallida*.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Identificar genes regulados diferencialmente en respuesta a la infección por *Globodera pallida* en plantas de papa de una variedad resistente y otra susceptible al nemátodo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar y comparar el grado de infección de Juveniles 2 (J₂) de *Globodera pallida* en raíces de plantas susceptibles y resistentes al nemátodo.
- Cuantificar la expresión de genes activos antes y durante la infección de *Globodera pallida* en plantas de papa resistente y susceptible.
- Analizar la relación entre la expresión de genes a nivel de raíz con la susceptibilidad a la infección de Juveniles 2 (J₂) de *Globodera pallida*

I. ANTECEDENTES

Phillips et al., 1982, realizaron experimentos para determinar la susceptibilidad o resistencia de plantas híbridas hacia *Globodera pallida*, basados en el conteo de juveniles 2 (J₂), juveniles

3 (J₃), juveniles 4 (J₄), aparición de machos y hembras en cada planta. La planta original *Solanum vernei* demostró ser resistente a *G. pallida*, sin embargo, al realizar las introgresiones con dicha planta, la capacidad de resistencia de la nueva progenie disminuyó. Sólo el Clon 12380abc tuvo resistencia al nemátodo, por consiguiente, se asumió que este clon contenía genes de resistencia procedente de *S. vernei*. La evidencia fenotípica para corroborar la resistencia a *G. pallida*, fue el retraso del desarrollo del nemátodo en la planta.

van der Vossen et al., 2000, demostraron que el locus Gpa2 tiene un conjunto de genes de resistencia que poseen una alta homología entre ellos, sin embargo 2 de ellos tienen capacidad de distinguir e interactuar contra diferentes patógenos. Tal es el caso del gen Rx1, que confiere resistencia al virus X de la papa (PVX) que tiene una homología del 88% con el gen Gpa2, el cual confiere resistencia al nemátodo quiste de la papa *Globodera pallida*. La zona de alta variabilidad de secuencias dentro de estos genes, se ubicó en la zona de la región LRR (Leucine rich repeat), importante en la interacción proteína - proteína al momento del reconocimiento del patógeno. Los autores destacan que los dominios efectores, tanto del gen Rx1 y Gpa2, están conservados y que podrían tener componentes comunes en las cascadas de reacción de resistencia hacia el virus o el nemátodo, respectivamente.

Sobczak et al., 2005, Evaluaron las respuestas de 3 líneas de tomate, caracterizados por su resistencia (LA1792 y L10 (transgénico)) y susceptibilidad (Money Maker) a *Globodera spp.* El estudio destaca la presencia de necrosis celular alrededor de los sincitios formados en las variedades resistentes, dando lugar a la degradación de los mismos (4 días post-inoculación) imposibilitando el desarrollo del nemátodo a la etapa adulto hembra. En estos eventos señalados, el gen Hero A se encuentra implicado debido a su sobreexpresión en raíces. Mediante el análisis de los perfiles de expresión y la utilización de RT-PCR, se encontró que la expresión del gen Hero A era alto a las 24 horas post-inoculación. La expresión de los genes tipo PR (pathogenesis-related, por sus siglas en inglés), también son detectados en el proceso

de infección, señalando que el gen PR1 posee un nivel de expresión mucho más alta que Hero A, concluyendo que es importante en las rutas de señalización de defensa del hospedero frente al nemátodo.

Caromel et al., 2005, demostraron que la resistencia a *Globodera pallida* está relacionada con la reducción de la población de hembras del nemátodo, esto debido, a que existe una necrosis celular que se forma alrededor del juvenil 2 que está infectando la planta, impidiendo a éste desarrollarse a la etapa adulto hembra. Esta reacción está mediada por genes de resistencia, los cuales se manifiestan al momento de la fase sedentaria del nemátodo. Los QTLs estudiados fueron Gpa Vsspl y Gpa XIsspl. Si bien es cierto que los clones que tuvieron el QTL Gpa Vsspl ofrecieron resistencia a *G. pallida*, los clones que poseían ambos QTLs redujeron considerablemente el porcentaje de población de hembras (0.8%).

Jolivet et al., 2007, dieron a conocer una lista de genes candidatos relacionados a la resistencia a *Globodera pallida*, en genotipos resistente y susceptible originados del cruzamiento de *Solanum sparsipilum spl* 329.18 x *S. tuberosum* Caspar H3. Mediante la técnica de ADN complementario - AFLP (Amplified fragment length polymorphism; por sus siglas en inglés) investigaron los niveles de expresión genética observando genes regulados positiva y negativamente en los diferentes tiempos pos inoculación (2hrs, 6hrs, 2 días y 6 días) con juveniles 2 de *Globodera pallida* a nivel de raíz, basados en la migración de los juveniles 2 (2 hrs post- inoculación) y la degradación de los sincitios (6 días pos inoculación) en genotipos resistentes. Encontraron secuencias involucradas en la regulación de la transcripción, rutas de señalización de resistencia, mecanismo de defensa; destacando aquellas secuencias pertenecientes a los reguladores del ciclo celular. Estos últimos permitirían que los nemátodos

no alcancen la fase adulta hembra, en las especies resistentes, y evitarían la proliferación de los nemátodos a nivel de raíz.

Uehara et al., 2010, destacaron la importancia de la presencia del ácido salicílico para la expresión de genes PR, en especies de tomate resistentes a *Globodera rostochiensis*. Este grupo de investigadores analizó la expresión de los transcritos empleando microarreglos, a los 3 días post inoculación con el nemátodo. Además de los genes PR, se encontraron genes que codifican la fenilalanina amonio liasa (PAL), MyB, piruvato carboxilasa (PDC) y alcohol deshidrogenasa (ADH), que fueron sobre expresados también a los 3 días post inoculación en comparación a la especie susceptible de tomate. También demostraron que la presencia del ácido salicílico, permite la expresión del gen Hero A, que posee un amplio espectro confiriendo resistencia a la planta contra *Globodera rostochiensis* y *G. pallida*.

Lozano et al., 2012, basados en un enfoque bioinformático, encontraron 436 proteínas que contenían el dominio NBS (Nucleotide binding site) en el genoma de la papa *Solanum phureja*. Las proteínas que poseían el dominio adicional coiled-coil (CC) fueron las más abundantes. Además, NBS-LRR pseudogenes fueron determinados (41.6% de R-genes total), los cuales probablemente estarían involucrados en la rápida evolución de genes efectores y podrían actuar como moléculas que interactúan con los genes NBS-LRR.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. NEMATODO QUISTE DE LA PAPA - *Globodera pallida*

2.1.1. HISTORIA

La primera referencia de un “nemátodo formador de quiste” parasitando plantas de papa, fue realizada por Kuhn en 1881. Desde entonces se consideró a este nemátodo como una variedad de *Heterodera schachtii*. En 1923, Wollenweber sugirió cambiar la variedad y darle rango de especie, denominándola: *Heterodera rostochiensis*. No obstante, la clasificación de Wollenweber no fue plenamente aceptada hasta que Franklin en 1940 demostró claramente el estatus de especie (Fullaondo., 1999).

En 1959, Skarbilovich definió el subgénero *Globodera* dentro del género *Heterodera*, basado en la forma globular del quiste, en contraposición con la forma más ovalada de *Heterodera*. Beherens, en el año 1975, separó el grupo de los quistes redondos de los ovalados, y les dio categoría de género (*Globodera* y *Heterodera* respectivamente). Además, describió un nuevo género, *Punctodera* también formador de quistes redondos, pero con fenestración anal como principal carácter clasificatorio (Fullaondo., 1999).

2.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Animalia

Phylum: Nemata

Clase: Secernentea

Subphylum: Uniramia

Subclase: Diplogasteria

Orden: Tylenchida

Suborden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchoidea

Familia: Heteroderidae

Subfamilia: Heteroderina

Género: Globodera

Especies: *Globodera pallida*

Globodera rostochiensis

Fuente: Siddiqi., 2000.

Para la diferenciación de especies del género *Globodera*, se analizaron características morfológicas y moleculares a nivel de quistes y juveniles del nemátodo. De esta manera, se determinó que, en la etapa de maduración de quistes, aquellos que cambien de color blanco a amarillo, para después convertirse en quistes de color marrón, pertenecen a la especie *Globodera rostochiensis*. Mientras tanto, los quistes que durante su maduración cambien de color blanco a marrón, directamente, se las consideró como *Globodera pallida* (Stone., 1973; Oepp et al., 2013).

Otras características taxonómicas para la distinción de especies fueron la forma y el número de estrías comprendidas entre el ano y la fenestra vulvar del quiste. Es así que *G. pallida* posee estrías más o menos paralelas, de aproximadamente 13 ± 4 estrías como número promedio. Por otro lado, *G. rostochiensis* posee estrías entrecruzadas con un número promedio de 18 ± 3 . La longitud del estile del estadio juvenil 2 (J₂) y los nódulos basales (también denominados protuberancias), fueron considerados como características morfológicas de distinción de especies. La especie *G. pallida* posee un estilete de 23 a 24 micras de longitud con nódulos basales que apuntan hacia adelante y *G. rostochiensis* posee un estilete de 19 a 21 micras con nódulos basales que apuntan hacia atrás (Franco., 1981).

La identificación a nivel molecular de las especies, se basa en la amplificación de la región intergénica ribosomal (ITS) mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Los productos de amplificación son específicos y característicos para cada especie de nemátodo, correspondiendo el producto de amplificación de 434 pb (pares de bases) a *G. rostochiensis* y 265 pb para la especie *G. pallida* (White et al., 1990; Bulman et al., 1997)

2.1.3. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Las dos especies del Nemátodo del Quiste de la Papa, *Globodera rostochiensis*, *Globodera pallida*, se originaron y se distribuyeron a lo largo de la cordillera de los Andes de América del Sur entre los 1 800 y 3 800 m. de altitud, y co-evolucionaron con su hospedante preferido, las subespecies de *Solanum tuberosum* (Román., 1999; Canto-Saenz & Scurrah., 1977; Stone., 1985).

Entre los años 1850 y 1900, se realizaron colecciones de papa provenientes de los Andes con fines de ser utilizados en mejoramiento a resistencia contra el tizón tardío en Europa. En esta actividad, sin el pleno conocimiento de que el germoplasma estuvo infectado por *Globodera sp.*, se introdujo el nemátodo del quiste de la papa a Europa (Román., 1999). Este suceso permitió, más adelante, la distribución del nemátodo a los países septentrionales y a regiones elevadas de los países de la zona tórrida (Crozzoli., 1994). Los primeros puntos de infestación en Europa fueron: Alemania, Escocia, Inglaterra, Irlanda, Suecia, Dinamarca, Holanda, Finlandia, Francia y Bélgica los cuales coinciden con campos en los que se cultivaron las nuevas variedades mejoradas de papa con las entradas de mediados del siglo XIX (Fullaondo., 1999).

Entre los años 1913 y 1914 se reportó por primera vez al nemátodo dorado

(denominación propuesta por Chitwood., et al. 1942) *Globodera rostochiensis*, gracias a las investigaciones realizadas por Massen en Escocia y Zimmerman en Alemania (Dao & González., 1971). Sin embargo, otro autor menciona que el nemátodo fue detectado por primera vez en Alemania en el año 1881 y posteriormente descrita por Wollenweber en 1923, quien logró coleccionar una población de nemátodos de la ciudad de Rostock (Greco & Crozzoli., 1995).

Stone, en el año 1973, observó la existencia de ciertas poblaciones de nemátodos cuyas hembras no presentaban la coloración amarilla (característico por ese entonces de *G. rostochiensis*). Ante tal hecho, teniendo en cuenta las características morfométricas del estadio juvenil y la cromogénesis de las hembras, denominó a estos nemátodos como *Heterodera*, más adelante conocido como *Globodera pallida* (Stone., 1973).

El último reporte acerca de campos infestados por *Globodera pallida* a nivel mundial se remonta al año 2006 en Estados Unidos. Se detectaron quistes de *G. pallida* durante una prueba de rutina, realizada por Idaho State Department of Agriculture (ISDA) en los campos de cultivo de papa, ubicados al oeste de Idaho. Fueron 7 campos infestados con el nemátodo, que representó alrededor de 911 acres. Estas áreas, como también los alrededores, fueron declarados en cuarentena, evitando el movimiento de tierras y tubérculos procedentes de estos campos. Este acontecimiento impactó en la producción de papa ocasionando pérdidas económicas significativas (USDA-APHIA. 2013).

En la actualidad el parásito se halla bien establecido a nivel mundial (ver Tabla 1.) y es un problema perdurable en todos los lugares donde está presente (González et al., 1997). En Latinoamérica *Globodera pallidase* ha reportado en Argentina, Bolivia, Chile, Colombia, Ecuador, El Salvador, Guatemala, México, Panamá y Perú (Ver Tabla 2.).

CONTINENTE	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	
	<i>Globodera rostochiensis</i>	<i>Globodera pallida</i>
África	Argelia, Egipto, Marruecos, Sierra Leona, Sri Lanka, Sur África y Túnez	Argelia, Egipto y Túnez
Asia	Filipinas, India, Japón, Líbano Libia, Omán, Pakistán	India, Japón, Pakistán
Europa	Albania, Alemania, Armenia, Austria, Bielorrusia, Bélgica, Bulgaria, Chipre, Dinamarca, Eslovaquia, Eslovenia, España, Estonia, Finlandia, Francia, Grecia, Holanda; Hungría, Irlanda, Islandia, Islas Norfolk, Islas Faroe, Italia, Letonia Liechtenstein, Lituania, Luxemburgo, Malta, Noruega, Polonia, Portugal, Reino Unido, República Checa, Rumania, Rusia, Suecia, Suiza, Ucrania, Tayikistán y Turquía	Alemania, Austria, Bélgica, Bulgaria, Checoslovaquia, Chipre, Escocia, España Francia, Grecia, Holanda, Irlanda, Islandia, Islas Faroe, Islas Falkland, Islas Channel del Reino Unido, Italia, Luxemburgo, Malta, Noruega, Polonia, Portugal, Reino Unido, Rumania, Suecia, Suiza y Turquía
Oceanía	Australia, Nueva Zelanda	Nueva Zelanda

Tabla 1. Distribución de *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* en África, Asia, Europa y Oceanía. Fuente: Ortega., 2008

PAIS	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA		Fuente
	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. pallida</i>	
Argentina	-	Dep. de Iruya. Prov Salta	Lax y col. 2005
Bolivia	Tarija y La Paz	Chuquisaca, La Paz y Cochabamba.	Franco J. y col. 1999
Canadá	Newfouland, British Columbia	Newfouland, British Columbia	NAPPO. 2006
Chile	Comuna de la Ligua, V Región	Comuna de la Ligua, V Región y provincias del Fuego y de Magallanes, XII región.	Gob Chile 2005
Colombia	-	Dptos. de Nariño y Cauca	Guerrero. 2004
Costa Rica	Cártago	Cártago y Pastora, Volcán Irazú	Ramírez y Bianchini, citados por Ramírez (1979) y Coto (2005).
Ecuador	-	En casi toda la región andina	Pumisacho y Sherwood. 2002
El Salvador	Chalatenango	-	Barrera. 2005
Estados Unidos	New York	Idaho	NAPPO. 2006
Guatemala	-	Municipios Quetzaltenago, Sololá, Chimaltenango Totonicopan y Palencia.	García. 1980 y Blanco. 2004.

México	Varias regiones	-	Núñez. 2002
Panamá	Volcán y Cerro Punta	-	Tarté, citado por Ramírez. 1979
Perú	Lago Titicaca	Zona Andina	González y Franco. 1997.

Tabla 2. Distribución de *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* en varios países de América. Fuente: Ortega., 2008

En el Perú, *Globodera pallida* está ampliamente distribuida en la Zona Andina (González et al., 1997; Ortega., 2008) donde según el Servicio Nacional de Sanidad Agraria - SENASA, es el principal problema nematológico. La incidencia de *G. pallida* se presenta en los departamentos de Cusco, Huánuco, La Libertad, Junín, Apurímac, Puno y Huancavelica. Las pérdidas en rendimiento estimadas en los departamentos andinos, según Franco et al. (2011), varían de acuerdo a los diversos niveles de infestación, es así que los departamentos de Cusco, Junín, Huánuco y La Libertad muestran las mayores pérdidas en el cultivo de papa (Figura 1.). En ciertas zonas de Arequipa y Puno se encuentran también quistes de la especie de *Globodera rostochiensis* (Ver Tabla 3.).

Departamentos	Huevos + Juveniles 2 (J ₂)/cc suelo	
	Rango	Promedio
Cajamarca	1.00 - 641.56	205.36
La Libertad	1.00 - 93.51	28.82
Junín	1.02 - 2161.38	466.86
Ayacucho	1.00 - 508.90	121.32
Huancavelica	1.80 - 2130.00	1065.90
Huánuco	1.05 - 290.58	107.18
Apurímac	1.00 - 1328.80	664.90
Arequipa	1.09 - 647.52	156.33
Cusco	14.00 - 840.00	254.51

Puno	0.00 - 820.76 Rango mín. y máx.: 0.00 - 2161.38	92.88 Promedio Total: 316.41
------	---	---------------------------------

Tabla 3. Niveles de infestación por *Globodera sp.* (Huevos + J₂) en muestras de suelo de diferentes departamentos andinos del Perú.

Fuente: Franco et al., 2011

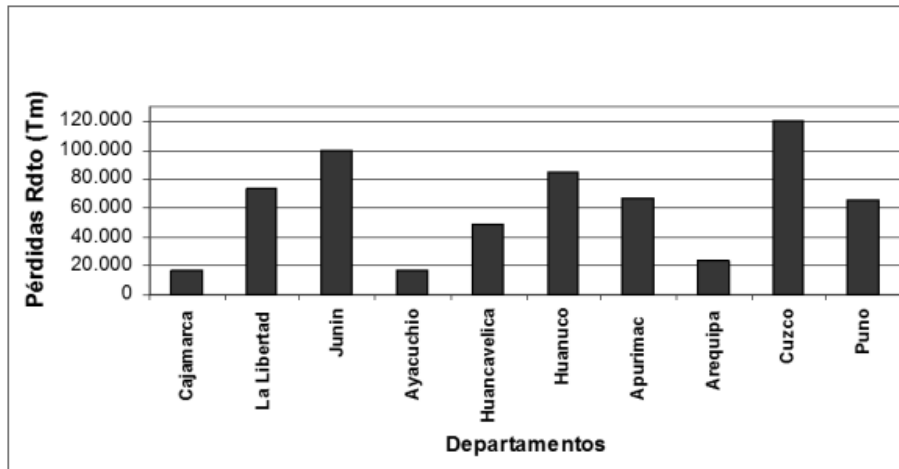


Figura 1. Pérdidas en el rendimiento (Toneladas métricas Tm) causadas por *Globodera spp.* en 10 departamentos andinos de Perú.

Fuente: Franco et al., 2011

2.1.4. MORFOLOGÍA

Los miembros del orden Tylenchida, grupo al cual pertenece *Globodera pallida*, poseen 6 estadios durante su ciclo de vida: huevo, J₁ primer estadio larvario, J₂ segundo estadio larvario, J₃ tercer estadio larvario, J₄ cuarto estadio larvario y el estadio adulto (Ver Figura 2.; Coyne et al., 2007). Los estadios inmaduros considerados desde J₁ a J₄ son considerados también como estadios juveniles.

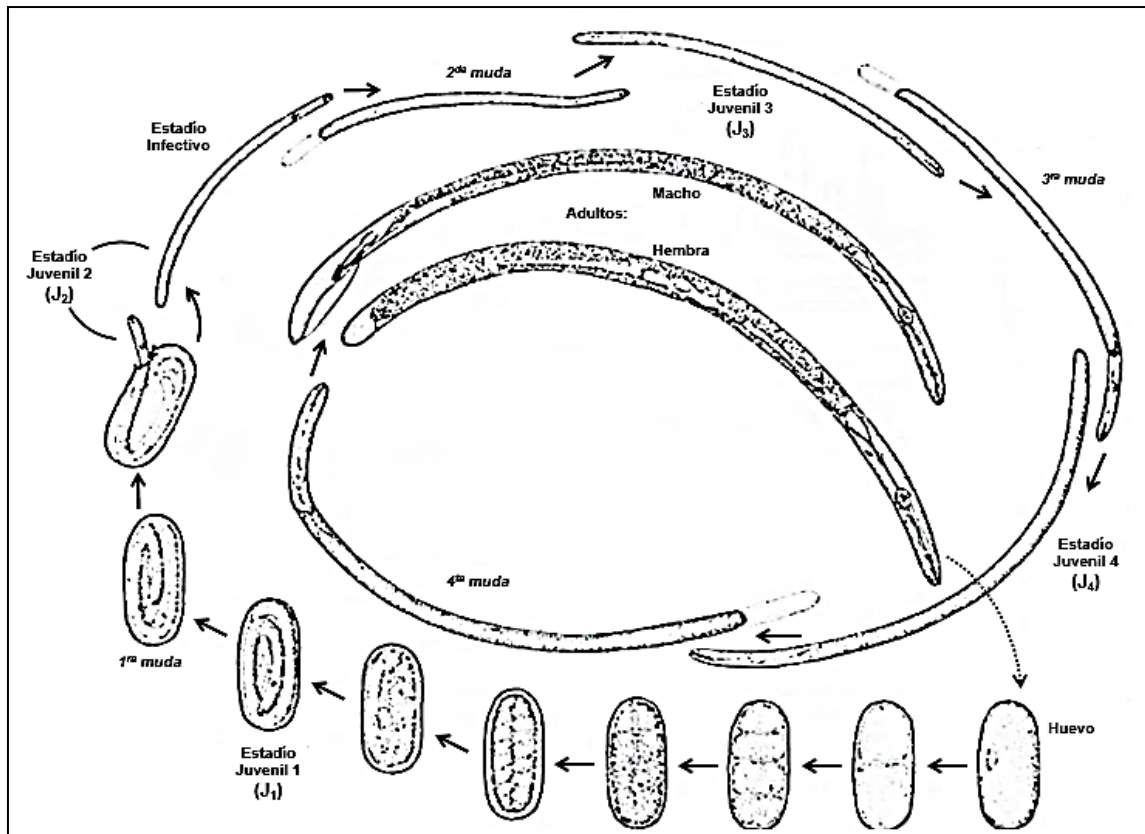


Figura 2. Estadios de nematodos parásitos de plantas.
Fuente: Adaptado de Venkatachalam R. et al. 2011.

Huevos.

Son de forma ovalada y están cubiertas por 3 membranas: capa externa de naturaleza proteica, capa media conformada por quitina y la capa interna integrada por lípidos (Venkatachalam et al., 2011). Se encuentran en el interior de los quistes, que es la etapa de resistencia a factores adversos del medio ambiente.

Juveniles.

Son nemátodos filiformes no segmentados. Poseen cuerpo transparente y cilíndrico, que en la madurez puede tomar la forma de huso. La primera muda se lleva a cabo en el

interior del huevo cuando el estadio juvenil 1 (J_1) se convierte a juvenil 2 (J_2) y rompe la membrana del huevo. La longitud del estadio J_2 se encuentra entre 0.5 a 4 mm, mientras que el diámetro está comprendido entre 0.05 a 0.25 mm. Carecen de sistema circulatorio y respiratorio (Venkatachalam et al., 2011).

Al estadio J_2 se le llama también infectivo, debido a la presencia de un estilete en la boca (ver Figura 3; Kleynhans., 2009), que sirve como herramienta para perforar células vegetales y poder alimentarse. El esófago actúa como una bomba de succión, mientras que las glándulas secretan enzimas digestivas que facilitan la ingestión del alimento. Es así que el estilete posee funciones de: penetración, migración, mantenimiento de las células alimenticias y digestión del citoplasma (Esquivel., 2009).

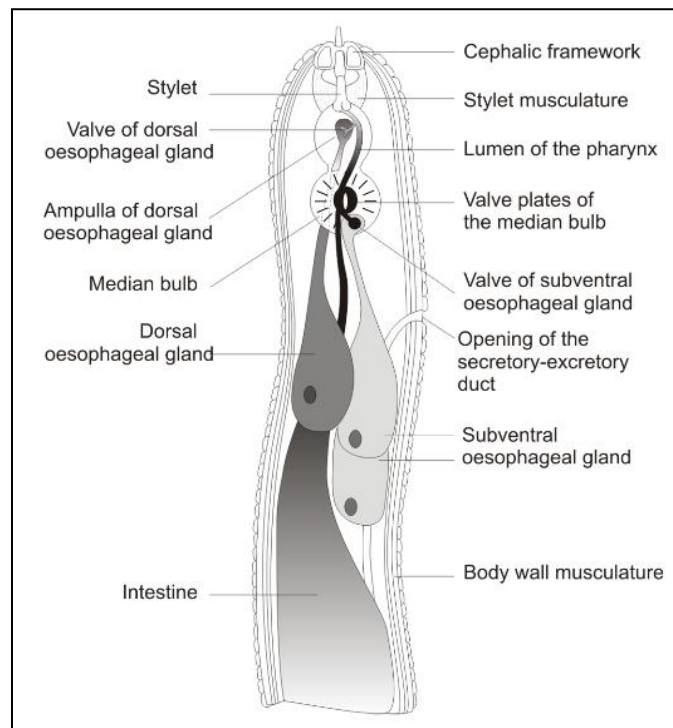


Figura 3. Representación esquemática del Juvenil 2 (J_2) de *Globodera pallida*. Fuente: Thorpe., 2012

Las dos primeras funciones que cumple el estilete, permite al estadio J_2 ingresar en la

zona de elongación de las raíces, lugar donde las células están en constante expansión para aumentar en longitud la raíz. Una vez que el J₂ se encuentra en el interior de la raíz, éste realiza la migración hacia el xilema rompiendo células vegetales haciendo uso del estilete. Establecido en una zona de la raíz, genera la formación de sincitios, los cuales otorgan alimento al nemátodo mediante la digestión del citoplasma, razón por la cual a estas estructuras formadas se las denomina células alimenticias.

Es por esta razón que *Globodera pallida* se la considera como un endoparásito obligado, que a su vez se caracteriza por ser sedentario, por sus fases de ciclo que se desarrollan en el interior de las raíces atacadas. En el siguiente estadio, el estadio juvenil 3 (J₃) se empieza a formar los órganos reproductores tanto para machos y hembras, para que posteriormente se genere el estadio juvenil 4 (J₄) y los adultos.

Adulto.

En el estadio juvenil 4 (J₄) se presenta el dimorfismo sexual basado en las marcadas diferencias morfológicas entre machos y hembras. El macho mide aproximadamente 1200 um de largo y 28 um de ancho, este no se encuentra en la raíz, es móvil, vermiforme y migra a través de la raíz para encontrar a la hembra y fertilizarla (Humphreys., 2006; Yen., 2015) (Ver Figura 4 y 5). Mientras tanto, la hembra permanece alimentándose del hospedero, que posteriormente cambia de forma parecido a un saco o bolso reproductivo.

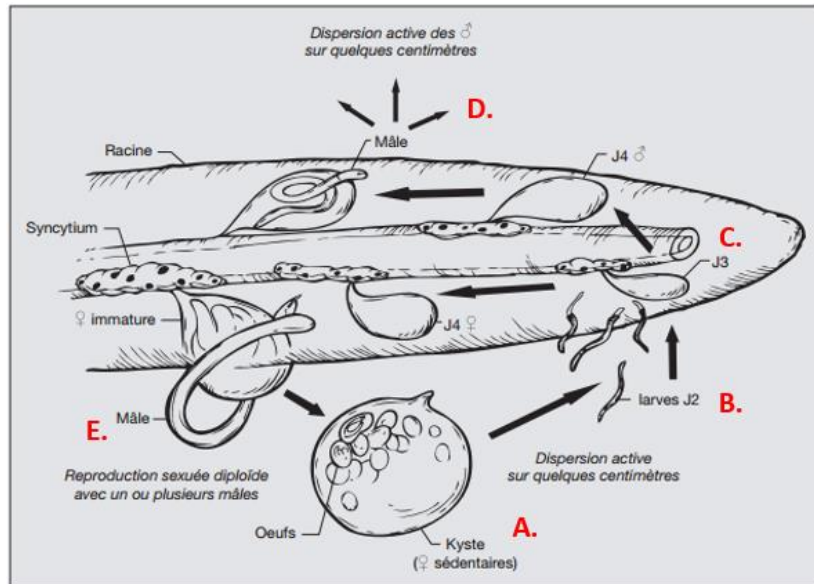


Figura 4. Etapa de diferenciación sexual en el ciclo biológico de *Globodera pallida*. (A.) Los juveniles ubicados en el interior de los quistes, al percibir el exudado radicular, mudan del estadio J₁ al J₂, donde estos últimos penetran la raíz (B.). El estadio juvenil J₃ (producto de la segunda muda) es sedentario y se establece en las zonas de alimentación (sincitio) (C.), hasta mudar al estadio J₄, etapa de diferenciación sexual. En esta última etapa, el macho se encuentra fuera de la raíz (D.) con el objetivo de ubicar a la hembra y fertilizarla (E.).
Fuente: Chauvin et al., 2008.

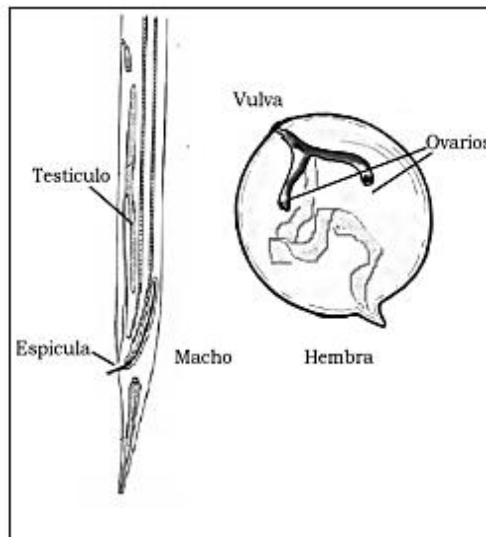


Figura 5. Diferenciación morfológica entre el macho y la hembra de *Globodera pallida*.
Fuente: Cartaya., 2008

Quistes.

Los quistes vienen a ser el resultado de la muerte de las hembras, son esféricos y miden entre 500 - 600 um (Humphreys., 2006). En el interior del quiste se encuentran alrededor de 200 a 800 huevos, es por tal razón que también se las denomina a

Globodera pallida como nemátodo quiste (Ver Figura 6.). La capacidad de enquistarse, permite que la futura progenie sobreviva sin el hospedero habitual por largos periodos de tiempo en el medio ambiente, y de esa manera permanece en estado dormante por muchos años (Yen., 2015). La formación de fases quísticas de resistencia ante situaciones adversas, permite al nematodo adaptarse a los distintos factores climáticos y edáficos (Ruano., 1999).



Figura 6. Huevos y J₂ en el interior de un quiste de *Globodera pallida*. Aumento visual de 400X.

2.1.5. FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS QUE AFECTAN AL DESARROLLO DEL NEMÁTODO

La temperatura del suelo repercute sobre la eclosión de los Juveniles 2 (J₂). En el caso de *Globodera rostochiensis*, los suelos considerados fríos declinan la eclosión de J₂ a un 18%; aquellos suelos con temperatura de 30°C la eclosión puede alcanzar un 95%. Estudios comparativos han demostrado que *Globodera pallida* se desarrolla mejor que *G. rostochiensis* a bajas temperaturas (Humphreys., 2006). La penetración de los J₂ de *G. pallida* ocurre cuando la temperatura se encuentra alrededor de 10 C. Sobreviven a temperaturas de -15 C y desecamiento del suelo por largos periodos (Humphreys., 2006; Greco & Crozzoli., 1995).

La textura de los suelos también es un factor abiótico determinante. Se destaca que en suelos arcillosos y limosos existe un 32% de eclosión y en los arenosos está arriba del 60% de eclosión. Como factor biótico, los exudados radiculares estimulan la eclosión entre un 60 a 80%

Por otro lado, el contenido de humedad óptimo está entre el 40 y el 80% de la capacidad de retención del suelo. Las mejores condiciones de humedad para la vida de los nematodos es cuando el contenido de agua en el suelo se limita a una película envolviendo las partículas del suelo (Kleynhans., 2009). La sequía excesiva puede frenar o incluso matar al estadio J₂, el cual necesita de manera obligada la presencia de películas de agua para su desplazamiento para ubicar la raíz e infectar. Igual ocurre con el encharcamiento prolongado, que por falta de oxígeno en el suelo afecta igualmente al nemátodo del quiste de la papa

2.2.CULTIVO DE PAPA

2.2.1 ORIGEN DEL CULTIVO DE LA PAPA

Los registros históricos detallan que la papa estuvo vinculada con las culturas más remotas del Perú. Hace 10 000 u 8 000 años, cuando se inició la agricultura en la “chacra primitiva”, se sembraron diferentes especies de papas silvestres que se cruzaban entre ellas. A través de los años, el agricultor seleccionó híbridos que producían tubérculos más grandes, menos amargos y mejor adaptados a las diferentes condiciones de suelos y climas de los Andes peruanos (Egúsquiza., 2000).

En el siglo XVI, luego de la invasión española en el continente americano, la papa llegó a Europa y al país de España en el año 1570. Años más tarde, el tubérculo fue introducido a las colonias inglesas entre los años 1588 y 1593 (Jones., 1988), después

pasó a Norteamérica, África, Centroamérica y países asiáticos: Japón, India, China a mediados del siglo XVII (Chávez., 2004).

2.2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PAPA

Reino: Vegetal

División: Fanerógama

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Dicotiledóneas

Subclase: Simpétala

Sección: Anisocárpeas

Orden: Tubifloríneas

Familia: Solanaceae

Género: Solanum

Sección: Petota

Subsección: Potatoe

Especies: *Solanum spp.*

Fuente: Ochoa C., 1999

2.2.3 VARIEDADES NATIVAS Y MEJORADAS

Variedades Nativas: Son aquellos cultivos locales que fueron sometidos a un proceso de selección empírica a través de miles de años por parte de los agricultores y por selección natural (clima, plagas y enfermedades) (Devaux et al., 2010). Los primeros países que domesticaron las variedades nativas de papa fueron Perú y Bolivia, exclusivamente en los alrededores del lago Titicaca, lugar donde se encuentra la mayor variabilidad genética de especies de variedades nativas (Estrada., 2000). Por otro lado, en las tierras costeras al sur de Chile se encuentra otro grupo de variedades nativas que sufrieron hibridación natural con *S. tarijense*, especie encontrada en el sur de Bolivia y norte de Argentina (Ponce., 2013).

En el Perú existen alrededor de 3000 variedades de papas nativas, que se concentran en los Andes del centro y sur peruano (Ponce., 2013). Esta biodiversidad es producto de

los métodos de conservación que realizaron las culturas andinas milenarias, hasta los pequeños productores que se encuentran a lo largo de la sierra peruana. En este momento, las variedades nativas peruanas vienen a ser fuente interesante para la generación de nuevas variedades resistentes a enfermedades que aquejan al cultivo de papa. Además, las variedades nativas son importantes por sus concentraciones altas de vitaminas, micronutrientes esenciales y antioxidantes. Todas estas características colocan a las variedades nativas como eje estratégico para fortalecer la seguridad alimentaria y el déficit nutricional en nuestro país y países en vías de desarrollo (Fonseca., 2014)

Variedades Mejoradas: Se denomina variedad mejorada al resultado de mejoramientos realizados por investigadores con materiales nativos e introducidos. Se caracterizan por tener mayor capacidad productiva que la mayoría de variedades nativas. Este germoplasma viene a ser el resultado y la aplicación de conocimientos de genética y herencia desarrollados, en un inicio, en el cruzamiento tradicional de plantas.

Actualmente, se tiene programas de mejoramiento genético dirigido los cuales permiten escoger progenitores con ciertas características fenotípicas de interés, logrando asegurar que la progenie sea aún mejor que sus parentales. Gracias a la aplicación de marcadores moleculares a las características de interés, se mejoraron los métodos tradicionales de cruzamiento, siendo este el resultado moderno de una serie de estudios para optimizar, mejorar y preservar las variedades de papa. Mediante el Consorcio para la secuencia del genoma de la papa (PGSC, siglas del inglés Potato Genome Sequencing Consortium) se tiene conocimiento de genes, proteínas y sus características funcionales. Estos avances permiten el desarrollo de la genómica estructural y funcional de la papa, que proporcionan información acerca de qué genes de interés son candidatos para su

uso en los programas de mejoramiento genético, y de esta manera contribuir con el lanzamiento de variedades de papa mejoradas.

Hoy en día, la mayoría de variedades de papa (nativas y/o mejoradas) son susceptibles al nemátodo quiste de la papa *G. pallida*. Este panorama se debe a que el hospedero y el parásito han co-evolucionado, dando como consecuencia la renovación de estrategias de invasión del nemátodo. Sin embargo, se asume la existencia de variedades de papa que poseen genes candidatos de resistencia, resultado de la presión del patógeno. Por tal motivo, el uso de variedades de plantas resistentes permitiría incentivar la reducción del uso indiscriminado de nematicidas (Williamson et al., 2006), las cuales afectan: al desarrollo de comunidades fúngicas y bacterianas benéficas para el cultivo de papa, a la formación del suelo y la degradación de la materia orgánica. De esta manera, la obtención de variedades de papa resistentes a *G. pallida* contribuiría a la conservación del medio ambiente y su fitosanidad.

2.2.4 CICLO DE VIDA DE LA PAPA

El desarrollo de la planta de papa se inicia a partir del tubérculo semilla, el cual debe ser colocado en suelo bien drenado, de consistencia arenoso o franco, y con alto contenido de materia orgánica. Como el tubérculo semilla es la etapa inicial del ciclo de vida de la papa, éste debe encontrarse libre de enfermedades, poseer buenos brotes y pesar aproximadamente entre 30 a 40gr.

El ciclo de vida de papa es posible dividirlo en estados de crecimiento (Bouzo C. 2009), donde se inicia con la aparición de brotes en el tubérculo semilla, para que posteriormente comenzar con el desarrollo vegetativo para alcanzar la madurez y la

tuberización. El ciclo puede comprender entre 3 a 7 meses, dependiendo de los factores climatológicos y prácticas agrícolas (Cucás., 2014). Los estados de crecimiento son:

Estado de crecimiento I – Brotación: Periodo del ciclo de vida de la papa donde los tubérculos semilla dejan el estado de reposo para desarrollar brotes, que gracias a las reservas contenidas en el tubérculo llegan a crecer de manera sostenida.

Estado de crecimiento II – Crecimiento vegetativo: Se destaca la formación de hojas, desde los primordios foliares hasta las hojas completas, y la fotosíntesis se incrementa. En la parte subterránea, comienza el crecimiento activo de raíces y rizomas.

Estado de crecimiento III – Tuberización: Comprende la formación del tubérculo a partir de rizomas y está mediada por hormonas que son producidas en la planta. En muchas variedades de papa, el proceso de tuberización coincide con el proceso de floración

Estado de crecimiento IV - Crecimiento de los tubérculos: Comienza la expansión de células de los tubérculos, además de divisiones celulares del parénquima. En esta etapa se depositan carbohidratos, agua y nutrientes en las células que se encuentran en constante expansión. Además, los factores de temperatura, fertilización, edad fisiológica, riego, manejo de plagas y enfermedades son condicionantes para el rendimiento y calidad del tubérculo (Morales., 2011).

Estado de crecimiento V - Madurez: La parte aérea cambia a color amarillo, existe pérdida de hojas y la fotosíntesis disminuye gradualmente. Es en esta etapa del ciclo de

vida donde los tubérculos retardan su crecimiento y alcanzan la mayor acumulación de materia seca, engrosando el peridermo (epidermis o piel) (Morales., 2011).

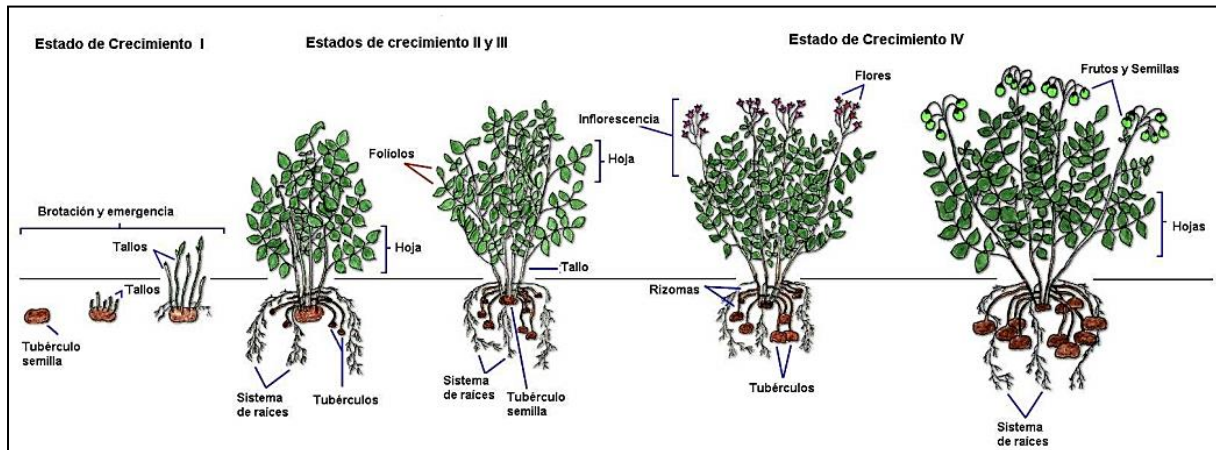


Figura 7. Estados de crecimiento del cultivo de papa.
Fuente: Bouzo., 2009.

2.2.5. CICLO BIOLÓGICO DEL NEMÁTODO QUISTE EN PAPA

En el estado de crecimiento II del ciclo de vida de la papa, donde comienza el crecimiento activo de las raíces, los J_2 (estadio infectivo) de *G. pallida* emergen de los huevos bajo el estímulo del exudado radicular de la planta de papa (Mulder., 1996; Jones et al., 2013), para así localizar la raíz e infectarla (Figura 8.). El periodo de sobrevivencia de J_2 fuera del hospedero es de alrededor de 3-7 días, por lo tanto, los juveniles tienen la necesidad de localizar lo más antes posible al hospedero (*Solanum sp.*) y alimentarse (Bates., 2000). Atraídos por exudados radiculares, los J_2 se localizan en la zona de elongación de la raíz (Mancuso et al., 2005), donde penetran al interior por detrás de los puntos de crecimiento y en su interior se dirigen al xilema (Díaz., 2011) y allí viven y se alimentan durante dos mudas o cambios adicionales (Franco., 1994).

Durante este proceso de penetración, las secreciones glandulares (saliva) contribuyen a la acción mecánica del estilete. El daño mecánico que ocasiona el nemátodo permite el ingreso de otros agentes patógenos como virus, hongos y bacterias, complicando la enfermedad (Kleynhans., 2009). La saliva y las sustancias de digestión modifican el contenido celular vegetal (Kleynhans., 2009), dando como consecuencia la disolución de las paredes celulares y la fusión celular originando el sitio de alimentación denominado Sincitio (Williamson., 1999).

El sincitio viene a ser una estructura de alimentación multinucleada conformada por componentes de la disolución de la pared celular y la fusión de protoplastos de células adyacentes. Cuando el sincitio se encuentra en formación, la síntesis de ADN y el metabolismo se incrementa permitiendo así la alimentación del nemátodo. Los vasos cribosos y leñosos, denominados también como floema y xilema respectivamente, son los encargados de conducir los nutrientes, azúcares, agua y sales inorgánicas a lo largo de la planta; la formación del sincitio interrumpe la conducción de estos vasos, limitando la funcionalidad de las raíces. Por consiguiente, las plantas de papa atacadas por el nematodo presentan crecimiento y rendimiento reducidos, la senectud se anticipa y, a veces, en suelos muy infestados, el follaje presenta un ligero amarillamiento (Rivas., 2005).

La hembra está permanentemente punzando con el estilete a las células adyacentes del sincitio (Franco., 1986), hasta que su desarrollo se complete en aproximadamente 10 días después de su penetración y muda a través de los estadios tercero y cuarto hasta su forma adulta (Fullaondo., 1998). Es en ese preciso momento que las hembras se encuentran como cuerpos esféricos y los juveniles machos salen de las raíces para

fecundarlas. Después de la fertilización la hembra muere y forma el quiste, en cuyo interior se encuentra la siguiente generación de huevos.

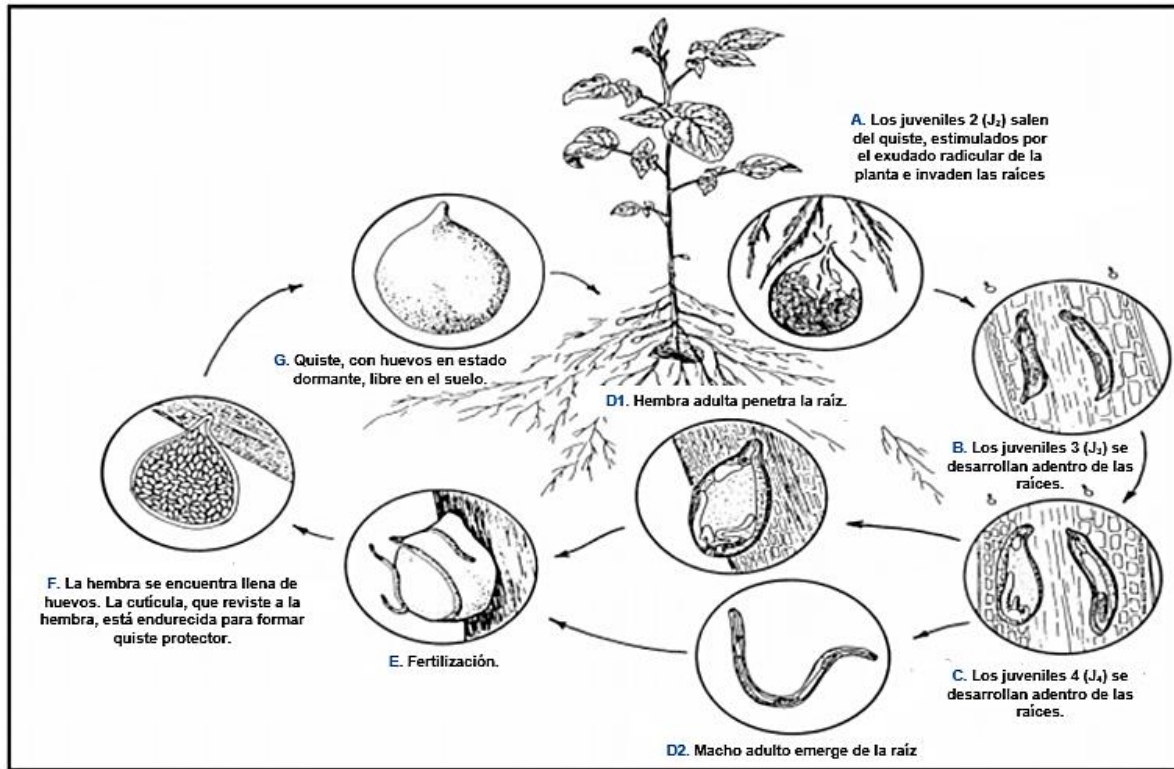


Figura 8. Ciclo biológico de *Globodera pallida*.
Fuente: Adaptado de Rowe., et al. 2002 (Rivas., 2005).

Las hembras se vuelven sedentarias y se adhieren a la raíz dentro del tejido de la corteza. Su cuerpo se ensancha a medida que los ovarios aumentan de tamaño (Mulder., 1997), rompen las células de la raíz y llegan a ser visibles fuera de esta, aunque la cabeza y el cuello permanecen dentro del tejido. Los machos conservan su forma elongada, abandonan la raíz, localizan hembras que están rompiendo la superficie radicular y se aparean con ellas. (Franco., 1986).

La hembra muerta se convierte en un quiste marrón y duro, resistente a las condiciones ambientales desfavorables. La plaga se disemina cuando los quistes se encuentran adheridos a los tubérculos, maquinaria, recipientes y herramientas de campo (CIP., 1996). Los quistes se desprenden fácilmente de las raíces. Cada uno contiene y protege

desde unos pocos hasta 600 huevos. Los huevos se pueden activar cuando quiera que se siembre papa (Franco., 1994). El segundo estado juvenil emerge cuando se presenta como estímulo el exudado de las raíces. (Fullaondo., 1999)

Se destaca que, por cada ciclo de vida de papa finalizada, se origina una nueva generación (progenie) de nemátodos, lo cual toma de 6 a 10 semanas. En ese tiempo y si no hay competencia por alimento, la población de nematodos se puede multiplicar en proporciones hasta de 1 a 50. (Franco., 1994).

2.2.6. SÍNTOMAS DE ATAQUE

Las especies que se encuentran en el género *Globodera* no causan inmediatamente síntomas aéreos, sin embargo, las primeras lesiones histológicas se encuentran a nivel de raíz (necrosis celular), debido a las punzaciones originadas por los J₂ (Rivas., 2005).

El primer síntoma es el notorio crecimiento retardado de la planta, debido a que el desarrollo y el mantenimiento de los sincitios compiten con el crecimiento de la planta (Franco., 1986). Las plantas infestadas pierden su color natural, se ven achaparradas, enfermas, y se marchitan fácilmente durante las horas más calurosas y secas del día. Además, el daño que realizan los nematodos causa estrés en la planta, debido a la pérdida de agua y al disturbio del metabolismo de los nutrientes en el hospedero. Los tubérculos son más pequeños que los de las plantas sanas y el rendimiento se reduce (Franco., 1986). Adicionalmente, se puede presentar una reducción en el crecimiento de las raíces (Kleynhans., 2009).

Los síntomas que origina *Globodera pallida* en la planta son confundidos con las consecuencias que origina la falta de agua o el desorden de absorción de minerales

(Coyne et al., 2007). Un examen cuidadoso de las raíces revela la presencia de cuerpos pequeños y esféricos que miden entre 0,5 y 1 mm de diámetro (quistes) y tienen color blanco, amarillo o marrón. Se las puede apreciar como cuentas de collar.

2.3.GENES DE RESISTENCIA

Las plantas desarrollaron diversas estrategias para defenderse de los patógenos como: bacterias, hongos, virus, nemátodos e insectos. Las estrategias de control contra patógenos, involucran mecanismos moleculares de resistencia o defensa, como son: a) pasivos o constitutivos y b) inducibles (Staskawicz et al., 1995; Gururani et al., 2012).

Se considera resistencia pasiva o constitutiva a la defensa que se encuentra permanente en la planta, es por ello que también se denomina como la primera barrera de resistencia.

En este tipo de resistencia se encuentran las barreras físicas y compuestos químicos que son utilizados para prevenir la invasión de agentes patogénicos. La acumulación de compuestos tóxicos contra microorganismos o fitófagos en las partes expuestas a ataques, es característico de este tipo de resistencia (Zhang et al., 2004).

Por otro lado, la respuesta o resistencia inducible (también denominada activa) viene a ser una respuesta al ataque de un patógeno, considerándose un mecanismo activo de defensa que involucra cambios en el metabolismo de la planta. Comprende la síntesis y acumulación de compuestos de defensa (Staskawicz et al., 1995), resultado de eventos complejos y coordinados que involucran la activación de genes de defensa.

Dentro del grupo de genes de defensa, se encuentran los genes R que codifican proteínas capaces de detectar una gama de fitopatógenos. Consecuencia de los estudios realizados por Harold Flor en la interacción del cultivo de lino y un patógeno fúngico, se determinó el modelo gen a gen, donde se acuña el término de gen de resistencia (R) a aquellos

genes que estén involucrados en los mecanismos de defensa que confieren resistencia a la planta hacia una enfermedad.

La forma en que se realiza la interacción planta - patógeno se basa en la interacción de los genes R (hospedero) y los genes de avirulencia Avr (patógeno) (Williamson., 1999). La modificación de la interacción Gen R x Gen Avr origina la enfermedad. Esta forma de interacción fue propuesta por Flor en 1947, que se fundamenta en el principio “receptor - estimulador” donde la percepción de la señal AVR por la proteína R (traducción del gen R), activa las respuestas de defensa de la planta (Van t Slot et al., 2002) (Ver Figura 9.). Los genes R son considerados como una estrategia importante para los programas de mejoramiento genético, debido a las bondades que ofrece con respecto a la reducción del crecimiento del patógeno con un mínimo daño hacia el hospedero, evitando el uso de pesticidas, protegiendo al medio ambiente (Gururani et al., 2012).

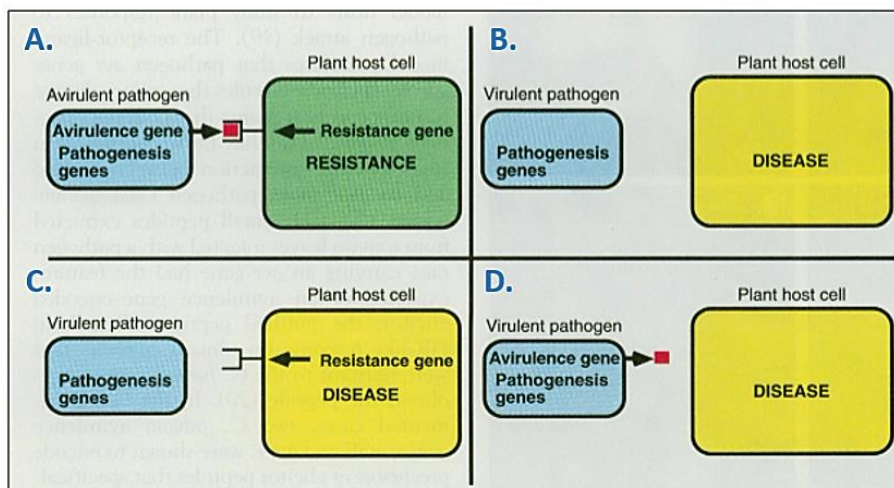


Figura 9. Interacción específica de genes de resistencia. (A.) Una planta se considera resistente cuando posee un específico gen R que reconoce el gen avirulente correspondiente del patógeno. (B., C. y D.) Todos los demás eventos, origina la enfermedad en el hospedero. Cuadro de color verde representa resistencia; cuadro de color amarillo representa susceptibilidad. **Fuente:** Staskawicz et al., 1995

Las proteínas R, fueron clasificadas de acuerdo a los dominios conservados a nivel de aminoácidos. García et al. (2004) menciona que de acuerdo a los dominios en común los genes R se clasifican en 5 clases (ver Figura 10.):

- a) Gen R con dominio de actividad proteína cinasa de serina / treonina.
- b) Gen R con dominios repetidos ricos en Leucina (LRR, Leucine Reach Repeats; por sus siglas en inglés).
- c) Gen R con dominio de unión al nucleótido (NBS, nucleotide binding site; por sus siglas en inglés). Este dominio NBS tiene la capacidad para unir nucleótidos trifosfato (ATP, GTP). Los genes con estructura NBS-LRR son abundantes en las plantas y tienen la habilidad de conferir resistencia incluso a nemátodos.
- d) Gen R con dominio de cierre de Leucina (LZ, leucine zipper, por sus siglas en inglés).
- e) Gen R con dominio semejante a los receptores TIR (*Toll/IL-1 Receptor*, por sus siglas en inglés).

De acuerdo a la propuesta de Gururani et al., (2012) (ver Imagen 11) las proteínas R, están divididas en 8 grupos, de acuerdo a la disposición estructural u orden de los dominios funcionales.

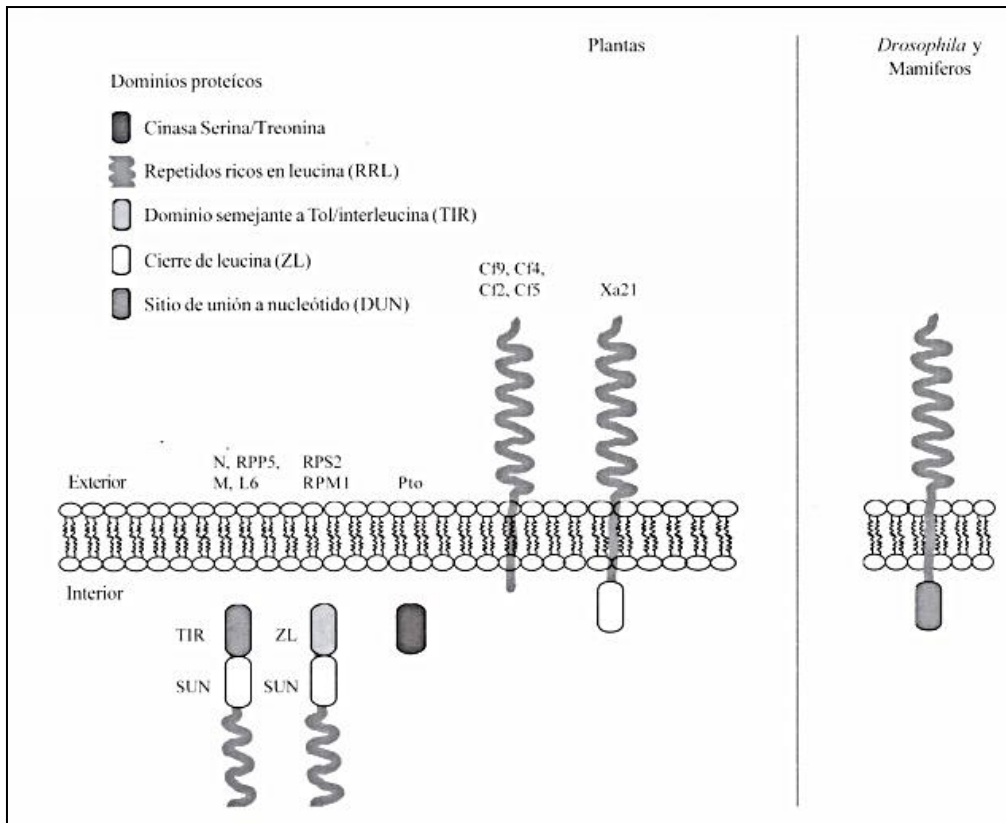


Figura 10. Proteínas codificadas por genes de resistencia.
Fuente: Hammond - Kosack y Jones. 2000 (García et al., 2004)

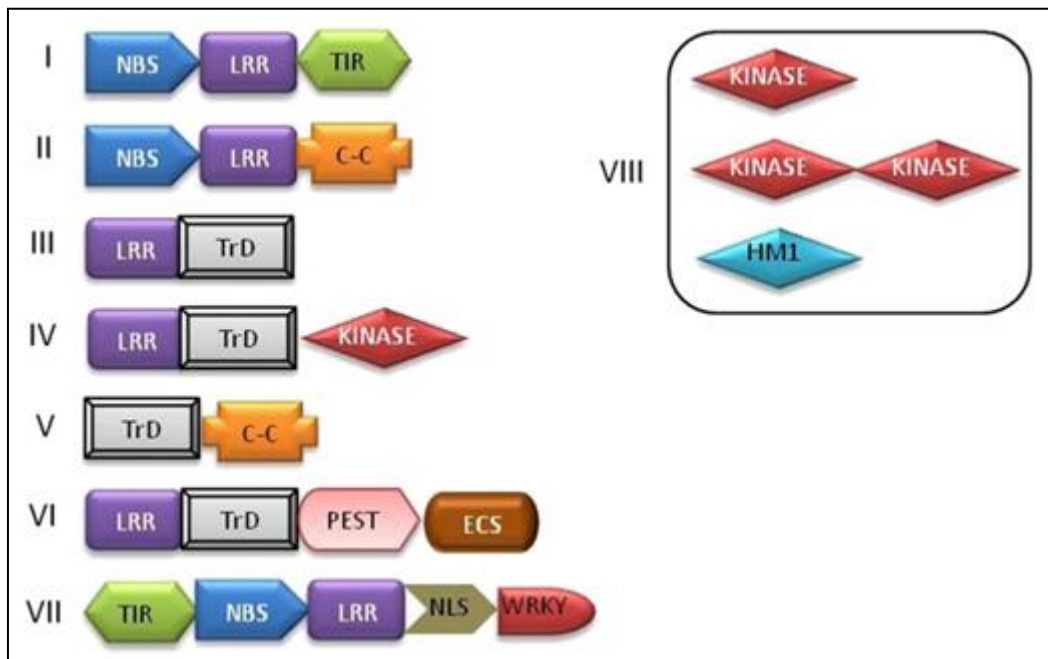


Figura 11. Principales clases de resistencia de la planta, de acuerdo a la disposición de los dominios funcionales. LRR - Leucine rich repeats; NBS - Nucleotide-binding site; TIR/Toll/ Interleukin-1- receptors; C-C - Coiled coil; TrD - Transmembrane domain; PEST - Protein degradation domain (proline-glycine-serine-threonine); ECS - Endocytosis cell signaling domain; NLS - Nuclear localization signal; WRKY - Amino acid domain; HM1 - Helminthosporium carbonum toxin reductase enzyme.
Fuente: Gururani et al., 2012.

La mayoría de los genes de R codifican dominios NBS-LRR, NBS y LRR (Lozano., et al. 2012). Las regiones motivo del dominio LRR participan en la interacción proteína - proteína, mientras que el dominio NBS se asemeja a una ATPasa que juega un papel importante en la apoptosis o muerte celular (activación de proteasas de apoptosis) (Williamson., 1999). El dominio NBS, por tanto, viene a ser esencial para la actividad catalítica de proteínas procariontas y eucariotas (Meyers B. et al 1999). Adicionalmente a estos dos dominios, ciertos genes de resistencia presentan un dominio LZ, involucrado también en la interacción proteína - proteína (Williamson., 1999).

De acuerdo a la variación del extremo amino terminal, las proteínas R que poseen la estructura NBS-LRR se las puede clasificar en dos clases: las que poseen y carecen el dominio TIR (*Toll/IL-1 Receptor*; por sus siglas en inglés) (Ellis et al., 2000; Bai et al., 2015). Las proteínas que se ubican en la primera clasificación, se encuentran exclusivamente en dicotiledóneas, y tienen homología con la región TIR que además contiene un dominio LRR. Las que no contienen el dominio TIR, poseen un dominio denominado CC (por sus siglas en inglés “coiled coil”), que juega un rol en la interacción proteína - proteína. Estos motivos CC se encuentran en dicotiledóneas y cereales (Pan et al., 2000).

La especificidad y variedad de estos genes para identificar un patógeno, radica en la diversidad de codones que codifican los aminoácidos o residuos en la región LRR (Ellis et al., 2000) y además en los procesos de duplicación, divergencia y las deleciones de pares de bases (Meyers et al., 1999). Sin embargo, la evolución de nuevas razas virulentas de patógenos, confiere a la plaga una estrategia de evasión a los genes R específicos. Este mecanismo presiona a las plantas a evolucionar generando nuevos genes R para resistir la invasión del patógeno (Hammond-Kosack et al., 1997; Marone., et al. 2013). Además, factores externos como la demografía determinan la frecuencia y

la diversidad de genes, mientras que la existencia de mutación origina la generación de nuevas resistencias específicas (Ellis., et al. 2000; Bai., et al. 2015).

Se debe tener en cuenta que además de los genes R, existen otros grupos de genes esenciales que participan en la cascada de señalización y respuesta para mediar la defensa contra patógenos (Meyers., et al 1999). Es el caso de la síntesis de fitoalexinas o proteínas relacionadas a la patogénesis (PR pathogenesis-related, por sus siglas en inglés), que se encuentran presentes una vez que la infección del patógeno se concreta en el hospedero (Achenbach et al., 2007). Otro ejemplo es el caso de soya (*Glycine max*) que posee genes relacionados a la resistencia a *Heterodera glycines*, los cuales están involucrados en las señales de traducción, transcripción, defensa, metabolismo y modificación de la pared celular (Mazarei et al., 2011). De la misma manera, Jolivet et al., (2007) mencionan la presencia de la expresión de genes relacionados a la regulación de la transcripción, rutas de señalización de resistencia, mecanismo de defensa y reguladores del ciclo celular, al momento de la interacción de los J₂ de *Globodera pallida* y el hospedero.

2.3.1. GENES DE RESISTENCIA A *Globodera pallida*

Los nemátodos formadores de quistes, se caracterizan por invadir a la planta de papa a nivel de raíz. En este grupo, se encuentran dos especies: *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida* (Evans et al., 1977), diferenciados morfológica y molecularmente tal como se indicó en la sección 1.2.2 referente a la clasificación taxonómica del nemátodo. Debido a esta diferencia de poblaciones del género *Globodera*, el hospedero (planta de papa) desarrolló genes de resistencia específicos para cada especie.

Desde 1948 se descubrieron genes para la resistencia a *G. rostochiensis* y *G. pallida*, en especies silvestres de cultivo de papa que atenuaban la invasión del nemátodo. Estos

genes han sido introgresados para realizar mejoramiento genético de plantas de papa y cultivares. El primer gen de resistencia a los nemátodos identificado en el genoma de la papa, empleando marcadores RFLP, fue el gen de dominancia monogénica *Gro1-4* para la resistencia a *G. rostochiensis*. Se identificó a partir de un híbrido interespecífico ($2n=2x=24$) generado entre *S. tuberosum* y especies de papa silvestre *S. spigazzini* (López., 2013). *H1* fue el siguiente gen descubierto, que confiere resistencia a la raza Ro1 de *G. rostochiensis*, ampliamente utilizado en mejoramiento de papa para la resistencia a nemátodos, utilizado para procesos de introgresión (Ellenby., 1952). La rápida divulgación y el uso extensivo de variedades con el gen H1, tuvo como consecuencia el incremento de casos de cultivos de papa infestadas con *G. pallida* (Asano et al., 2012). Este evento originó la búsqueda de nuevos genes de resistencia a *G. pallida*, encontrando al gen *Gpa1* en *S. tuberosum sp. andigena* (gen mayor para la resistencia). Posteriormente, dos QTLs (Quantitative trait locus; por sus siglas en inglés) con resistencia a *G. pallida*, *Gpa5* y *Gpa6*, fueron mapeados en los cromosomas V y IX. Más adelante el gen *Grp1* fue descubierto, un QTL para resistencia de amplio espectro, para las dos especies del género *Globodera sp.* (Roupe van der Voor et al., 2000). A continuación, se detallan los genes de resistencia y marcadores moleculares para especies del género *Globodera sp.* en el cultivo de papa:

Gen	Crom.	Resist.	Marcadores	Fuente	Referencia
<i>Grp1</i>	V	<i>G. rostochiensis</i> , <i>G. pallida</i>	GP21		Roupe van der voort <i>et al.</i> , 1998
<i>H1</i>	V	<i>G. rostochiensis</i>	CP113, CD78	<i>S. tub. ssp. andigena</i>	Gebhardt <i>et al.</i> , 1993
<i>Gro1.2_QTL</i>	X	<i>G. rostochiensis</i>	CP105		Kreike <i>et al.</i> , 1993
<i>Gro1.3_QTL</i>	XI	<i>G. rostochiensis</i>	TG36		Kreike <i>et al.</i> , 1993
<i>GroVI</i>	V	<i>G. rostochiensis</i>	TG69	<i>S. vernei</i>	Jacobs <i>et al.</i> , 1996
<i>Gro1</i>	VII	<i>G. rostochiensis</i>	CP56, St3.3.2	<i>S. spegazzinni</i>	Paal <i>et al.</i> , 2004
<i>Gro1-4</i>	VII	<i>G. rostochiensis</i>	Gro1-4		Gebhardt <i>et al.</i> , 2006
<i>Gro1.4</i>	III	<i>G. rostochiensis</i>	Ssp8		Kreike <i>et al.</i> , 1996
<i>Gpa4_QTL</i>	IV	<i>G. pallida</i>	Stm3016		Bradshaw <i>et al.</i> , 1998
<i>GpaIV^{adg}</i>	IV	<i>G. pallida</i>	Stm3016, C237		Moloney <i>et al.</i> , 2010
<i>GpaV_{wn}</i>	V	<i>G. pallida</i>	HC		Sattarzadeh <i>et al.</i> , 2006,
<i>Gpa_QTL</i>	V	<i>G. pallida</i>	Ssp72		Kreike <i>et al.</i> , 1994
<i>Gpa5_QTL</i>	V	<i>G. pallida</i>	GP21, GP179		Roupe van der voort <i>et al.</i> , 2000
<i>GpaVs spl_QTL</i>	V	<i>G. pallida</i>	GP179, GP21, TG432	<i>S. sparsipilum</i>	Caromel <i>et al.</i> , 2005
<i>Gpa5_QTL</i>	V	<i>G. pallida</i>	SPUD1636		Bryan <i>et al.</i> , 2002
<i>Gpa6_QTL</i>	V	<i>G. pallida</i>	SPUD1636		Bryan <i>et al.</i> , 2002
<i>Gpa2</i>	XII	<i>G. pallida</i>	GP34, 77R	<i>S. tub. ssp. andigena</i>	Roupe van der voort <i>et al.</i> , 1998
<i>Gpa6_QTL</i>	IX	<i>G. pallida</i>	CT220		Roupe van der voort <i>et al.</i> , 2000
<i>GpaXI1tar</i>	XI	<i>G. pallida</i>	GP163		Tan <i>et al.</i> , 2009
<i>GpaM1_QTL</i>	V	<i>G. pallida</i>			Caromel <i>et al.</i> , 2003
<i>GpaXIs spl_QTL</i>	V	<i>G. pallida</i>			Caromel <i>et al.</i> , 2005
<i>GpaM2_QTL</i>	VI	<i>G. pallida</i>			Caromel <i>et al.</i> , 2003
<i>GpaM3_QTL</i>	XII	<i>G. pallida</i>			Caromel <i>et al.</i> , 2003

Tabla 4. Relación de genes de resistencia y marcadores moleculares desarrollados para *Globodera rostochiensis* y *G. pallida* en el cultivo de papa
Fuente: López., 2013.

Estos genes proveen cierto grado de resistencia hacia el nemátodo. Tal es el caso de 12 loci de resistencia, que confieren una resistencia parcial: *Gro 1.2*, *Gro 1.3*, *Gro 1.4*, *Gpa*, *GRp1*, *Gpa5*, *Gpa6*, *Gpa M1*, *Gpa M2*, *Gpa M3*, *GpaXI^{tar}* y *GpaIV^{S_{adg}}*. Por otro lado 4 loci: *GRo1*, *H1*, *GroVI* y *Gpa2* en combinación con *GpaV^{S_{spl}}* *GpaXI^{S_{spl}}* confieren resistencia casi absoluta a uno o más patotipos. *Gpa2* proporciona resistencia dominante a distintas poblaciones de *G. pallida*. *GpaIV^{S_{adg}}* proporciona resistencia parcial a *G. pallida* Pa2/3. (Asano., et al. 2012)

Según Gebhardt y Valkonen, detallan que, en comparación a las resistencias cuantitativas en otras enfermedades, en el caso de nemátodos está controlada por pocos QTLs con efecto duradero (López., 2013).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

Las actividades experimentales se realizaron en los laboratorios de la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y en la Estación Experimental Agraria Santa Ana - INIA de la provincia de Huancayo. En esta última institución se efectuó el sistema de cultivo de plantas denominado aeropónico y se ejecutaron los procesos de infección de plantas con juveniles 2 (J₂) de *Globodera pallida*.

3.2. MATERIALES

3.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Quistes de *Globodera pallida*. En esta etapa del ciclo biológico de *G. pallida*, los quistes son macroscópicos, facilitando la colecta de los mismos en muestras de suelo infestadas por el nemátodo. Otra ventaja de esta fase quística es que en el interior se encuentran huevos y juveniles en estado dormante, prestos a detectar el exudado radicular de la planta de papa para poder eclosionar y salir del quiste. Este último evento fue tomado en consideración para la obtención de inóculos infectivos (Juveniles 2 (J₂) de *G. pallida*) para los ensayos de infección en la presente investigación. Los quistes del nemátodo fueron aislados de muestras de suelos infestados por quistes de la región del Cusco.

Plántulas de la variedad María Huanca (CIP Number: 279142.12). Variedad de papa mejorada catalogada como resistente a *Globodera pallida*, liberada en el año 1987, siendo su lugar de origen el CIP-INIPA (Instituto Nacional de Investigación y Promoción Agraria) (INIA. 2012). Es una planta tetraploide del resultado del cruzamiento del progenitor femenino clon 276012.24 (*Solanum andigena*) y el progenitor masculino AM66-246 que proviene de la especie *Solanum vernei* retrocruzada a *S. tuberosum* subsp. *tuberosum* (Llontop et al., 1989).

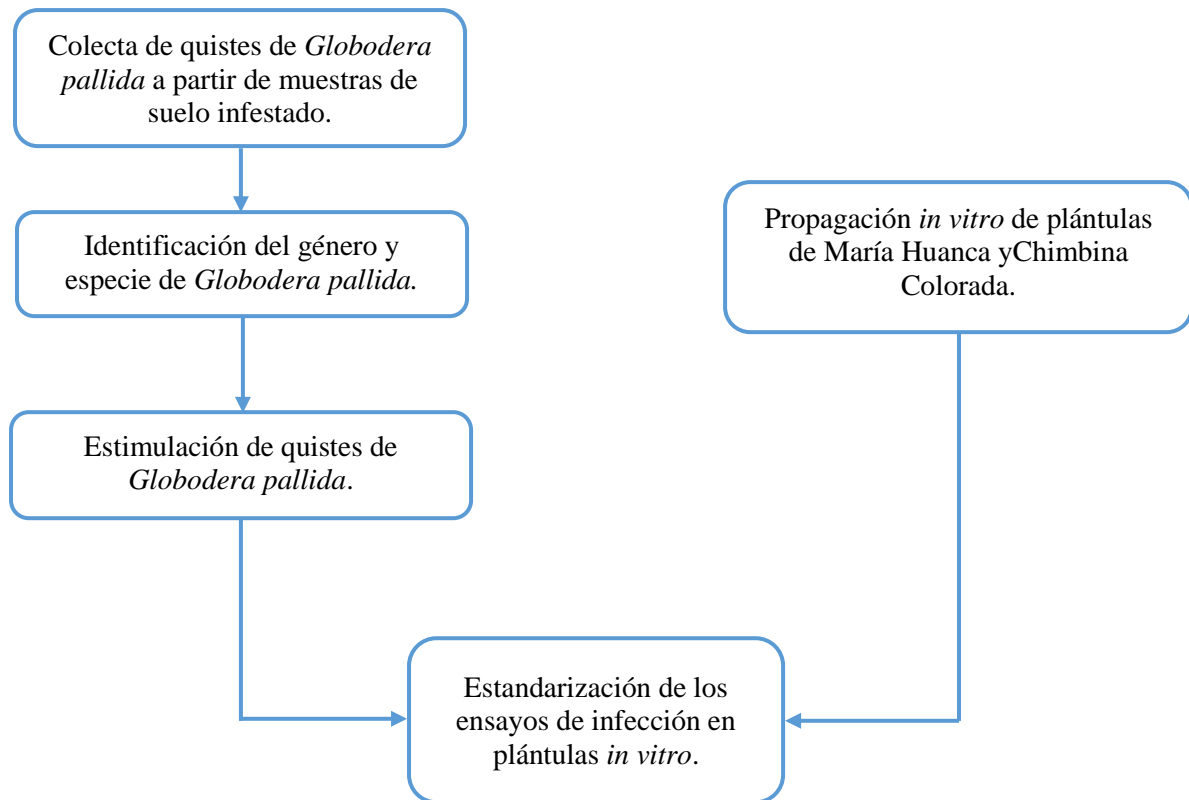
Posee brotes rosados, la forma de los tubérculos es oblongo alargada, piel roja, ojos superficiales y pulpa de color blanco, ocasionalmente con estrías moradas.

Esta variedad se caracteriza por ser resistente a la invasión de *Globodera pallida* teniendo una fluctuación en su rendimiento entre 20 t/ha y 60 t/ha. (Llontop et al., 1989). A su vez, fenotípicamente se observa que reduce de manera considerable la población de quistes de *Globodera pallida*, permitiendo así la ausencia de síntomas característicos de una invasión por este nematodo. La atenuación de la invasión y/o desarrollo del nematodo quiste de la papa (*G. pallida*), estaría basada en un aspecto molecular que involucra la expresión de ciertos genes relacionados a la resistencia.

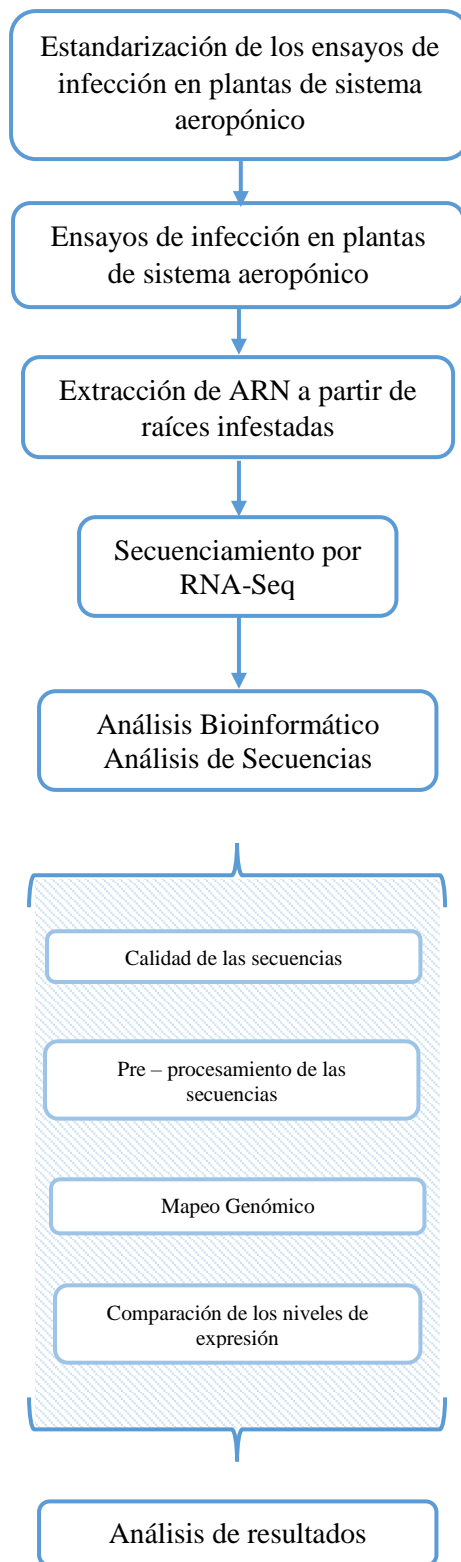
Plántulas de la variedad Chimbina Colorada – *Solanum chaucha* (CIP Number: 700145).

Variedad de papa nativa triploide ($2n=3x=36$) resultado de una hibridación natural entre *Solanum tuberosum* ($2n=4x=48$) y la especie diploide *Solanum stenotomum* ($2n=2x=24$). De acuerdo al Centro Internacional de la papa (CIP), esta variedad ha sido catalogada como susceptible al ataque de *Globodera pallida*. Se cultiva en promedio a 4000 m.s.n.m y se caracteriza por tener un tallo con brotes gruesos, raíces largas y de tubérculos redondos irregulares. Tiene importancia nutricional debido a su gran valor alimenticio a nivel familiar, y a nivel social es destinada al trueque e intercambio de productos. De esta variedad se elabora el chuño y la moraya por congelación y subsecuente deshidratación. (Vilchez et al., 2013.; Chávez., 2004).

3.3. FLUJOGRAMAS DE TRABAJO



Flujograma 1. Preparación del material biológico para la estandarización de los ensayos de infección.



Flujograma 2. Ensayos de infección en plantas de sistema aeropónico, extracción de ARN a partir de raíces y análisis bioinformático.

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. OBTENCIÓN DE QUISTES DE *Globodera pallida*

Los quistes de *Globodera pallida* se obtuvieron de muestras de suelo de zonas infestadas de la región del Cusco (Román., 1999). Una vez reconocido los lugares (campo agrícola donde se cultivó papa), se procedió a recorrer los terrenos en forma de zig-zag y por cada 20 pasos se tomó una sub-muestra de suelo. Luego, se homogenizaron todas las sub-muestras de suelo, para obtener 1kg/ha como muestra.

Se utilizó el Aparato de Fenwick, el cual está constituido por tres series de tamices: los dos primeros (tamiz N°35 mallas/pulgada² y N°80 mallas/pulgada²) se ubican sobre el embudo y el tercer tamiz N°150 mallas/pulgada² al finalizar el collar del aparato (ver Figura 12). Las muestras de suelo (100 g) fueron colocadas en el tamiz N°35 mallas/pulgada² ubicado en la parte superior del aparato. Enseguida, mediante un chorro moderado de agua de caño, se lavó el suelo hasta que la muestra pase a través del segundo tamiz y el embudo. El material de mayor grosor fue retenido en la parte superior del tamiz y las partículas pesadas de suelo sedimentaron en la parte inferior del aparato. Quistes, restos orgánicos y otras partículas que flotaron fueron llevados por el agua hacia el collar del aparato y colectados por el tamiz N°150 mallas/pulgada² (González., 1993).

Los quistes y material orgánico que fueron retenidos en el tamiz de N°150 mallas/pulgada², se concentraron en un solo lado del tamiz y se transfirieron a un Erlenmeyer de 500 cm³ empleando chorros de agua con ayuda de una piceta. Se dejó reposar el agua colectada hasta que los quistes y materia orgánica floten. Algunas partículas de suelo y restos de materia sedimentaron.

El siguiente paso fue decantar la suspensión del Erlenmeyer sobre una tela muselina, la cual funcionó como un tamiz para retener los quistes de *Globodera pallida*. Colectado los quistes, se dejaron secar por 2 a 3 días, para proceder a la selección de quistes mediante estereoscopio Carl Zeiss Stemi™ DV4 (Figura 13.).

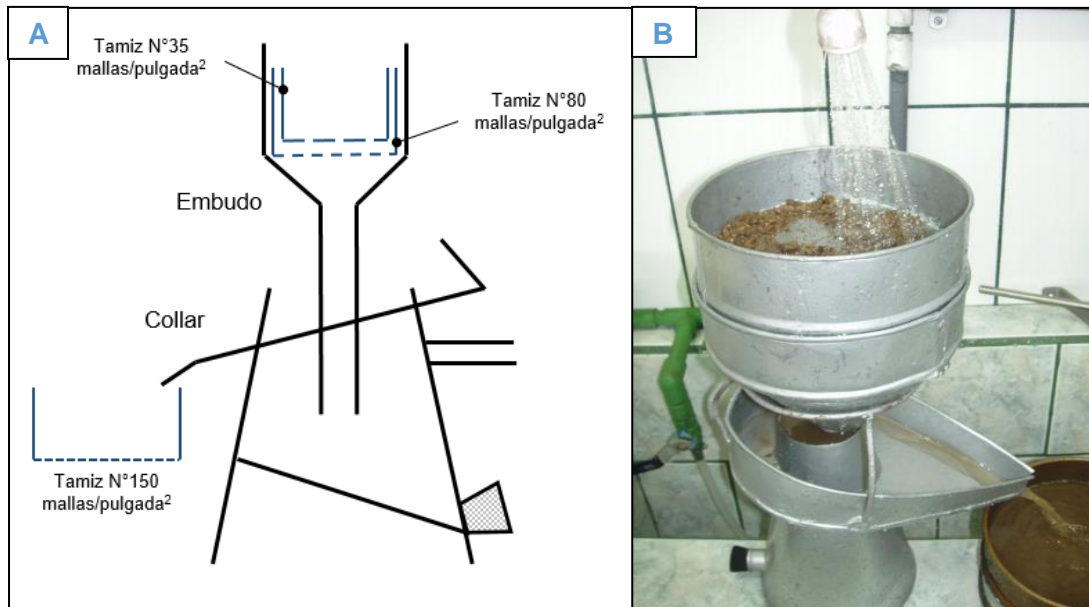


Figura 12. Aparato de Fenwick.(A) Esquema del Aparato de Fenwick. (B) Procedimiento de lavado de muestra de suelo para el aislamiento de quistes de *Globodera pallida*.

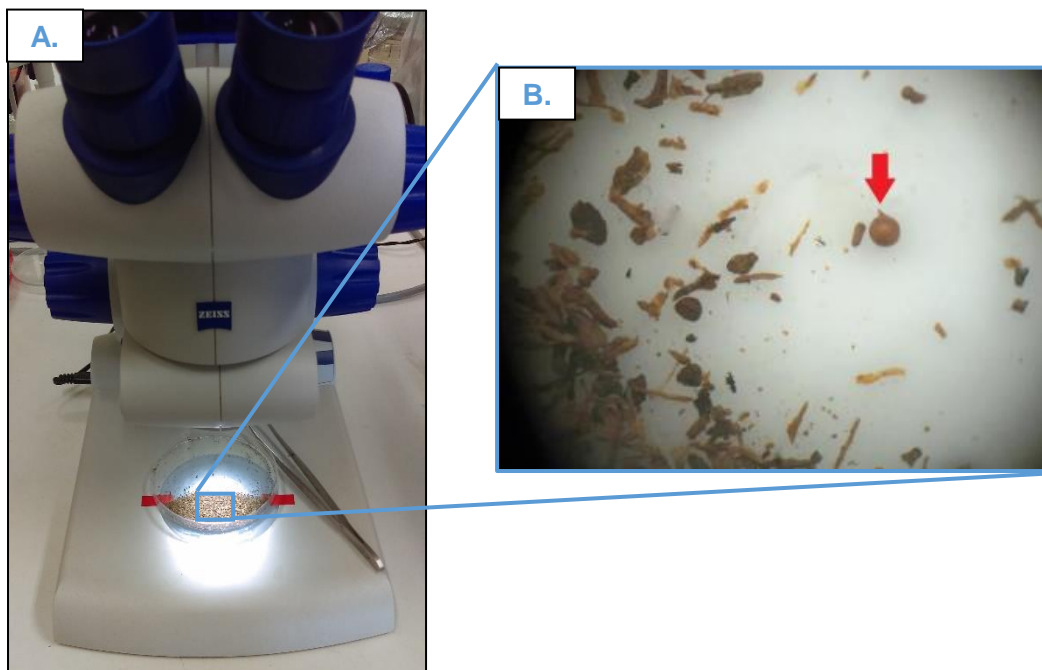


Figura 13. Visualización de quistes de *Globodera pallida* mediante estereoscopio Carl Zeiss Stemi™ DV4. (A) Búsqueda de quistes de *G. pallida* en la muestra final del lavado de suelo por el Aparato de Fenwick. (B) Quiste de *G. pallida* (Aumento 32X).

3.4.2. IDENTIFICACIÓN DEL GÉNERO Y ESPECIE DE *Globodera pallida*

Para confirmar la identidad de la especie de los quistes de *Globodera pallida*, se empleó el método de extracción de ADN utilizando CTAB modificado (bromuro de cetil-trimetil amonio) a partir de quistes de *Globodera pallida*. Los quistes provinieron de muestras de suelo tomadas al azar de un solo campo agrícola donde se cultivó papa; por consiguiente, en la medida que en todas las muestras analizadas se identificó solo *G. pallida*, se asumió que los quistes obtenidos de ese campo correspondían a una sola especie de nemátodo. Para la ejecución de la extracción de ADN se procedió a triturar los quistes para liberar los huevos y/o juveniles que se encontraron en el interior de estos. Esta técnica permitió eliminar los polisacáridos y los compuestos polifenólicos que, de otro modo, alterarían la pureza del ADN y, por tanto, su calidad (Anexo 1).

Al finalizar el proceso de extracción de ADN a partir de quistes de *Globodera pallida*, se determinó las concentraciones de ADN (ng/ul) empleando el biofotómetro (Marca: Eppendorf.). La detección de ADN en las muestras trituradas de quistes, garantizó la presencia de huevos y juveniles en el interior de los mismos. Altas o bajas concentraciones de ADN están en función al número de huevos y juveniles por quiste, como también al dominio del desarrollo de la extracción de ADN.

Una vez obtenido ADN de buena calidad y concentración, se realizó la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para la identificación de especies. Se utilizaron los primers especie específico para la detección y amplificación de la región ITS (espacio intergénico), propuestos por las investigaciones de White et al. 1990 y Bulman et al. 1997, los cuales distinguen las dos especies del género *Globodera sp.* (Ver Tabla 5.). Para el contraste de resultados, se contó con material genético de *G. pallida* y *G. rostochiensis* previamente

identificados por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) y el Centro Internacional de la Papa (CIP), respectivamente.

Nombre del Primer	Secuencia de 5' a 3'	Identificación	Producto de amplificación en pares de bases (pb)	Fuente
ITS5 pITSr3	-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- '-AGCGCAGACATGCCGCAA-	<i>Globodera rostochiensis</i>	434	White T. et al. 1990. Bulman S. et al. 1997
ITS5 pITSp4	-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- '-ACAACAGCAATCGTCGAG-	<i>Globodera Pallida</i>	265	White T. et al. 1990. Bulman S. et al. 1997

Tabla 5. Primers empleados para la identificación de especies del género *Globodera* spp.

Los volúmenes para cada componente, así como las condiciones de reacción, para la PCR fueron estandarizados debidamente.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
Buffer de PCR	5X
Mg 2+	25mM
dNTP	10mM
Primer Forward	10uM
Primer Reverse	10uM
Taq polimerasa	5U/ul

Tabla 6. Componentes de PCR.

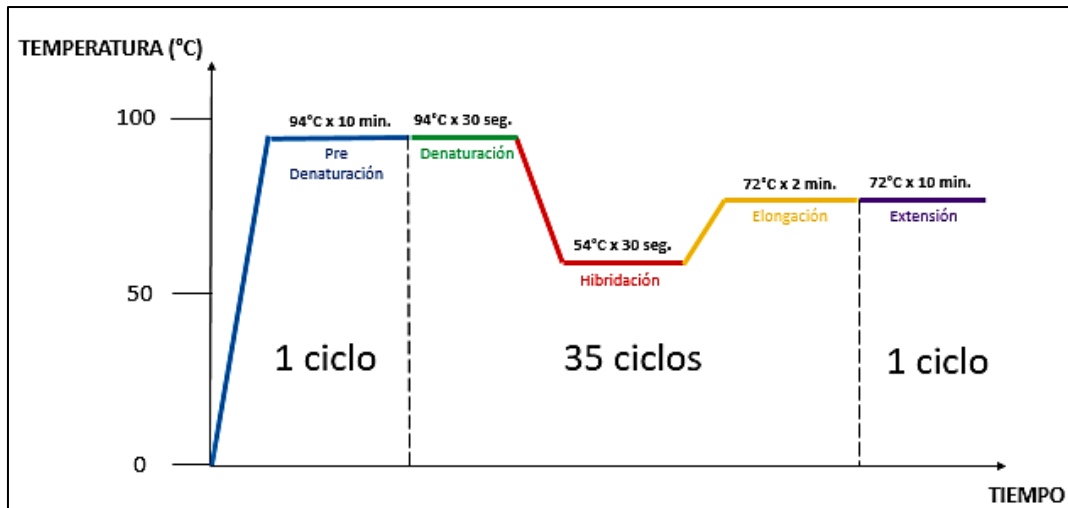


Figura 14. Condiciones de PCR.

La calidad del material genético y los productos de amplificación fueron visualizados mediante la ejecución de corridas electroforéticas a 90V por 40 minutos, en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X.

3.4.3. ESTIMULACIÓN DE QUISTES DE *Globodera pallida*

Para garantizar que el inóculo de Juveniles 2 (J_2) de *Globodera pallida* se encuentre libre de agentes contaminantes, se realizó las desinfecciones de quistes procedentes del proceso de lavado de suelo por el método de Fenwick. Se diseñó un aparato de desinfección modificado de la propuesta de Heungens K. et al 1996 (Ver Figura 15.), que consistió en realizar un corte vertical de una jeringa a 2 cm del pivote, cubriendo dicha zona con tela muselina para retener los quistes al momento de aspirar y expeler las soluciones de lavado y desinfección: Etanol al 90%, Lejía (NaOCl) al 1.3% y agua destilada autoclavada o estéril (Anexo 2).

De forma paralela, se obtuvo exudado radicular de una planta susceptible al nemátodo. Este exudado viene a ser el agua de percolación del resultado de regar dicha planta en maceta. Se regó 2 a 3 veces, con la misma agua, para obtener un exudado radicular concentrado, el cual fue filtrado utilizando papel filtro Whatman N°1 y un filtro Chromafil® Xtra PES-20/25 estéril

de 0.20 μm de tamaño de poro. El exudado radicular se conservó en refrigeración a 4°C (Franco., 1986).

Una vez que se obtuvo quistes desinfectados y exudado radicular concentrado, se diseñó un sistema de estimulación de quistes para la salida de J_2 de los huevos y, por consiguiente, del quiste. Consistió en la utilización de una placa petri que, en su interior, albergó una luna de reloj que contenía una canastilla hecha de tela muselina. Es en esta última, donde se depositaron 20 quistes desinfectados de *G. pallida* y fueron sumergidos en 5 ml de agua destilada estéril en la luna de reloj por 3 días (Ver Figura 16.). Luego de los 3 días, se descartó el agua destilada estéril y se agregó el exudado radicular filtrado sobre la canastilla que contenían los quistes (Ver Figura 17.).

El exudado radicular de una planta susceptible al nemátodo viene a ser el agente estimulador para la eclosión de huevos ubicados en el interior de los quistes. Bajo estas condiciones los J_2 rompen la pared del huevo y emergen de los quistes. (Jiménez., 1999). El J_2 de *G. pallida* es el estadio infectivo que ingresa a nivel de raíz de la planta de papa. Por la naturaleza y estrategia de la investigación, se estimularon los quistes de *G. pallida* para la emergencia de J_2 que se encontraron en estado dormante en el interior de los huevos.

Se realizaron seguimientos y observaciones de la emergencia de J_2 de *G. pallida* cada 3 días, empleando el estereoscopio Carl Zeiss Stemi™ DV4. Al mismo tiempo se colectaron J_2 utilizando una micropipeta de 20 μl de volumen, para que posteriormente sean concentradas en un volumen de 1ml de exudado radicular estéril. Al finalizar cada colecta de J_2 , se renovó el exudado radicular para evitar la presencia de hongos o agentes contaminantes en el sistema.

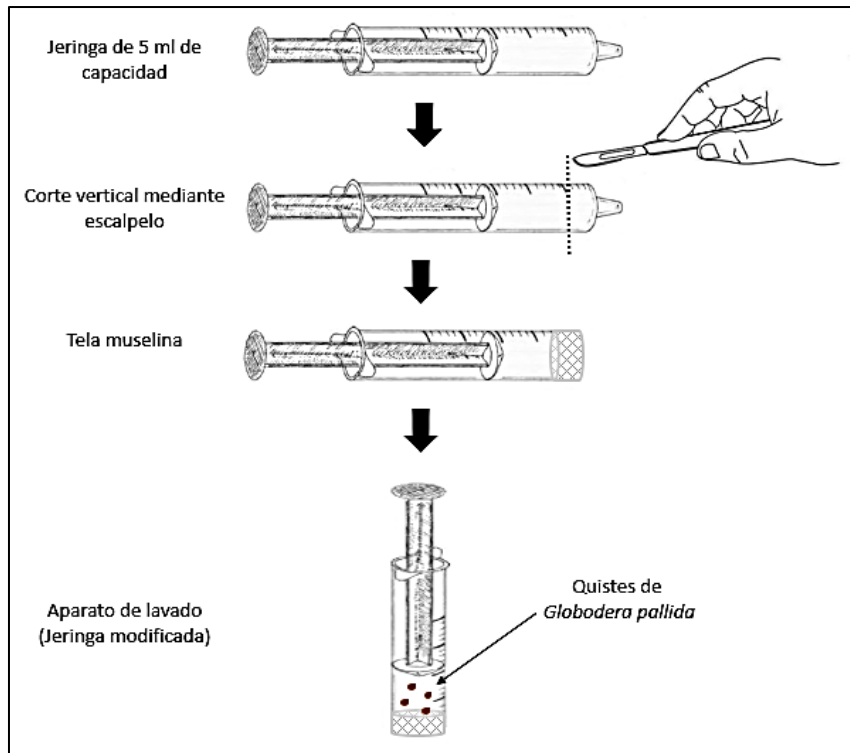


Figura 15. Diseño del aparato de desinfección de quistes de *Globodera pallida*. Se modificó una jeringa de 5 cm muy cerca del pivote, donde se colocó tela muselina que sirvió como soporte de quistes de *G. pallida*. Teniendo 20 quistes en el interior del aparato, se procedió a aspirar y expeler las soluciones de desinfección para obtener quistes libres de cualquier agente contaminante.

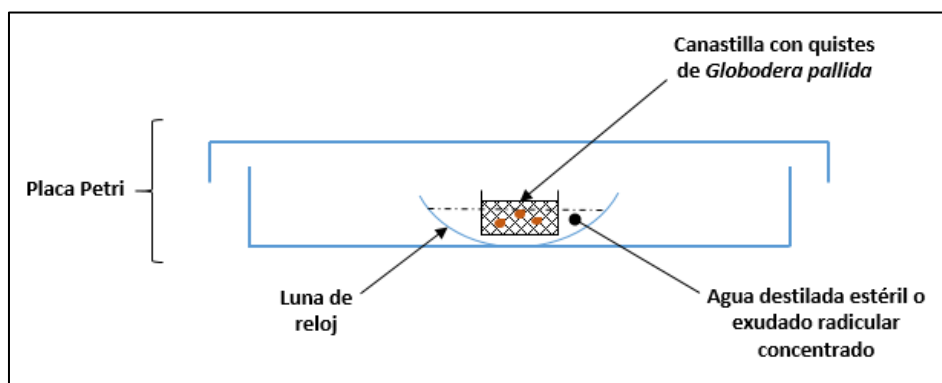


Figura 16. Esquema del sistema de estimulación de quistes de *Globodera pallida*. La placa petri protege de agentes contaminante que pueden alterar el exudado radicular. El contacto entre el agente estimulador (exudado radicular) y los quistes, permite la eclosión de J₂ de los huevos.



Figura 17. Sistema de estimulación de quistes de *Globodera pallida*. (A) y (B). Vista superior y lateral, respectivamente, del sistema de estimulación de quistes de *G. pallida*. (C). J₂ de *G. pallida* después de haber estimulado los quistes con exudado radicular.

3.4.4. ESTANDARIZACIÓN DE LOS ENSAYOS DE INFECCIÓN EN PLANTULAS *in vitro*

Para determinar la cantidad de Juveniles 2 (J₂) adecuada y los tiempos de toma de muestra de raíces pos infección que se usarían en los ensayos de infección, se necesitó propagarlas plántulas proporcionadas por el Centro Internacional de la Papa (CIP) pertenecientes a dos variedades de papa: Variedad mejorada María Huanca (CIP Number: 279142.12) y Variedad nativa Chimbina Colorada (CIP Number: 700145). A partir de estas plántulas se realizaron cultivos *in vitro* utilizando el medio de propagación Murashige & Skoog (Anexo 3.). Las plántulas fueron mantenidas en un cuarto de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo.

Al cabo de 4 semanas de crecimiento en agar Murashige & Skoog, las plántulas fueron desprendidas cuidadosamente del medio de propagación. Las raíces fueron lavadas con agua de caño autoclavada, con el fin de descartar los pedazos de agar que se encontraban fijados a las raíces. Como medio de soporte de las plantas a infectar, se utilizó agar agua al 2% en placas

petri de 150 x 15 mm (Figura 18.). Este medio de soporte brindó facilidades para el desplazamiento de los J₂ de *Globodera pallida*, los cuales ubicaron la raíz y la infectaron. Además, el agar agua al 2% proporcionó humedad garantizando la sobrevivencia de la planta en los ensayos de infección que a continuación se detalla.

Para comenzar los ensayos de infección, se determinaron puntos de inoculación ubicados en la zona de elongación de las raíces de las plantas, lugar preferido de los J₂ de *G. pallida* para penetrar e infectar (Figura 21B.). Haciendo uso de una micropipeta de 20 ul, se colectaron inóculos de 20 J₂ del volumen concentrado de exudado radicular obtenido del sistema de estimulación de quistes (Ver Figura 16.) A continuación, se colocaron 20 J₂ por cada punto de inoculación. Se realizó el seguimiento de las infecciones en 2 tiempos: 24 horas y 72 horas pos infección, siendo este último exitoso al encontrar diferencias en el número de J₂ que penetraron las raíces entre la variedad María Huanca (resistente a *G. pallida*) y Chimbina Colorada (susceptible a *G. pallida*).

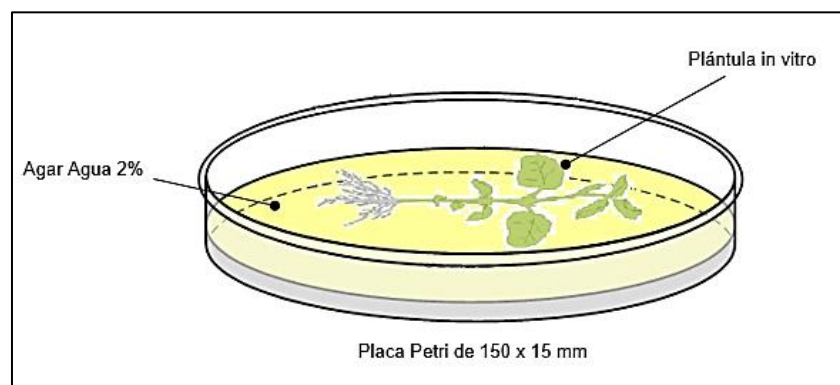


Figura 18. Ubicación de la planta in vitro sobre el agar agua al 2%

3.4.5. COLORACIÓN DE NEMATODOS EN RAÍCES CON FUCSINA ÁCIDA

Para contabilizar el número de J₂ de *Globodera pallida*, se realizó el proceso de coloración de nematodos en raíces infectadas por juveniles. Este protocolo fue proporcionado por la Unidad de Résistance des Plantes aux Bioagresseurs (RPB), IRD, Montpellier, a través de una

comunicación personal con el investigador Luc Villain. Las raíces fueron procesadas por un pre tratamiento de lavado con NaOCl 2.1% y agua. Finalizado esta etapa, se sumergieron las raíces en una solución de fucsina ácida (hervida) por un minuto. A continuación, el proceso de decoloración consistió en colocar las raíces en una solución equivolúmica (1:1:1) de ácido láctico, ácido acético y agua durante 45 minutos a una temperatura de 45°C. Finalmente las raíces se secaron a temperatura ambiente para su respectiva observación al microscopio. La metodología permite que el tejido de la planta pierda su color (translúcido) dejando claramente visibles los nematodos coloreados (Anexo 4.).

3.4.6. CULTIVO DE PLANTAS EN SISTEMA AEROPÓNICO

El sistema aeropónico proporciona, por aspersion, microgotas de solución nutritiva conteniendo aproximadamente entre 5 – 10 mg/L de oxígeno disuelto, generando que una buena oxigenación a las raíces que se encuentran suspendidos en el sistema (Figura 19.). Además, la presencia de una solución nutritiva (Anexo 5.) garantiza el desarrollo óptimo del cultivo, estimulando su crecimiento. Este sistema tiene como propósito en el presente trabajo generar el crecimiento sostenible, y en abundancia, del sistema radicular de las plántulas. Por otro lado, los materiales que soportan al cultivo permiten que las plantas estén aisladas de cualquier enfermedad o agentes patogénicos.

Para el crecimiento de las plántulas en el sistema aeropónico, se empleó plántulas de María Huanca y Chimbina Colorada propagadas y cultivadas *in vitro* durante 4 semanas. Finalizado el periodo de crecimiento en cuarto de cultivo, las plántulas fueron sumergidas en agua durante una semana, para que posteriormente sean instaladas en sistema aeropónico. El tiempo de crecimiento de las plántulas en el sistema aeropónico fue de 3 semanas.

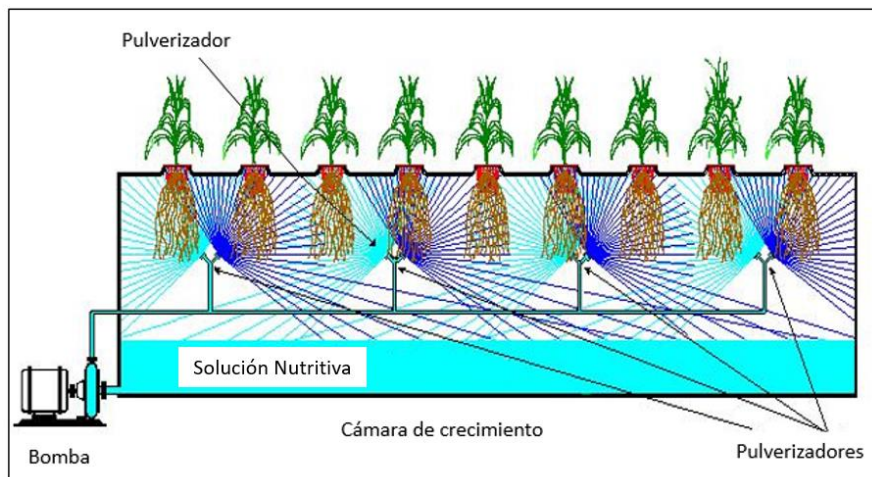


Figura 19. Sistema Aeropónico. Las raíces se encuentran suspendidas sin su sustrato habitual (suelo). Las plantas son regadas mediante una solución nutritiva el cual es suministrada mediante aspersores. El sistema garantiza un crecimiento sostenible de las plantas con abundante raíz.

3.4.7. ENSAYOS DE INFECCIÓN EN PLANTAS DE SISTEMA AEROPÓNICO

En base a los resultados de la estandarización de los ensayos de infección en plántulas *in vitro*, se ejecutó los ensayos de infección en plantas de sistema aeropónico de 3 semanas de crecimiento de las variedades María Huanca y Chimbina Colorada. Para cada variedad de papa, se elaboró un diseño experimental (Anexo 7.) de 10 plantas (unidades experimentales) donde cada una de ellas se encontraba sobre un medio de soporte (agar agua al 2%) en placas petri de 150 x 50 mm (Ver Figura 21A.). De estas 10 plantas, 5 fueron utilizadas para el tratamiento control (sin inoculación de J₂ de *Globodera pallida*) y las otras 5 para el tratamiento de infección (inoculación con J₂ de *G. pallida*). De esta manera, las 5 repeticiones de cada tratamiento fueron empleados 3 para la extracción de ARN y su posterior secuenciamiento y las 2 repeticiones restantes fueron destinadas para las coloraciones de nematodos en raíces con fucsina ácida, tal como se indicó en el punto 3.4.5 de la sección de Materiales y Métodos.

En cada unidad experimental (planta) del tratamiento de infección, se determinó 5 puntos de inoculación a nivel de la zona de elongación de la raíz. Con la ayuda de una micropipeta de 20 ul, se inocularon 20 J₂ de *G. pallida* en cada punto de inoculación. Mientras que las plantas del

tratamiento control fueron inoculadas con agua para mantener las mismas condiciones experimentales. Después de 72 horas pos inoculación, se colectaron muestras de raíces tanto del tratamiento control e infección. Todas estas actividades desarrolladas demostraron que las condiciones estandarizadas con plántulas *in vitro* funcionaron en plantas de cultivo aeropónico de 3 semanas de crecimiento. En total, contando ambos tratamientos de ambas variedades, se colectaron 12 muestras de raíces destinadas para el secuenciamiento por RNA-Seq, los cuales fueron conservados en nitrógeno líquido para evitar la degradación de ARN. Así también se colectaron en total 8 muestras de raíces, para la coloración de nematodos en raíces con fucsina ácida, para constatar, contabilizar y comparar el número de J₂ que ingresaron a nivel de raíz en las dos variedades de papa.











FIN	EXTRACCIÓN DE ARN			COLORACIÓN DE NEMÁTODOS	
REPETICIONES	I	II	III	I	II
TRATAMIENTOS					
CONTROL					
INFECCIÓN					

Figura 20. Diseño Experimental. Consistió en dos tratamientos: Control e infección. Las repeticiones fueron divididas de acuerdo al fin o destino de las muestras de raíces colectadas: 3 repeticiones correspondientes a la extracción de ARN y 2 repeticiones a la coloración de nematodos.

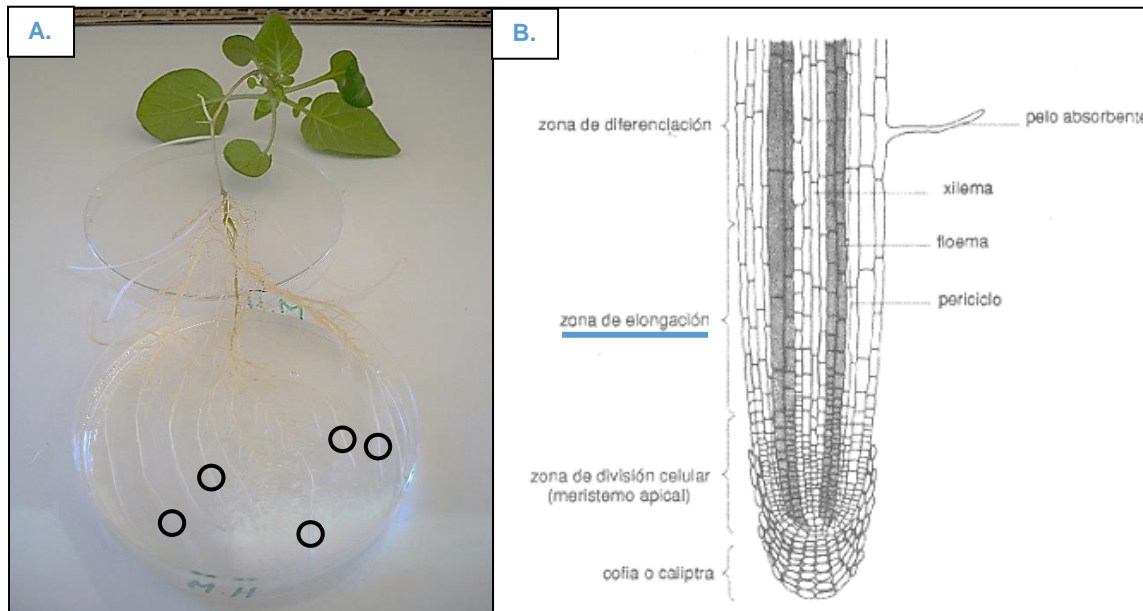


Figura 21. Puntos de inoculación en una planta de sistema aeropónico (Unidad Experimental). (A) Los círculos señalados pertenecen a las zonas de elongación de cada raíz, (B) donde las células contienen mayor cantidad de citoplasma para la ejecución de la diferenciación y especialización celular. Lugar donde los *J2* de *G. pallida* ingresan a nivel de raíz.

3.4.8. EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE RAICES

El protocolo de extracción de ARN total (Anexo 6.) comenzó con la trituración de aproximadamente 1-2g de raíz, utilizando nitrógeno líquido. Enseguida se empleó tri@Reagent (Sigma)(1ml/100g de tejido) y cloroformo (200ul/1ml de Tri@Reagent agregado) para así continuar con las series de centrifugación bajo cadena de frío (4°C) para evitar la degradación del ARN. Para la precipitación del pellet se utilizó isopropanol y para el lavado Etanol al 75%.

Para la determinación de la calidad de las muestras, se realizaron corridas en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X. Una vez que las muestras presentaron una calidad y cantidad óptima de ARN total, éstas fueron tratadas con DNA-free™ Kit (Ambion, USA), para garantizar que se encuentren libre de ADN.

3.4.9. SECUENCIAMIENTO POR RNA-Seq

El control de respuesta por parte de la planta frente a un estrés abiótico o biótico, está dado por la actividad transcripcional de activación o represión de genes (Proudfoot et al., 2002). A este conjunto de transcritos que provienen de genes que se expresan en una célula en un momento o condición fisiológica determinada se denomina transcriptoma. En el presente trabajo, el ARN total obtenido de las raíces infectadas, comprende el transcriptoma expresado en la interacción planta – nemátodo. La estrategia de conocer el transcriptoma y su regulación, permite determinar la red de respuesta génica que realizan las variedades de papa en los procesos de infección con juveniles 2 del nemátodo. Para determinar esta red de respuesta génica empleamos una de las nuevas tecnologías de secuenciamiento masivo del transcriptoma (RNA-Seq; ver Figura 22.), con el fin de identificar y cuantificar transcritos relacionados a la defensa, basado en los perfiles de expresión génica durante la interacción planta – nemátodo.

Es así que las muestras de ARN total libres de ADN, fueron enviadas a la empresa Clinical Microarray Core (Los Ángeles, Estados Unidos) para su secuenciamiento, donde se encargaron de verificar la calidad de las muestras, de la construcción de las bibliotecas y del secuenciamiento del transcriptoma por RNA-Seq.

Para el secuenciamiento por RNA-Seq primero es necesario convertir el ARN total en una biblioteca de ADNc para lo cual se purifican los ARNm que tienen la cola poli-A usando perlas magnéticas unidas a oligos poli-T. Posterior a ello se realizan fragmentaciones (mediante cationes divalentes y temperaturas elevadas), y usando transcriptasa reversa los ARN fragmentados son convertidos a ADNc. Por último, la DNA polimerasa se encarga de la síntesis de la segunda hebra de ADNc (Illumina, Cat # RS-930-100., 2009).

Los ADNc pasan por un proceso de reparación de los extremos, utilizando la ADN polimerasa T4 y la ADN polimerasa Klenow para convertir los extremos sobrantes en extremos romos.

Después, se adiciona una simple base de Adenina y la ligación de los adaptadores. Estos productos son purificados y enriquecidos mediante PCR para crear una biblioteca de ADNc (Illumina, Cat # RS-930-100., 2009).

A continuación, los extremos de los fragmentos de ADNc se ligan complementariamente a oligonucleótidos adheridos a una superficie sólida. Estos oligonucleótidos crean puentes que favorecen la amplificación (Illumina, Cat # RS-930-100., 2009). Los amplicones permanecerán adheridos y luego de una denaturación formarán otro puente para permitir la amplificación. Estos pasos se repiten hasta generar millones de grupos o clusters de un fragmento determinado. Una vez formados estos grupos se desnaturalizarán nuevamente para iniciar la polimerización o síntesis de cada fragmento, y se introduce esta vez en la mezcla de síntesis cuatro nucleótidos marcados 3'-O -azidometil o terminadores reversibles. (Sedano J. et al. 2012)

Los fluoróforos de los terminadores reversibles integrados a la cadena naciente son activados por un láser. La emisión de luz será diferencial de acuerdo con el nucleótido incorporado. La información será registrada y almacenada en una computadora conectada al secuenciador. (Sedano J. et al. 2012).

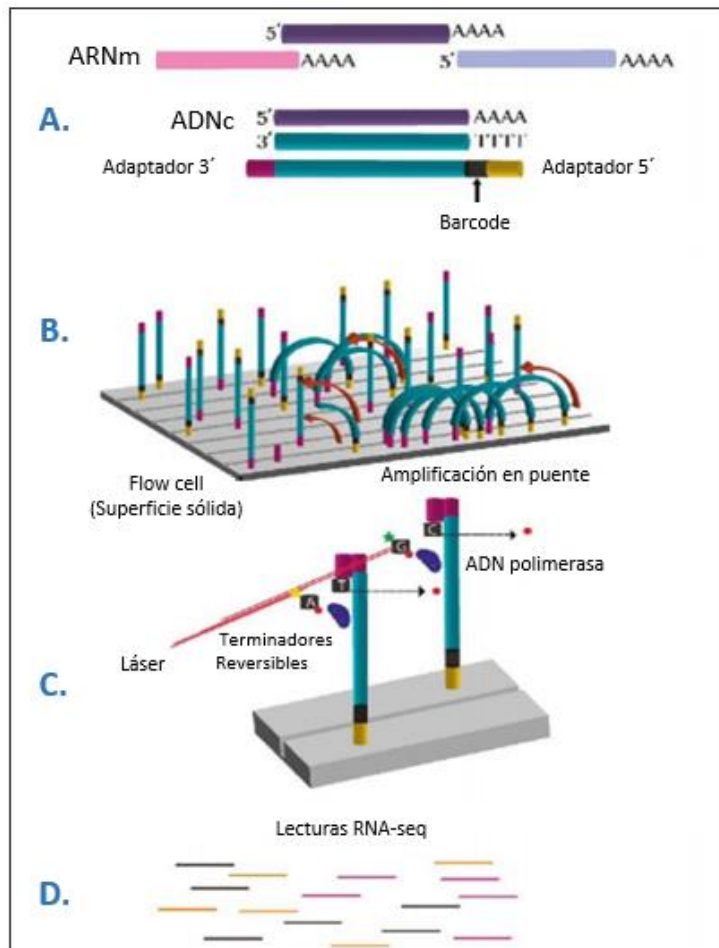


Figura 22. Secuenciamiento por RNA-Seq empleando la tecnología NGS Illumina. (A) Una vez que los ARN fragmentados son convertidos a ADNc por la transcriptasa reversa, se realiza la ligación de adaptadores. (B) Estos adaptadores se ligan o se hibridan complementariamente a oligonucleótidos que se encuentran adheridos a una superficie sólida (Flow cell), lugar donde se desarrollará la amplificación en puente. (C) Se generan clusters en la placa y en cada una de ellas se adiciona 4 nucleótidos o terminadores reversibles, los cuales poseen fluoróforos que son activados por un láser. La emisión de luz será diferencial de acuerdo con el nucleótido incorporado. (D) Cada superficie sólida o Flow cell tiene un rendimiento de 150 millones de lectura o reads. La longitud de cada lectura se encuentra entre un rango de 50-100 nucleótidos. **Fuente:** Sedano J. et al. 2012)

3.4.10 ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Los siguientes programas bioinformáticos fueron ordenados en un orden lógico, generando un pipeline para el análisis de datos provenientes del secuenciamiento por RNA-Seq.

A. Calidad de las secuencias:

Para generar conclusiones biológicas basadas en el reporte del secuenciamiento por RNA-Seq, es necesario, primero, realizar un control de calidad de la misma. Las lecturas resultantes del secuenciamiento se encuentran en archivos con formato **.fastq*, donde se considera el nombre,

la calidad y la secuencia de cada lectura. El conjunto de lecturas presentes en una muestra colectada se considera como una biblioteca.

La calidad de cada base nucleotídica se rige bajo un puntaje de calidad denominado Phred, que viene a ser la probabilidad de que una base sea incorrecta. Estos valores son interpretados por el programa bioinformático FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), generando gráficos y ventanas interactivas, para una mejor visualización de las calidades de las bibliotecas originadas del secuenciamiento.

Para el presente trabajo de investigación, se consideraron bases nucleotídicas fiables a las bases con valor de calidad $Q \geq 28$. Este criterio se basa en el límite propuesto por el programa FastQC para las bases nucleotídicas de buena calidad, ubicados entre $Q=28$ y $Q=40$ en el eje Y del gráfico resultado del análisis del programa. Este valor numérico respalda la adecuada ejecución de la extracción de ARN y el secuenciamiento por RNA-Seq.

Línea de comando: `$ fastqc [input.fq]`

B. Pre-procesamiento de las secuencias

Consistió en la eliminación de las secuencias de los adaptadores que se ligaron a los ARN antes de secuenciamiento. Para eliminar los adaptadores se empleó el programa Fast_X (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). También se eliminaron las secuencias que poseían baja calidad y se removieron los primers utilizados en el secuenciamiento RNA-Seq.

Líneas de comando:

```
$ fastx_trimmer -Q33 -v -f 3 -l 50 -i S2.fq -o S2out.fq
$ fastx_trimmer -Q33 -v -f 3 -l 50 -i S3.fq -o S3out.fq
$ fastx_trimmer -Q33 -v -f 3 -l 50 -i S4.fq -o S4out.fq
$ fastx_trimmer -Q33 -v -f 3 -l 50 -i S5.fq -o S5out.fq
$ fastx_trimmer -Q33 -v -f 3 -l 50 -i S6.fq -o S6out.fq
$ fastx_trimmer -Q33 -v -f 3 -l 50 -i R1.fq -o R1out.fq
$ fastx_trimmer -Q33 -v -f 3 -l 50 -i R2.fq -o R2out.fq
$ fastx_trimmer -Q33 -v -f 3 -l 50 -i R3.fq -o R3out.fq
$ fastx_trimmer -Q33 -v -f 3 -l 50 -i R4.fq -o R4out.fq
$ fastx_trimmer -Q33 -v -f 3 -l 50 -i R5.fq -o R5out.fq
$ fastx_trimmer -Q33 -v -f 3 -l 50 -i R6.fq -o R6out.fq
```

C. Mapeo genómico.

Para el mapeo genómico se empleó la última versión de las secuencias ensambladas del genoma de la papa, datos generados por Potato Genome Sequencing Consortium (PGSC). Previamente se ejecutó el programa Bowtie2 (Langmead et al., 2009) para generar archivos índices que aceleraron el alineamiento de las secuencias con el genoma de referencia. Así, las lecturas fueron mapeadas a este genoma de referencia (genome.fa), empleando el programa TopHat (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>). El programa, además, funcionó como filtro para descartar las secuencias ajenas al genoma, permitiéndonos concluir que las secuencias mapeadas constituían el total de secuencias expresadas por los tejidos de las raíces de papa.

Línea de comando Bowtie2:

```
$ bowtie2 - build genome.fa genoma
```

Líneas de comando TopHat para cada biblioteca:

```
$ tophat2 -p 8 -i 10 -I 15000 -o R1maptopout ../DATABASE/genome ../fastx_trimmer/R1out.fq
$ tophat2 -p 8 -i 10 -I 15000 -o R2maptopout ../DATABASE/genome ../fastx_trimmer/R2out.fq
$ tophat2 -p 8 -i 10 -I 15000 -o R3maptopout ../DATABASE/genome ../fastx_trimmer/R3out.fq
$ tophat2 -p 8 -i 10 -I 15000 -o R4maptopout ../DATABASE/genome ../fastx_trimmer/R4out.fq
$ tophat2 -p 8 -i 10 -I 15000 -o R5maptopout ../DATABASE/genome ../fastx_trimmer/R5out.fq
$ tophat2 -p 8 -i 10 -I 15000 -o R6maptopout ../DATABASE/genome ../fastx_trimmer/R6out.fq
$ tophat2 -p 8 -i 10 -I 15000 -o S1maptopout ../DATABASE/genome ../fastx_trimmer/S1out.fq
$ tophat2 -p 8 -i 10 -I 15000 -o S2maptopout ../DATABASE/genome ../fastx_trimmer/S2out.fq
$ tophat2 -p 8 -i 10 -I 15000 -o S3maptopout ../DATABASE/genome ../fastx_trimmer/S3out.fq
$ tophat2 -p 8 -i 10 -I 15000 -o S4maptopout ../DATABASE/genome ../fastx_trimmer/S4out.fq
$ tophat2 -p 8 -i 10 -I 15000 -o S5maptopout ../DATABASE/genome ../fastx_trimmer/S5out.fq
$ tophat2 -p 8 -i 10 -I 15000 -o S6maptopout ../DATABASE/genome ../fastx_trimmer/S6out.fq
```

Como resultado, Tophat crea archivos de alineamiento en formato **.bam* (accepted_hits.bam) para cada biblioteca.

D. Comparación de los niveles de expresión.

Cufflinks (Trapnell et al., 2010) ensambla los genes que se están expresando diferencialmente. Determina los niveles normalizados de expresión génica, como lecturas por kilobase de exón por millón de fragmentos mapeados (RPKM, reads per kilobase per million mapped read, por sus siglas en inglés). Para la ejecución de la línea de comando, se necesitó los archivos `accepted_hits.bam` (procedentes del análisis por TopHat) de cada biblioteca.

Así también, se necesitó la secuencia del genoma de la papa (`genome.fa`) como referencia para el ensamblaje de lecturas, además del archivo de anotación del genoma de la papa (formato: `.gff`), que describe la posición y/o ubicación de las secuencias de los genes dentro del genoma de referencia.

Línea de comando para cada biblioteca:

```
$ cufflinks -o R1cufflink -p 8 -g ../DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff -u -
b ../DATABASE/genome.fa ../tophat_out/R1maptopout/accepted_hits.bam
$ cufflinks -o R2cufflink -p 8 -g ../DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff -u -
b ../DATABASE/genome.fa ../tophat_out/R2maptopout/accepted_hits.bam
$ cufflinks -o R3cufflink -p 8 -g ../DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff -u -
b ../DATABASE/genome.fa ../tophat_out/R3maptopout/accepted_hits.bam
$ cufflinks -o R4cufflink -p 8 -g ../DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff -u -
b ../DATABASE/genome.fa ../tophat_out/R4maptopout/accepted_hits.bam$
$ cufflinks -o R5cufflink -p 8 -g ../DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff -u -
b ../DATABASE/genome.fa ../tophat_out/R5maptopout/accepted_hits.bam
$ cufflinks -o R6cufflink -p 8 -g ../DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff -u -
b ../DATABASE/genome.fa ../tophat_out/R6maptopout/accepted_hits.bam
$ cufflinks -o S1cufflink -p 8 -g ../DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff -u -
b ../DATABASE/genome.fa ../tophat_out/S1maptopout/accepted_hits.bam
$ cufflinks -o S2cufflink -p 8 -g ../DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff -u -
b ../DATABASE/genome.fa ../tophat_out/S2maptopout/accepted_hits.bam
$ cufflinks -o S3cufflink -p 8 -g ../DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff -u -
b ../DATABASE/genome.fa ../tophat_out/S3maptopout/accepted_hits.bam
$ cufflinks -o S4cufflink -p 8 -g ../DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff -u -
b ../DATABASE/genome.fa ../tophat_out/S4maptopout/accepted_hits.bam
$ cufflinks -o S5cufflink -p 8 -g ../DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff -u -
b ../DATABASE/genome.fa ../tophat_out/S5maptopout/accepted_hits.bam
$ cufflinks -o S6cufflink -p 8 -g ../DATABASE/PGSC_DM_V403_genes.gff -u -
b ../DATABASE/genome.fa ../tophat_out/S6maptopout/accepted_hits.bam
```

Cuffmerge es el siguiente programa que ensambla los transcritos generados de cada biblioteca, en un transcriptoma unificado. La carpeta generada del análisis por Cufflinks, contiene 4 archivos: `genes.fpk_tracking`, `isoforms.fpk_tracking`, `skipped.gtf` y `transcripts.gtf`. Se agruparon todos los archivos `transcripts.gtf`, de cada librería, en un archivo de formato `.txt` (`listaGTF.txt`), para ejecutar el programa Cuffmerge.

Línea de comando

```
$ cuffmerge -o GTFmerge -p 8 [listaGTF.txt] -g PGSC_DM_V403_genes.gff
```

Cuffdiff es el encargado de cuantificar y comparar los niveles de expresión de los genes entre los tratamientos. Determina qué genes se encontraron sobre expresados o reprimidos al comparar los tratamientos control y de infección por juveniles 2 de *Globodera pallida*, en las dos variedades de papa María Huanca y Chimbina Colorada.

Para la ejecución de la línea de comando, se requirió el archivo.gtf denominado merged.gtf que es el ensamblado de todos los transcritos. Este archivo es el producto del análisis de Cuffmerge. El genoma de referencia y los archivos accepted_hits.bam también son incluidos en la línea de comando. Entonces, se tiene:

Línea de comando para las muestras obtenidas de la variedad María Huanca:

```
$ cuffdiff -p 5 -b ../DATABASE/genome.fa -u -o RESDIFF ../cufflinks/GTFmerge/merged.gtf ../tophat_out/R1maptopout/accepted_hits.bam,../tophat_out/R2maptopout/accepted_hits.bam,../tophat_out/R3maptopout/accepted_hits.bam,../tophat_out/R4maptopout/accepted_hits.bam,../tophat_out/R5maptopout/accepted_hits.bam,../tophat_out/R6maptopout/accepted_hits.bam
```

Línea de comando para las muestras obtenidas de la variedad Chimbina Colorada:

```
$ cuffdiff -p 5 -b ../DATABASE/genome.fa -u -o SUSDIFF ../cufflinks/GTFmerge/merged.gtf ../tophat_out/S1maptopout/accepted_hits.bam,../tophat_out/S2maptopout/accepted_hits.bam,../tophat_out/S3maptopout/accepted_hits.bam,../tophat_out/S4maptopout/accepted_hits.bam,../tophat_out/S5maptopout/accepted_hits.bam,../tophat_out/S6maptopout/accepted_hits.bam
```

3.4.11 ANÁLISIS DE DATOS

- Análisis estadístico de resistencia y susceptibilidad de las plantas de papa frente a J₂ de *Globodera pallida*.

Se ejecutó la Prueba de Normalidad de Shapiro - Wilk para los datos numéricos del conteo de J₂ *G. pallida* encontrados en las raíces de los tratamientos post – infección a las 24 horas y 72 horas para cada variedad de papa. Debido a que los datos no seguían una distribución normal,

se realizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para determinar diferencias significativas entre tratamientos post - infección de 24 horas y 72 horas de las variedades María Huanca y Chimbina Colorada, comparando la cantidad de J₂ encontrados en cada tratamiento.

- Análisis de expresión de genes regulados diferencialmente en respuesta a *Globodera pallida* a nivel de raíces.

Para el análisis se determinó criterios de inclusión que fueron aplicados en la lista general de genes expresados procedentes del análisis de secuencias. De esta manera se estableció un grupo selecto de genes que fueron regulados a nivel de su expresión, basados en los criterios de:

- pValue < 0.05: Genes que sufrieron cambios a nivel de su expresión de manera significativa.
- Fold Change: Cambio de expresión de un gen entre dos condiciones experimentales (tratamiento control y post - infección). Patrones a evaluar: Sobreexpresión (Fold change ≥ 2) e represión (Fold change ≤ -2).
- Comportamiento opuesto de expresión de genes (sobre expresión y represión o viceversa) en las variedades resistente y susceptible.

IV. RESULTADOS

4.1. Evaluación del grado de infección de Juveniles 2 (J₂) de *Globodera pallida*

a) Identificación de quistes de *G. pallida*.

Ejecutado la extracción de ADN a partir de quistes del nemátodo, se obtuvo concentraciones óptimas de material genético caracterizadas por la adecuada cantidad y calidad de ADN. Los valores de absorbancia A260/280 corroboran la pureza de las muestras libres de contaminación (Tabla 7.).

MUESTRA	Concentración [ng/ul]	A 260 /280
A1	189.08	1.77
A2	18.90	1.77
A3	18.90	1.77
B1	12.43	0.89
B2	17.40	1.71
B3	170.00	1.50
B4	169.00	1.70
B5	70.00	1.77
B6	69.00	1.70

Tabla 7. Concentraciones de ADN a partir de quistes de *Globodera sp.* Muestras A1 – A3, pertenecen a los quistes control identificados como *G. rostochiensis*. Muestras B1 – B5, pertenecen a los quistes procedentes del departamento de Cusco. Muestra B6: pertenece a los quistes control identificados como *G. pallida*.

Se corroboró la identidad de los quistes mediante la amplificación de las regiones ITS, utilizando los primers propuestos por White et al., (1990) y Bulman et al., (1997). Se evidenció y ratificó que los quistes originarios de la región de Cusco pertenecieron a la especie *Globodera pallida*. Los productos de la amplificación para la identificación de *G. rostochiensis* y *G. pallida* (434 bp y 265 bp, respectivamente) fueron visualizados después de realizar la corrida electroforética en gel de agarosa al 1% a 90 voltios por 50 minutos (Figura 23.).

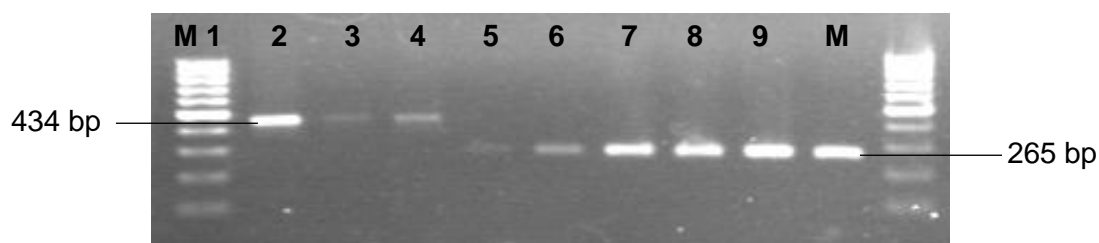


Figura 23. Productos de amplificación de las regiones ITS de las especies *Globodera rostochiensis* y *Globodera pallida*. Gel de agarosa, dónde: M: Marcador 100bp. Carriles del 1 – 3 pertenecen a las muestras control (A1 - A3) para *G. rostochiensis*. Carriles del 4 – 8 corresponden a las muestras B1 – B5 procedentes del departamento del Cusco, identificados como *Globodera pallida*. Carril 9 corresponde a la muestra control para *G. pallida*.

b) Estandarización de los ensayos de infección.

Se realizó la estandarización de: el medio de soporte donde se colocó las plántulas de sistema aerónico, la dosis comprendida por la cantidad de J₂ de *G. pallida* y los tiempos post – inoculación para la evaluación del grado de infección en las variedades de papa mencionadas. Con respecto al medio de soporte, se realizaron pruebas en 3 medios: placas petri de 150 x 15 mm sin agar, con papel toalla humedecida y con agar agua al 2%. Los dos primeros medios no fueron adecuados, debido a que en el primero se observó la evaporación del inóculo de nemátodos, y en el segundo el inóculo fue absorbido por el papel toalla a pesar de estar saturado de agua. Sin embargo, las placas petri que contenían agar agua al 2% ofrecieron un ambiente adecuado para evitar la evaporación del inóculo de J₂ de *G. pallida* y el desplazamiento de los J₂ a través del medio asegurando la infección de raíces. Debido a estas características que ofreció el medio agar agua al 2%, se decidió utilizar este medio para los ensayos de infección.

La dosis de J₂ fue estandarizado de acuerdo a la disponibilidad, en número, de individuos encontrados en el sistema de estimulación de quistes de *G. pallida* (ver Figura 15 y 16.). Se realizaron pruebas utilizando inóculos de 5 J₂ hasta 20 J₂, siendo este último el adecuado, por la homogeneidad en número de J₂ que infectaron en raíz de planta susceptible. Las evaluaciones post – inoculación fue el último aspecto a estandarizar, donde se evaluaron 2 tiempos: 24 horas y 72 horas post – inoculación. (ver Figura 24.).

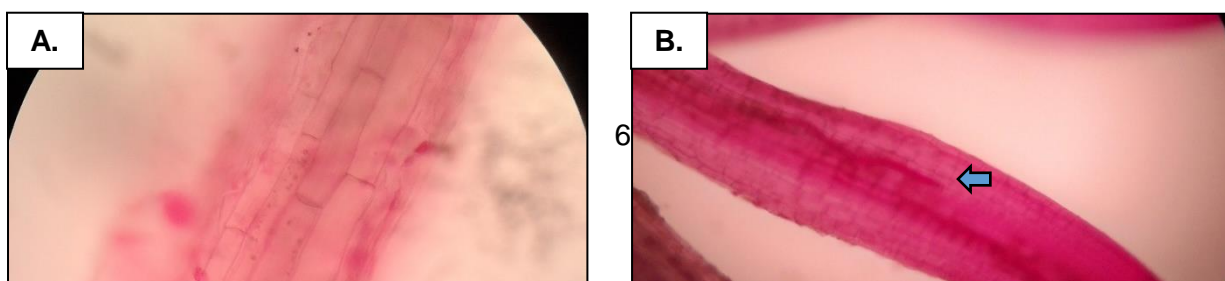


Figura 24. Raíces infectadas coloreadas con fucsina ácida para la identificación de Juveniles 2 (J2) de *Globodera pallida* (campo visual 400X). A. Raíz del tratamiento control (sin infección). B. Raíz infectada por J2 de *G. pallida* del tratamiento a las 24 horas pos inoculación. C. y D: Raíces infectadas por J2 de *G. pallida* del tratamiento a las 72 horas pos inoculación.

c) Resultados de resistencia y susceptibilidad de las plantas de papa frente a J2 de *Globodera pallida*.

Como resultado de los ensayos de infección en plantas de sistema aeropónico, de acuerdo al diseño experimental de la Figura 20., se obtuvo la siguiente tabla con el conteo de J₂ por cada punto de inoculación:

Variedades de papa	Tratamientos	Repeticiones	Conteo de J2 en raíz por punto de inoculación					Valor de la mediana de J ₂ por tratamiento
Chimbina Colorada	24 Horas pi.	I	0	6	2	2	2	2
		II	2	2	3	5	2	2
	72 Horas pi.	I	5	5	1	7	2	5
		II	10	5	4	5	4	5
María	24 Horas pi.	I	3	1	7	0	4	3

Huanca		II	3	8	0	0	4	3
	72 Horas pi.	I	1	4	1	0	0	1
		II	1	6	2	0	0	1

Tabla 8. Conteo de juveniles 2 de *Globodera pallida* en raíces infectadas en los tratamientos a las 24 horas y 72 horas post - inoculación (pi).

La cantidad de J₂ encontrados a nivel de raíces en las variedades resistentes y susceptibles fueron homogéneos a las 24 horas post – inoculación (Tabla 8. y Figura 25.), caso contrario sucedió en la evaluación de infección a las 72 horas, donde la cantidad de J₂ encontrados en las raíces se diferenciaron entre las variedades resistente y susceptible (Tabla 8. y Figura 26.).Se confirmó que la variedad María Huanca fue resistente y la variedad Chimbina Colorada fue susceptible a J₂ de *G. pallida*, respectivamente.

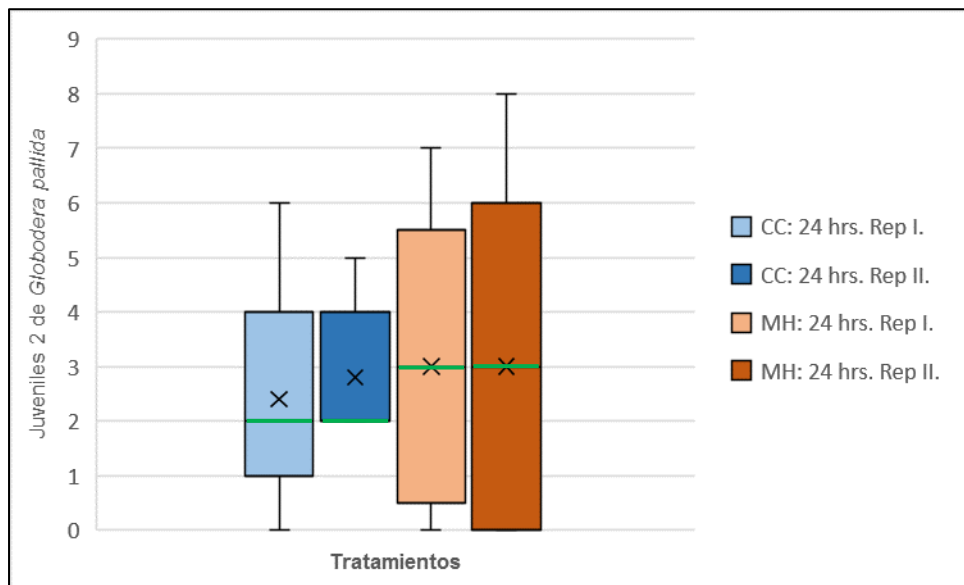


Figura 25. Ingreso de J₂ de *G. pallida* en las raíces de los tratamientos a las 24 horas post - inoculación en las variedades Chimbina Colorada y María Huanca. Dónde: X: media o promedio de J₂ por repetición; el símbolo : mediana de J₂ por repetición. CC: Chimbina Colorada, MH: María Huanca; Rep I.: Repetición I, Rep II.: Repetición II.

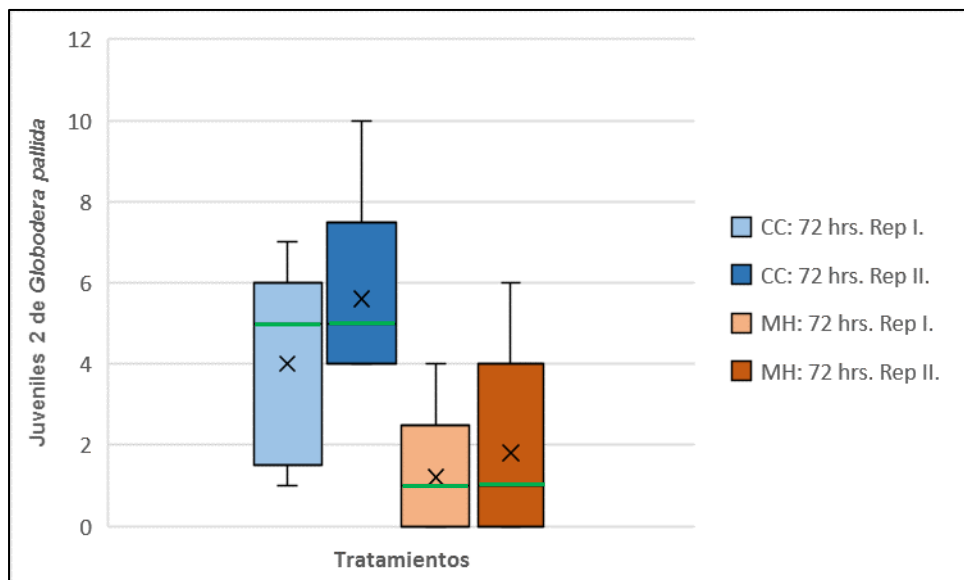


Figura 26. Ingreso de J_2 de *G. pallida* en las raíces de los tratamientos a las 72 horas pos inoculación en las variedades Chimbina Colorada y María Huanca. Dónde: X: media o promedio de J_2 por repetición; el símbolo ____: mediana de J_2 por repetición. CC: Chimbina Colorada, MH: María Huanca; Rep I.: Repetición I, Rep II.: Repetición II.

4.2. Cuantificación de la expresión de genes regulados diferencialmente en respuesta a

Globodera pallida a nivel de raíces.

a) Extracción de ARN total a partir de raíces de plantas de papa evaluadas.

Las muestras de ARN total a partir de raíces fueron etiquetadas de acuerdo a los tratamientos empleados en el diseño experimental y a las variedades de papa utilizadas (ver Figura 19.). Entonces, se obtuvo las muestras S1, S2, S3, S4, S5 y S6 de la variedad Chimbina Colorada (susceptible), donde S1, S2 y S3 son las tres repeticiones del tratamiento control y las tres últimas (S4, S5 y S6) son las tres repeticiones del tratamiento de infección (72 horas de infección). Con el mismo criterio, se etiquetaron las muestras de la variedad María Huanca (resistente), teniendo de esta manera: R1, R2, R3, R4, R5, R6. En resumen, se obtuvo 12 muestras de ARN total, que vienen a ser las 12 bibliotecas que fueron enviadas para secuenciamiento por RNA-Seq.

Las concentraciones ARN total obtenidas por muestra fueron adecuadas en cantidad y calidad, siendo óptimos para el secuenciamiento por RNA-seq. Los valores de absorbancia A260/A280 indicaron que las muestras se encontraban puras y sin contaminación (ver Tabla 9.). Para determinar la calidad de las muestras de ARN total, se ejecutó corridas electroforéticas en gel de agarosa al 1% a 90 voltios por 30 minutos. La integridad de las subunidades 28S y 18S observadas en cada muestra, garantizaron que el ARN total fueron óptimos para cada muestra (Ver Figuras 27 y 28.).

Variedad de papa	Muestra	Concentración [ng/ul]	A 260 /280
	S1	572.8	2.08

Chimbina Colorada	S2	1248.0	2.01
	S3	924.3	2.10
	S4	619.0	2.11
	S5	551.0	2.07
	S6	591.8	2.09
	María Huanca	R1	753.7
R2		535.8	2.05
R3		454.8	1.89
R4		448.1	1.86
R5		373.3	1.91
R6		306.1	2.06

Tabla 9. Concentraciones de ARN total a partir de raíces.

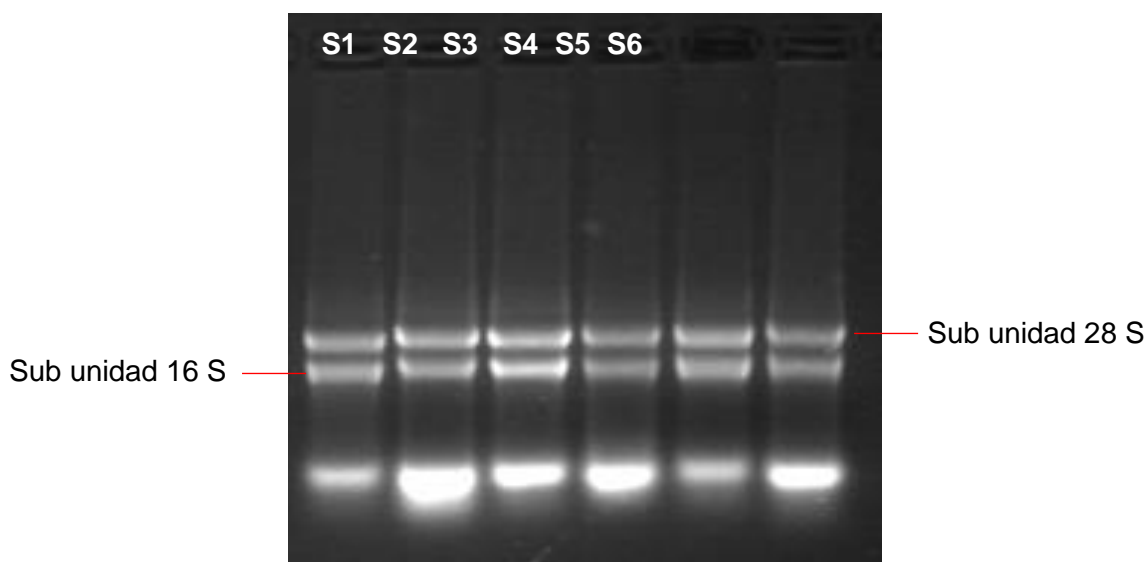
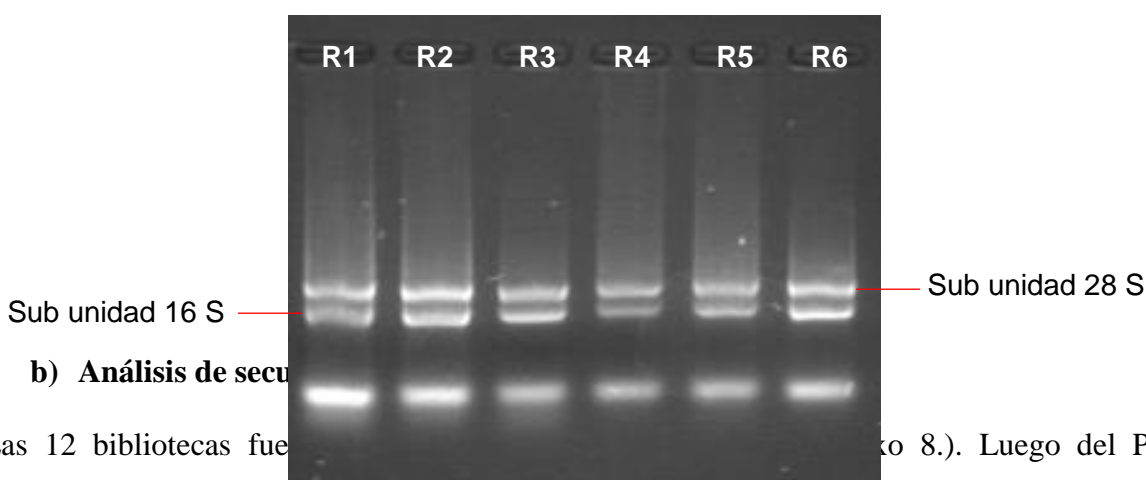


Figura 27. Calidad de ARN total de las muestras extraídas a partir de raíces de la variedad Chimbina Colorada.



b) Análisis de secu

Las 12 bibliotecas fueron analizadas (ver Anexo 8.). Luego del Pre-

Figura 28. Calidad de ARN total de las muestras extraídas a partir de raíces de la variedad María Huanca

secuencias de buena calidad a nivel de bases nucleotídicas (Ver Tabla 10.), basados en el score de calidad Phred de 29 a 40 (zona de color verde del reporte gráfico de FastQC) (Ver Figura 29.).

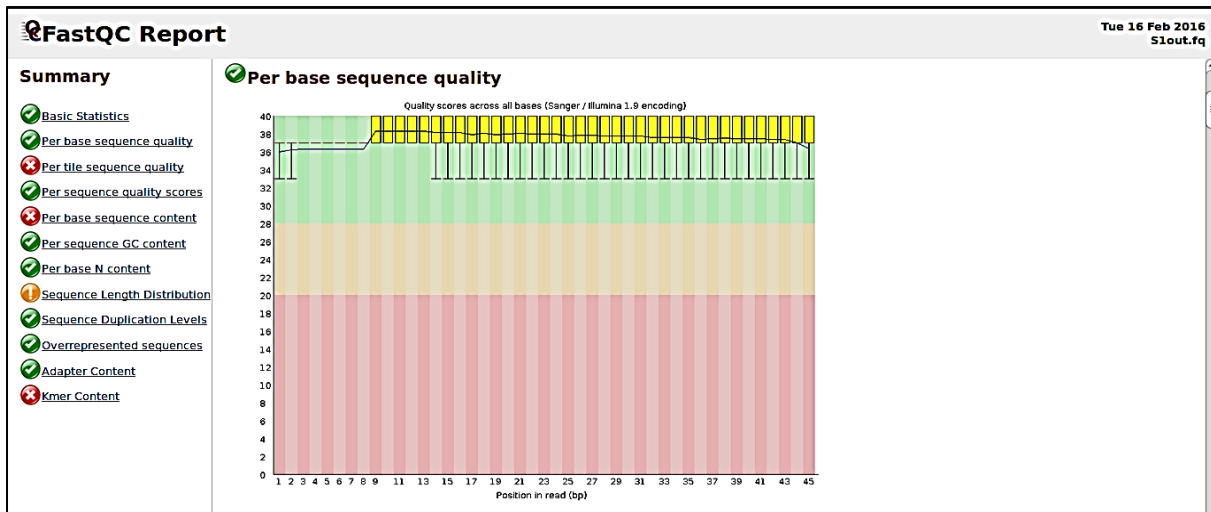


Figura 29. Reporte del Programa Fast QC. Se detalla que las bases nucleóticas de la muestra S1, por ejemplo, se ubican en el sector de color verde comprendidos entre los valores Phred 29 y 40. Esta representación gráfica indicaría que la extracción de ARN y el secuenciamento por RNA-seq fueron adecuados.

Bibliotecas	Total de Secuencias
S1	31 944 894
S2	32 233 705
S3	32 763 288
S4	31 918 298
S5	34 115 485
S6	36 291 159
R1	29 038 036
R2	28 665 423
R3	26 947 639
R4	29 420 533
R5	32 652 723
R6	30 080 914

Tabla 10. Total de secuencias de buena calidad por librería, analizadas por los programas FastQC y Fast_X

Una vez obtenido las secuencias de buena calidad, éstas fueron mapeadas al genoma de referencia utilizando los programas bioinformáticos Bowtie2 y Tophat. Posteriormente, ejecutando las líneas de comando de los programas Cufflinks, Cuffmerge y Cuffdiff se determinó la cantidad de genes expresados en cada variedad de los tratamientos control e infección.

Se expresaron 28072 y 28286 genes en las variedades María Huanca (variedad mejorada resistente a *Globodera pallida*) y Chimbina Colorada (variedad nativa susceptible *G. pallida*) respectivamente, en el tratamiento control sin inoculación de J₂ del nemátodo (Figura 30A.). A

las 72 horas pos inoculación (tratamiento de infección), se expresaron 27717 y 27750 genes en las variedades resistente y susceptible (Figura 30B.). Se determinó genes que se expresaron en común en ambas variedades de papa en cada tratamiento, obteniendo 26701 genes en el tratamiento control y 26303 genes en el tratamiento de infección (Ver Figura 30.).

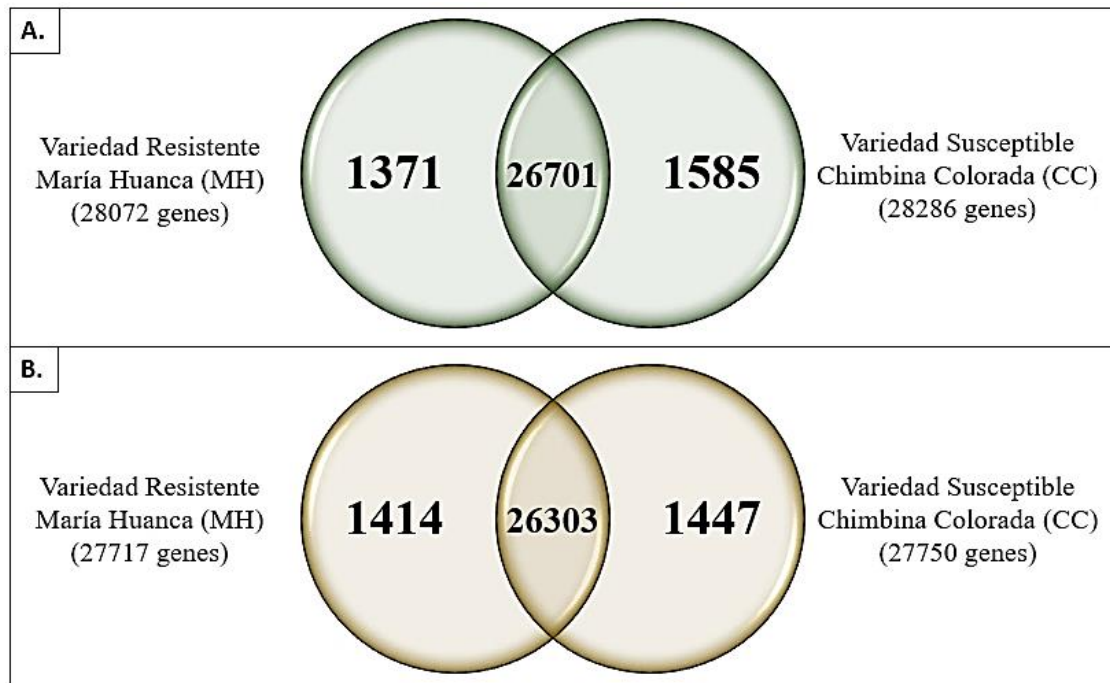


Figura 30. Cantidad de genes expresados en las variedades María Huanca (MH) y Chimbina Colorada (CC). A) Tratamiento control. B) Tratamiento de infección (72 horas post – inoculación).

4.3.Resultados del análisis de datos

a) Resultados del análisis estadístico de resistencia y susceptibilidad de las plantas de papa frente a J₂ de *Globodera pallida*.

Frecuentemente se utiliza un análisis de varianza denominada ANOVA, donde las medias de dos o más poblaciones son iguales, y pruebas paramétricas donde la distribución de los datos

tiene una distribución normal. Para comprobar la existencia de diferencias significativas en los conteos J_2 entre la variedad mejorada María Huanca y la variedad nativa Chimbina Colorada, se realizó el análisis estadístico concerniente a la prueba de normalidad de Shapiro – Wilk, teniendo en cuenta la siguiente hipótesis:

H₀: El conteo de la cantidad de J_2 de *Globodera pallida* no posee una distribución normal.

H_a: El conteo de la cantidad de J_2 de *Globodera pallida* posee una distribución normal.

Se obtuvo un valor de p igual 0.002437 (pValue=0.002437), rechazando la hipótesis alterna y aceptando la nula, concluyendo que los datos del conteo de J_2 no poseen una distribución normal. Por consiguiente, se ejecutó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para la determinación de diferencias significativas, a nivel de conteo de J_2 , utilizando dos mediciones de rangos (las medianas) de los grupos a comparar. Es decir, se planteó las siguientes hipótesis:

Tratamientos a las 24 hrs pi

H₀: La mediana del conteo de J_2 de *G. pallida* en raíces de la variedad María Huanca es igual a la mediana del conteo de J_2 en raíces de la variedad Chimbina Colorada.

H_a: La mediana del conteo de J_2 de *G. pallida* en raíces de la variedad María Huanca es distinta a la mediana del conteo de J_2 en raíces de la variedad Chimbina Colorada.

Tratamientos a las 72 hrs pi

H₀: La mediana del conteo de J₂ de *G. pallida* en raíces de la variedad María Huanca es igual a la mediana del conteo de J₂ en raíces de la variedad Chimbina Colorada.

H_a: La mediana del conteo de J₂ de *G. pallida* en raíces de la variedad María Huanca es distinta a la mediana del conteo de J₂ en raíces de la variedad Chimbina Colorada.

Se generaron las siguientes tablas consecuencia de la Prueba de Mann-Whitney:

		Rangos			
Tratamientos	Variedades	N	Rango promedio	Suma de rangos	
24 hrs pi	Datos				
		Chimbina	10	10,15	101,50
		Colorada			
		María Huanca	10	10,85	108,50
	Total	20			
72 hrs pi	Datos				
		Chimbina	10	14,10	141,00
		Colorada			
		María Huanca	10	6,90	69,00
	Total	20			

Tabla 11. Rangos de la Prueba de Mann-Whitney entre los tratamientos post – infección (pi) en las variedades Chimbina Colorada y María Huanca, con respecto al conteo de J₂ de *Globodera pallida*. Donde, *N*: Cantidad de casos en el grupo. *Rango Promedio*: Mediana, resulta de la división entre la Suma de rangos y la cantidad de casos en el grupo (*N*). *Suma de rangos*: Suma del orden de posición de los casos ordenados de menor a mayor.

		Estadísticos de contraste ^a	
Tratamientos		Datos	
24 hrs. pi		U de Mann-Whitney	46,500
		W de Wilcoxon	101,500
		Z	-,270
		Sig. asintót. (bilateral)	,787
		Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,796 ^b
72 hrs. pi		U de Mann-Whitney	14,000
		W de Wilcoxon	69,000
		Z	-2,758

Sig. asintót. (bilateral)	,006
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,005 ^b

a. Variable de agrupación: Variedades

b. No corregidos para los empates.

Tabla 12. Estadísticos de contraste de la Prueba de Mann-Whitney entre los tratamientos post – infección (pi) en las variedades Chimbina Colorada y María Huanca, con respecto al conteo de J₂ de *G. pallida*.

La Tabla 12. indica que no existe diferencias significativas en el conteo de J₂ de *Globodera pallida* entre ambas variedades de papa a las 24 horas pi (Sig. asintót. (bilateral) = 0,787), por lo tanto, se acepta la hipótesis nula de la prueba hipótesis. Sin embargo, existe diferencias significativas a las 72 horas pi (Sig. asintót. (bilateral) = 0,006), rechazando la hipótesis nula y aceptando la alterna de la prueba de hipótesis planteada. Por esta razón, se decidió secuenciar las muestras de raíces de los tratamientos a las 72 horas, de ambas variedades de papa.

b) Resultados del análisis de expresión de genes regulados diferencialmente en respuesta a *Globodera pallida* a nivel de raíces.

Para la selección de genes candidatos relacionados a la resistencia, se aplicaron los criterios de selección para la determinación de sobreexpresión y represión de genes. De esta manera se obtuvo 83 y 117 genes que se sobre expresaron tanto en la variedad resistente María Huanca (MH) y la variedad susceptible Chimbina Colorada (CC); de los cuales 33 genes se sobre expresaron en una misma dirección en ambas variedades de papa (Figura 31).

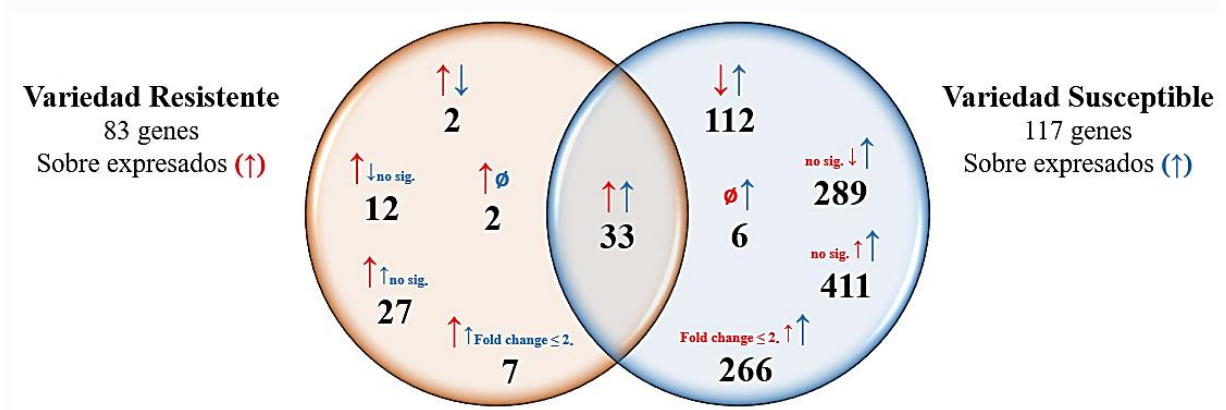


Figura 31. Cantidad de genes que se sobre expresaron (Fold change ≥ 2) entre el tratamiento control y el de infección en ambas variedades de papa. Donde:

- 2 \uparrow \downarrow genes incrementaron su expresión en la variedad resistente María Huanca, pero disminuyeron en su expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada.
- 2 \uparrow \emptyset genes incrementaron su expresión solamente en la variedad resistente María Huanca.
- 12 \uparrow \downarrow no sig. genes incrementaron su expresión en la variedad resistente María Huanca, pero disminuyeron en su expresión de forma no significativa en la variedad susceptible Chimbina Colorada.
- 27 \uparrow no sig. genes incrementaron su expresión en la variedad resistente María Huanca, pero el incremento de la expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada se realizó de forma no significativa.
- 7 \uparrow Fold change ≤ 2 . genes incrementaron su expresión en la variedad resistente María Huanca, pero el incremento de la expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada posee un Fold change ≤ 2 .
- 33 \uparrow genes incrementaron su expresión en la variedad resistente María Huanca y variedad susceptible Chimbina Colorada.
- 112 \uparrow \downarrow genes disminuyeron su expresión en la variedad resistente María Huanca, pero incrementaron su expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada.
- 6 \emptyset \uparrow genes incrementaron su expresión solamente en la variedad susceptible Chimbina Colorada.
- 289 no sig. \downarrow \uparrow genes disminuyeron su expresión de forma no significativa en la variedad resistente María Huanca, pero incrementaron su expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada.
- 411 no sig. \uparrow genes incrementaron su expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada, pero el incremento de la expresión en la variedad resistente María Huanca se realizó de forma no significativa.
- 266 Fold change ≤ 2 . \uparrow genes incrementaron su expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada, pero el incremento de la expresión en la variedad resistente María Huanca posee un Fold change ≤ 2 .

En el caso de la represión o inhibición de expresión de genes, se obtuvo 371 y 568 genes que se inhibieron en su expresión tanto en la variedad resistente María Huanca (MH) y la variedad susceptible Chimbina Colorada (CC); de los cuales 114 genes se inhibieron o reprimieron en una misma dirección en ambas variedades de papa (Figura 32.).

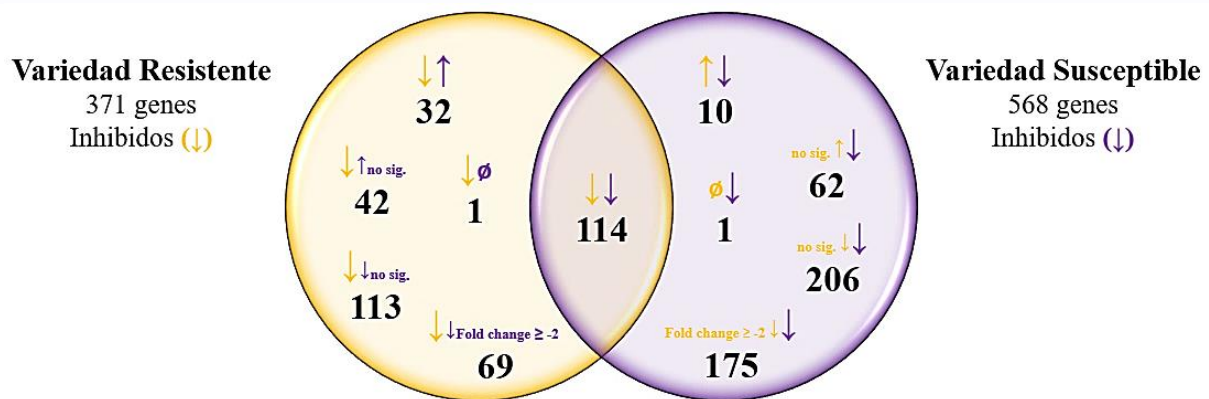


Figura 32. Cantidad de genes que se inhibieron (Fold change ≤ -2) entre el tratamiento control y el de infección en ambas variedades de papa. Donde:

- 32 \downarrow \uparrow genes disminuyeron su expresión en la variedad resistente María Huanca, pero incrementaron su expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada.
- 1 \downarrow \emptyset gen disminuyó su expresión solamente en la variedad resistente María Huanca.
- 42 \downarrow no sig. \uparrow genes disminuyeron su expresión en la variedad resistente María Huanca, pero incrementaron su expresión de forma no significativa en la variedad susceptible Chimbina Colorada.
- 113 \downarrow no sig. \downarrow genes disminuyeron su expresión en la variedad resistente María Huanca, pero la disminución de la expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada se realizó de forma no significativa.
- 69 \downarrow Fold change ≥ -2 . genes disminuyeron su expresión en la variedad resistente María Huanca, pero la disminución de la expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada posee un Fold change ≥ -2 .
- 114 \downarrow \downarrow genes disminuyeron su expresión en la variedad resistente María Huanca y variedad susceptible Chimbina Colorada.
- 10 \uparrow \downarrow genes incrementaron su expresión en la variedad resistente María Huanca, pero disminuyeron su expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada.
- 1 \emptyset \uparrow gen disminuyó su expresión solamente en la variedad susceptible Chimbina Colorada.
- 62 no sig. \uparrow \downarrow genes incrementaron su expresión de forma no significativa en la variedad resistente María Huanca, pero disminuyeron su expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada.

206 no sig. ↓ ↓ genes disminuyeron su expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada, pero la disminución de la expresión en la variedad resistente María Huanca se realizó de forma no significativa.

175 Fold change ≤ -2 ↓ ↓ genes disminuyeron su expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada, pero la disminución de la expresión en la variedad resistente María Huanca posee un Fold change ≤ -2.

Para los fines de la investigación se agruparon los genes que se comportaron de manera opuesta a nivel de expresión (sobre expresión y represión o viceversa), como también aquellos genes que solamente se incrementaron en la variedad resistente María Huanca (Tabla 13.). Para obtener genes R candidatos involucrados en la resistencia se ajustó el criterio de inclusión: Fold change ≥ 1 y los valores de significancia (Tabla 14.).

Tabla 13. Genes que se comportaron de manera opuesta a nivel de expresión en ambas variedades de papa y genes que incrementaron o disminuyeron su expresión exclusivamente en la variedad María Huanca.

N°	GENES		BLAST			DIRECCION DE LA EXPRESIÓN	VARIEDAD MARÍA HUANCA				VARIEDAD CHIMBINA COLORADA			
	LOCUS	NOMBRE	NOMBRE DEL GEN SIMILAR EN BLAST	COVERAGE (%)	IDENTITY (%)		CONTROL	INFECTADO (72hrs pi)	Log2 (fold change)	p_value	CONTROL	INFECTADO (72hrs pi)	Log2 (fold change)	p_value
1	ST4.03ch02:30294338-30297762	Purine transporter	PREDICTED: Solanum tuberosum probable purine permease 6 (LOC102594255)	61	100	↑↓	0.267811	1.22468	2.19311	0.00585	3.90168	1.69514	-1.20269	0.008
2	ST4.03ch02:44849066-44853459	GNS1/SUR4 membrane family protein	PREDICTED: Solanum tuberosum elongation of fatty acids protein 3-like (LOC102597131), mRNA	22	100		0.20412	0.826068	2.01684	0.0008	1.0026	0.411299	-1.28548	0.00555
3	ST4.03ch10:57857236-57857580	Gene of unknown function	-				1.33779	5.55834	2.05481	0.00165	4.43065	4.2762	-0.0511909	0.9051
4	ST4.03ch03:60562995-60566572	AR791	PREDICTED: Solanum tuberosum protein CHUP1, chloroplastic (LOC102602452), mRNA	60	100		0.262566	1.20892	2.20296	0.00005	0.396793	0.36119	-0.135629	1
5	ST4.03ch01:2051650-2051976	COG5125	PREDICTED: Solanum tuberosum non-structural maintenance of chromosomes element 4 homolog A-like (LOC102605541), mRNA	65	100		1.18568	4.74996	2.00221	0.0068	0.637099	0.550622	-0.210456	0.866
6	ST4.03ch12:60365483-60370572	Trichohyalin	PREDICTED: Solanum tuberosum probable elastin-binding protein EbpS (LOC102598174), mRNA	17	100		0.473973	2.62237	2.46799	0.00005	0.711905	0.610297	-0.222173	0.62005
7	ST4.03ch01:82866457-82868622	B3 domain-containing protein	PREDICTED: Solanum tuberosum B3 domain-containing protein A15g60140-like (LOC102599396), mRNA	68	100	↑↓ no sig.	0.10573	0.523883	2.30886	0.00205	0.473066	0.373913	-0.339338	0.52855
8	ST4.03ch03:44970720-44975407	RNA polymerase sigma factor rpoD	PREDICTED: Solanum tuberosum RNA polymerase sigma factor sigE, chloroplastic/mitochondrial (LOC102586954), mRNA	44	100		3.83864	15.8305	2.04404	0.00005	13.3511	8.56325	-0.640723	0.01755
9	ST4.03ch07:51856694-51857749	Gene of unknown function	-				2.53642	10.5023	2.04984	0.00005	6.14915	3.73642	-0.718729	0.0493
10	ST4.03ch10:4495601-4497176	UDP-glucosyltransferase	PREDICTED: Solanum tuberosum anthocyanidin 3-O-glucoside 2"-O-glucosyltransferase-like (LOC102595387), mRNA	87	100		0.324487	1.35415	2.06116	0.0001	0.406488	0.193554	-1.07048	1
11	ST4.03ch06:53731732-53732425	Leucine-rich repeat/extensin	-	-	-		0.739141	3.39663	2.20018	0.00005	1.66593	0.77726	-1.09986	0.0263
12	ST4.03ch02:39712057-39715702	COL domain class transcription factor	PREDICTED: Solanum tuberosum B-box zinc finger protein 19-like (LOC102606359), mRNA	29	100	↑↓ no sig.	0.437468	2.24641	2.36037	0.00005	0.738086	0.325057	-1.1831	0.1492
13	ST4.03ch12:49511087-49513213	Geraniol 10-hydroxylase	PREDICTED: Solanum tuberosum geraniol 8-hydroxylase-like (LOC102601135), mRNA	80	100		0.162066	0.888891	2.45542	0.0004	0.0429857	0.0178827	-1.2653	1
14	ST4.03ch01:51263386-51264847	CLE25	-				0.379342	2.20921	2.54196	0.0092	2.1368	0.839854	-1.34724	0.0174
15	ST4.03ch02:32897070-32897645	Conserved gene of unknown function	-				0	4.86504	inf	0.00005	-	-	-	-
16	ST4.03ch12:49572380-49572719	Microsomal omega-6-desaturase	PREDICTED: Solanum tuberosum delta(12)-acyl-lipid-desaturase-like (LOC102584924)	94	100	↑∅	11.4607	49.24	2.10313	0.00005	-	-	-	-
17	ST4.03ch12:55084334-55084973	Miraculin	PREDICTED: Solanum tuberosum miraculin-like (LOC102589605), mRNA	100	100		12.1572	0.211613	-5.84424	0.00265	0.16987	2.39217	3.81582	0.0016
18	ST4.03ch07:46386089-46386556	SLAC-homologous 1 protein	PREDICTED: Solanum tuberosum S-type anion channel SLAH1-like (LOC102595187), mRNA	78	100	↓↑	8.60934	1.6481	-2.3851	0.00015	1.35469	11.4034	3.07343	0.00005
19	ST4.03ch02:32668438-32671415	Pyruvate decarboxylase	PREDICTED: Solanum pennellii pyruvate decarboxylase 1 (LOC107009317), mRNA	70	99		494.521	79.9983	-2.62799	0.00005	12.7097	88.0972	2.79317	0.00005

20	ST4.03ch11:5101080-5102175	Cationic peroxidase 1	PREDICTED: Solanum tuberosum peroxidase 5-like (LOC102587115), mRNA	92	100	7.42136	0.615832	-3.59107	0.00005	0.944851	5.84946	2.63014	0.00005
21	ST4.03ch11:5090559-5091816	Cationic peroxidase 1	PREDICTED: Solanum tuberosum peroxidase 5-like (LOC102597489), mRNA	92	100	3.04172	0.284406	-3.41886	0.00005	0.478443	2.62346	2.45505	0.00005
22	ST4.03ch09:59926832-59929020	Xyloglucan endo-transglycosylase	PREDICTED: Solanum tuberosum xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2 (LOC102588287), mRNA	47	99	68.4915	16.5875	-2.04583	0.00005	13.7245	73.4051	2.41912	0.00005
23	ST4.03ch08:55277791-55281642	Endo-1,4-beta-glucanase	PREDICTED: Solanum tuberosum endoglucanase 18-like (LOC102581381), mRNA	43	99	2.17664	0.51584	-2.07711	0.003	0.602501	2.86278	2.24838	0.0004
24	ST4.03ch02:39368620-39370527	Flavanone 3 beta-hydroxylase	Solanum tuberosum flavanone 3 beta-hydroxylase gene, complete cds	90	97	2.17334	0.250128	-3.11917	0.00005	4.38148	20.4208	2.22054	0.00005
25	ST4.03ch11:5107538-5108796	Class III peroxidase 16	PREDICTED: Solanum tuberosum peroxidase 5-like (LOC102587446), mRNA	92	93	1.64618	0.181259	-3.183	0.00005	0.562762	2.53136	2.16932	0.00005
26	ST4.03ch10:58441523-58442948	Glucosyltransferase	PREDICTED: Solanum tuberosum zeatin O-glucosyltransferase-like (LOC102593031), mRNA	100	100	20.6984	4.98422	-2.05408	0.00005	1.45286	6.28531	2.11309	0.00005
27	ST4.03ch01:66852941-66853885	CHP-rich zinc finger protein	-			50.7747	12.5283	-2.01892	0.00005	3.27523	13.1764	2.00829	0.00005
28	ST4.03ch11:5116064-5117315	Cationic peroxidase 1	PREDICTED: Solanum tuberosum peroxidase 5-like (LOC102587115), mRNA	85	95	4.20118	0.459904	-3.19139	0.00005	0.947787	3.63139	1.93789	0.00015
29	ST4.03ch11:5104998-5106087	Cationic peroxidase 1	PREDICTED: Solanum tuberosum peroxidase 5-like (LOC102587446), mRNA	94	99	1.85517	0.145449	-3.67297	0.0009	0.691412	2.59698	1.90922	0.00015
30	ST4.03ch01:75349909-75351298	Extensin Dif54	PREDICTED: Solanum tuberosum extensin-2-like (LOC102590517), mRNA	100	100	2.42192	0.349843	-2.79137	0.00005	1.09486	3.70197	1.75755	0.00005
31	ST4.03ch01:75381497-75382653	Extensin Dif10	PREDICTED: Solanum tuberosum extensin-2-like (LOC107060697), mRNA	89	96	5.23873	0.412324	-3.66737	0.00005	2.0859	7.0024	1.74718	0.00005
32	ST4.03ch01:75370123-75371095	Extensin Dif10	PREDICTED: Solanum tuberosum extensin-2-like (LOC107060697), mRNA	99	100	2.42696	0.174053	-3.80155	0.00005	0.446397	1.47647	1.72576	0.0017
33	ST4.03ch05:50994088-50995521	Cationic peroxidase 1	PREDICTED: Solanum tuberosum peroxidase 5-like (LOC102594431), mRNA	78	100	38.7095	3.89233	-3.31398	0.00005	5.99636	19.184	1.67774	0.00005
34	ST4.03ch01:66774089-66774953	DC1 domain containing protein	-			2.33218	0.541552	-2.10651	0.00005	0.553848	1.74109	1.65243	0.0015
35	ST4.03ch01:66845134-66846077	Gene of unknown function	-			88.7795	21.4372	-2.05011	0.00005	3.10977	9.4426	1.60238	0.0001
36	ST4.03ch09:52132745-52133383	Glutaredoxin family protein	PREDICTED: Solanum tuberosum monothiol glutaredoxin-S2-like (LOC102580667), mRNA	84	100	5.71803	0.688802	-3.05336	0.00005	1.6724	4.49202	1.42545	0.00465
37	ST4.03ch01:75391707-75392765	Extensin Dif54	PREDICTED: Solanum tuberosum extensin-2-like (LOC102591552), mRNA	99	100	7.6818	0.470532	-4.02908	0.00005	2.50198	6.07348	1.27945	0.0008
38	ST4.03ch02:47812512-47815262	Conserved gene of unknown function	PREDICTED: Solanum tuberosum kelch repeat-containing protein At3g27220-like (LOC102598419), transcript variant X2, mRNA	52	100	41.8709	7.03396	-2.57354	0.00005	4.85448	11.3275	1.22244	0.0001
39	ST4.03ch09:52110282-52110886	Glutaredoxin family protein	PREDICTED: Solanum tuberosum monothiol glutaredoxin-S2-like (LOC102581007), mRNA	95	100	4.91014	1.0698	-2.19843	0.00005	1.86274	4.33958	1.22013	0.0083
40	ST4.03ch03:58515381-58517708	Nodulin	PREDICTED: Solanum tuberosum WAT1-related protein At3g18200 (LOC102597915), mRNA	47	99	7.081	1.71099	-2.04912	0.00005	2.39887	5.45567	1.1854	0.00325
41	ST4.03ch01:66885233-66886308	Conserved gene of unknown function	-			24.4318	5.84276	-2.06404	0.00005	1.73084	3.9174	1.17842	0.00235
42	ST4.03ch01:1439743-1441644	Extensin Dif54	PREDICTED: Solanum tuberosum extensin-1-like (LOC107061808), mRNA	99	100	9.86824	0.553455	-4.15626	0.00005	2.25568	5.09233	1.17476	0.0005
43	ST4.03ch09:48449646-48452200	DNA binding protein	PREDICTED: Solanum tuberosum heat stress transcription factor A-7a-like	55	100	14.5609	3.02658	-2.26634	0.00005	1.23274	2.64115	1.09929	0.0026

66	ST4.03ch02:17740756-17743016	l-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	PREDICTED: Solanum pennellii l-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (LOC107010265), mRNA	59	94		10.5708	2.49509	-2.08293	0.00005	3.23318	4.11038	0.346317	0.29825
67	ST4.03ch03:39485109-39486959	Pectinesterase	PREDICTED: Solanum tuberosum probable pectinesterase/pectinesterase inhibitor 17 (LOC102586602), mRNA	95	100		39.6323	2.56549	-3.94937	0.00005	12.6068	15.8838	0.33335	0.2325
68	ST4.03ch03:43407266-43408645	Gibberellin 20-oxidase	PREDICTED: Solanum tuberosum gibberellin 2-beta-dioxygenase 7-like (LOC102603638), mRNA	73	100		5.84548	0.735559	-2.99041	0.00005	1.11176	1.37662	0.308292	0.4494
69	ST4.03ch08:52837305-52837823	Protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein family protein	PREDICTED: Solanum tuberosum lipid transfer-like protein VAS (LOC102593162), mRNA	69	100		16.2149	3.96831	-2.03073	0.00005	17.9754	22.1307	0.300024	0.3733
70	ST4.03ch08:2283958-2285496	UDP-glucose:glucosyltransferase	PREDICTED: Solanum tuberosum UDP-glucosyltransferase 74G1-like (LOC102579343), mRNA	80	100		6.81771	1.57307	-2.11571	0.00005	9.72795	11.6275	0.257333	0.4325
71	ST4.03ch08:2352290-2353955	UDP-xylose phenolic glucosyltransferase	PREDICTED: Solanum tuberosum UDP-glucosyltransferase 74G1-like (LOC102598081), mRNA	82	100		2.70111	0.637191	-2.08375	0.00005	4.1645	4.97684	0.257087	0.4426
72	ST4.03ch01:64013811-64017172	Auxin efflux carrier component	PREDICTED: Solanum tuberosum putative auxin efflux carrier component 8 (LOC102585800), mRNA	37	100		25.9604	5.82347	-2.15636	0.00005	4.35421	5.19789	0.255514	0.44635
73	ST4.03ch04:67151436-67153129	Transcription factor	PREDICTED: Solanum tuberosum transcription factor bHLH84 (LOC102600435), mRNA	71	100		4.26122	0.360132	-3.56467	0.00005	2.66658	3.17382	0.251227	0.4643
74	ST4.03ch12:11649567-11651621	Cationic peroxidase 1	PREDICTED: Solanum tuberosum peroxidase 5-like (LOC102587618), mRNA	61	99		78.6364	15.4572	-2.34692	0.00005	41.4861	49.015	0.240593	0.36735
75	ST4.03ch03:3328322-3332872	RING-H2 finger protein ATL4M	PREDICTED: Solanum tuberosum NEP1-interacting protein-like 1 (LOC102580251), mRNA	24	100		18.0734	4.22027	-2.09846	0.00005	7.90652	9.0555	0.195751	0.47845
76	ST4.03ch11:4864095-4865229	Glucosyl/glucuronosyl transferases	PREDICTED: Solanum tuberosum beta-D-glucosyl crocetin beta-1,6-glucosyltransferase-like (LOC102602552), mRNA	100	100		12.763	1.73384	-2.87993	0.00005	20.4404	23.3801	0.193857	0.49465
77	ST4.03ch08:54671552-54674129	Xyloglucan galactosyltransferase KATAMARI1	PREDICTED: Solanum pennellii xyloglucan-specific galacturonosyltransferase (LOC107028641), mRNA	99	96		2.53934	0.104279	-4.60593	0.00005	1.79089	2.00229	0.16098	0.6515
78	ST4.03ch07:42392481-42393886	Acyltransferase	PREDICTED: Solanum lycopersicum acylsugar acyltransferase 3-like (LOC101245379), mRNA	93	91		4.96485	1.01754	-2.28666	0.00005	4.52244	4.98613	0.140819	0.6911
79	ST4.03ch05:46660226-46664227	Kinase family protein	PREDICTED: Solanum tuberosum U-box domain-containing protein 35-like (LOC102597886), mRNA	64	100		0.508575	0.0956293	-2.41094	0.00025	0.469676	0.506281	0.108273	0.8107
80	ST4.03ch06:53643709-53647656	l-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	PREDICTED: Solanum tuberosum 2'-deoxymugineic-acid 2'-dioxygenase-like (LOC102604390), mRNA	35	99	↓↑ no sig.	8.81148	1.38678	-2.66765	0.00005	1.82615	1.93436	0.0830507	0.8487
81	ST4.03ch04:64866740-64868048	Aspartic proteinase nepenthesin-1	PREDICTED: Solanum tuberosum aspartic proteinase nepenthesin-1-like (LOC102583658), mRNA	100	100		12.1918	2.31655	-2.39586	0.00005	15.6286	16.4172	0.0710207	0.79575
82	ST4.03ch02:42043190-42045006	DNA binding protein	PREDICTED: Solanum tuberosum transcription factor bHLH93 (LOC102588068), mRNA	64	100		5.77246	1.0984	-2.39378	0.00005	4.50196	4.71303	0.0661019	0.84015
83	ST4.03ch08:53742062-53743904	Alpha-expansin 7	PREDICTED: Solanum tuberosum expansin-A7 (LOC102591713), mRNA	56	100		26.217	1.29823	-4.33588	0.00005	12.5941	13.0971	0.0564994	0.8444
84	ST4.03ch11:3018376-3025851	Endo-1,4-beta-glucanase	PREDICTED: Solanum tuberosum endoglucanase 12 (LOC102598742), mRNA	28	99		35.7636	6.9549	-2.36239	0.00005	22.3311	23.1823	0.0539659	0.829
85	ST4.03ch03:55646288-55648550	Kinase	PREDICTED: Solanum tuberosum probable receptor-like protein kinase At5g61350 (LOC102578293), mRNA	100	100		5.32346	0.920865	-2.5313	0.00005	4.05573	4.18796	0.0462849	0.8703
86	ST4.03ch03:50668233-50668746	Conserved gene of unknown function	-				8.11242	1.41798	-2.5163	0.00005	9.55262	9.85592	0.0450931	0.90495

87	ST4.03ch02:29944941-29945739	Chlorophyll a/b binding protein	PREDICTED: Solanum tuberosum chlorophyll a-b binding protein 1C, chloroplastic-like (LOC102589532), mRNA	100	100		5.4371	0.848817	-2.67931	0.00005	5.98364	6.10703	0.0294479	0.9271
88	ST4.03ch03:38778111-38793840	Xyloglucan endotransglucosylase-hydrolase XTH3	PREDICTED: Solanum tuberosum probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 23 (LOC102598758), mRNA	27	99		56.5936	11.6885	-2.27555	0.00005	25.6186	26.1461	0.0294083	0.91645
89	ST4.03ch10:57314132-57315416	ERF transcription factor	PREDICTED: Solanum tuberosum ethylene-responsive transcription factor RAP2-11-like (LOC102597812), mRNA	17	88		1.34048	0.167658	-2.99915	0.00435	0.0496092	0.0500039	0.0114322	1
90	ST4.03ch11:255157-259620	Metal ion binding protein	PREDICTED: Solanum lycopersicum heavy metal-associated isoprenylated plant protein 3-like (LOC101264884), transcript variant X2, mRNA	22	85		0.506032	0.117975	-2.10074	0.0093	0	0.031237	inf	1
91	ST4.03ch10:2157752-2166285	Conserved gene of unknown function	-			↓∅	1.14392	0.156463	-2.87009	0.00655	-	-	-	-

Tabla 14. Genes R involucrados en la resistencia a *Globodera pallida*.

GENES			BLAST			DIRECCION DE LA EXPRESIÓN	VARIEDAD MARÍA HUANCA				VARIEDAD CHIMBINA COLORADA			
Nº	LOCUS	NOMBRE	NOMBRE DEL GEN SIMILAR EN BLAST	COVERAGE (%)	IDENTITY (%)		CONTROL	INFECTADO (72hrs pi)	Log2 (fold change)	p_value	CONTROL	INFECTADO (72hrs pi)	Log2 (fold change)	p_value
92	ST4.03ch04:58273907-58274447	Late blight resistance protein	Solanum tuberosum nematode resistance-like protein (Gro1-8) pseudogene, complete sequence	90	82	↑↓	0.954771	2.22469	1.22038	0.00675	1.36984	0.766659	-0.837349	0.0963
93	ST4.03ch12:2859176-2862174	Disease resistance protein	Solanum tuberosum probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At2g25790 (LOC107059063), mRNA	81	85	↓↑	2.44789	0.931262	-1.39428	0.00005	0.106704	0.378181	1.82546	1
94	ST4.03ch12:61051699-61055154	Disease resistance protein	Solanum tuberosum receptor-like protein 12 (LOC102582181), mRNA	50	77		15.4329	5.83177	-1.40401	0.00005	3.1372	13.7661	2.13357	0.00005
95	ST4.03ch01:45553763-45554288	Disease resistance response protein	Solanum lycopersicum dirigent protein 11-like	100	97	↑∅	6.61172	2.59686	-1.34826	0.0006	0.528394	0.707266	0.420637	0.54375
96	ST4.03ch11:2710622-2713343	NBS-LRR type disease resistance protein	Solanum tuberosum disease resistance protein RPM1-like	100	100		1.72947	0.509921	-1.76199	0.00005	1.26941	1.58743	0.322537	0.34725
97	ST4.03ch05:41893034-41893582	TMV resistance protein N	Solanum tuberosum TMV resistance protein N-like (LOC107062503),	97	100	↑∅	2.10491	3.35651	0.673201	0.0754	-	-	-	-
98	ST4.03ch11:15433891-15434293	Nematode resistance	Nicotiana tabacum TMV resistance protein N-like (LOC107771328), mRNA	97	82		3.86292	4.18391	0.115159	0.7691	-	-	-	-
99	ST4.03ch11:15415588-15417795	Nematode resistance	PREDICTED: Solanum tuberosum TMV resistance protein N-like (LOC107061596), mRNA	24	100		3.60523	4.51548	0.324787	0.306	-	-	-	-
100	ST4.03ch05:4232469-4235213	Disease resistance protein	PREDICTED: Solanum tuberosum putative late blight resistance protein homolog R1A-10 (LOC107060023), mRNA	93	95	↓∅	1.68988	1.06184	-0.670354	0.0136	-	-	-	-

V. DISCUSIÓN

Globodera pallida es considerado un endoparásito obligado debido a la necesidad del estadio J₂ de localizar la raíz del hospedero (*Solanum sp*) e infectarla por la zona de elongación para desarrollarse y mantener su progenie (Mancuso et al., 2005). A su vez, *G. pallida* es catalogado como sedentario por sus fases de ciclo que se desarrollan en el interior de las raíces atacadas. Estas características, sumadas a la habilidad de enquistarse, hacen de *G. pallida* un nematodo difícil de erradicar. Debido a este panorama, la investigación se enfocó en la búsqueda de genes que se regulen diferencialmente en raíz en respuesta a la invasión por J₂ de *G. pallida*. Esta etapa del ciclo biológico del nematodo fue considerada propicia para el estudio, ya que permite conocer la expresión temprana de genes en variedades de papa expuestas. Para tal efecto, se evaluaron variedades propias de Perú, María Huanca (variedad mejorada y resistente a *G. pallida*) y Chimbina Colorada (variedad nativa, susceptible a *G. pallida*), las cuales fueron sometidas a ensayos de infección con J₂ y posterior análisis de expresión de genes a nivel de raíces.

Se evaluaron y estandarizaron los ensayos de infección de J₂ en las variedades de papa en las primeras horas pos inoculación y se obtuvo como resultado la ausencia o baja cantidad de J₂ en la raíz. Con ello se comprobó lo reportado por Castelli et al. (2006) en el sentido que los J₂ comienzan a invadir las raíces de papa recién a partir de las 12 horas pos inoculación. Por ello fue necesario evaluar los ensayos de infección en tiempos superiores a las 12 horas. El diseño experimental definitivo se ejecutó bajo dos tratamientos pos inoculación: 24 horas y 72 horas.

La comparación estadística entre la cantidad de J₂ que invadieron inicialmente las raíces de las variedades María Huanca y Chimbina Colorada determinó que no existieron diferencias significativas, lo que indica que las raíces de ambas variedades de papa son penetradas por J₂. Tampoco se detectaron diferencias significativas entre ambas variedades al comparar la

cantidad de J₂ en las raíces a las 24 horas pos inoculación. Estos hallazgos concuerdan con lo propuesto por Jolivet et al. (2007), quienes afirman que los nematodos penetran a las variedades susceptibles y resistentes en la misma medida. Más aún, Melillo et al. (1990) destacan que en las primeras etapas de la invasión de los J₂ de *G. pallida*, los cambios celulares son aparentemente iguales en variedades resistentes y susceptibles. Sin embargo, existieron diferencias significativas cuando la evaluación se hizo a las 72 horas pos inoculación. Se observó mayor cantidad de J₂ en las raíces de la variedad susceptible Chimbina Colorada en comparación con las raíces de la variedad resistente María Huanca. Tanto el conteo de J₂ y la validación estadística brindaron evidencia para determinar que la variedad María Huanca presenta resistencia a la invasión de J₂.

A pesar de que la variedad María Huanca es catalogada como resistente al nematodo, se encontró J₂ invadiendo raíz. En algunos casos, la resistencia de una planta frente al nematodo puede darse al impedirse el ingreso de los J₂ a la raíz. Por ejemplo, Castelli et al. (2006) no pudieron detectar J₂ de *G. pallida* a los 4 días pos inoculación en raíces de *Solanum canasense*. La presencia de pelos radiculares alrededor del cuerpo de la raíz podría haber representado en este caso una barrera física limitante. Los autores plantearon además la hipótesis de que el impedimento para el ingreso de los J₂ en raíces de *S. canasense* podría estar mediado por una acumulación de glicoalcaloides tóxicos para los nematodos en esta zona de la planta. En otros casos, la resistencia al nematodo puede manifestarse luego del ingreso de este, en cuyo caso se han reportado hasta dos variantes: aquella donde la planta permite el ingreso de los J₂ y la formación del sincitio, con la particularidad de que las células circundantes al nematodo y el sincitio se vuelven sensibles y se necrosan (muerte celular); y aquella que consiste en una respuesta sensible retardada, sin la presencia de necrosis, que es la más común en las plantas Castelli et al. (2005). Estas dos variantes de resistencia previenen la formación de las hembras en la fase sedentaria del nematodo.

Los resultados de los análisis estadísticos facilitaron la toma de decisión sobre el tratamiento pos inoculación más adecuado para evaluar la expresión de genes regulados diferencialmente en respuesta a la infección por *G. pallida*. Tomando en cuenta lo reportado por Jolivet et al. (2007) y Melillo et al. (1990) sobre la detección indistinta de J₂ en variedades susceptibles y resistentes en las primeras horas pos inoculación, así como la ausencia de diferencias significativas en la cantidad de J₂ detectados 24 horas pos inoculación en ambas variedades de papa en el diseño experimental definitivo, se decidió evaluar y secuenciar las muestras de raíces pertenecientes a los tratamientos de 72 horas pos inoculación de ambas variedades. El tratamiento control también fue enviado a secuenciar para la comparación de los niveles de expresión con el tratamiento a las 72 horas pos inoculación.

Una vez que las muestras de raíces de los tratamientos control y 72 horas pos inoculación fueron secuenciados, se realizó el análisis de expresión. Para determinar un número representativo de genes expresados diferencialmente, se utilizaron criterios basados en el nivel de significancia menor a 0.05 ($p < 0.05$). A este primer criterio se sumó el Fold change, el cual determina el incremento o decremento de la expresión. En un principio solo se consideró los genes con valores superiores o iguales a 2 (Fold change ≥ 2).

Estos criterios limitaron la búsqueda de genes R, dado que estos no se expresaron ni modificaron su expresión en magnitudes importantes. Solo aceptando valores de Fold change mayores o iguales a 1 se pudo detectar genes R potencialmente implicados en la resistencia. Sus niveles de expresión fueron muy bajos, y en algunos casos no alcanzaron un valor significativo. Estos resultados corroboran las afirmaciones de Hammond-Kosack et al. (1997) y Hulbert et al. (2001), quienes sostienen que los genes R se expresan constitutivamente a niveles muy bajos, tanto antes de la aparición del patógeno como durante la infección. Esto quiere decir que los genes R funcionan en la planta como un sistema de alerta permanente ante

cualquier patógeno que desea invadir. Incluso no sería necesario que estos genes R se sobre-expresen para activar la resistencia contra el patógeno Lozano et al. (2015).

En base a los criterios más estrictos, 91 genes se expresaron de manera opuesta entre la variedad María Huanca (resistente) y Chimbina Colorada (susceptible). Se consideró en este grupo a los genes en común de ambas variedades que se sobre-expresaron en la variedad María Huanca y se inhibieron o no se expresaron en la variedad Chimbina Colorada, y viceversa. Estos vendrían a ser los genes que modularon su expresión, a los que se sumaron 9 genes R detectados bajo los criterios menos estrictos ya señalados. La mayoría de los genes están implicados en la primera línea de defensa que posee la planta frente a patógenos: enzimas y proteínas relacionadas a la formación de la pared celular, rutas metabólicas de hormonas vegetales y péptidos señales (Swiecicka et al., 2009). También se destaca la presencia de proteínas y factores de transcripción que participan en cascadas de señalización involucradas en la expresión de los genes de defensa y los genes R.

Dentro de los genes usualmente relacionados a la resistencia de patógenos se encuentra COL domain class transcription factor, factor de transcripción que participa en la activación de síntesis de etileno y promueve el incremento de los niveles de poliaminas y ácido abscísico. La acumulación de etileno en la planta está relacionada a la respuesta frente a los ataques de herbívoros, patógenos necrotróficos (hongos, oomycetos), insectos y lesiones ocasionadas por estos patógenos. El aumento de etileno activa a su vez la síntesis de jasmonato y otros genes de defensa (Lorenzo et al., 2005; Diaz, 2012; Ramírez, 2012). Sin embargo, el etileno promueve también la proliferación y crecimiento de las raíces, y al hacerlo incrementa los potenciales puntos de ingreso de los nematodos. Por ello, la sobre-expresión del gen COL domain class transcription factor observada en la variedad María Huanca en respuesta al

ingreso del nematodo no sería, en principio, congruente con la resistencia mostrada por esta variedad de papa. Este cambio de expresión debiera verificarse por PCR cuantitativo para descartar algún artefacto en la estimación de la expresión del gen por RNA- Seq.

El gen que codifica a las UDP-Glycosiltransferase está relacionado con la biosíntesis de carbohidratos y la síntesis de la pared celular (Schaff et al., 2007). Una concentración alta de Glicosiltransferasas en la planta confiere resistencia al patógeno, tal como se reporta en las investigaciones de Bagnaresi et al. (2013) y Yu et al. (2015) sobre las interacciones de *Solanum torvum* (solanácea) y *Meloidogyne incognita* (nematodo), y *Boehmeria nivea* (urticácea) y *Pratylenchus coffeae* (nematodo). De la misma forma, se encontró un incremento de la expresión de este gen en la variedad María Huanca, asociándose a la resistencia detectada a las 72 horas pos inoculación de J₂ de *G. pallida*.

A nivel de pared celular, la planta realiza ciertos cambios estructurales para impedir el ingreso de agentes bióticos. El gen leucine-rich repeat extensin (LRX) codifica una proteína extracelular que se encuentra anclada o unida a la pared celular, y es importante en la formación de ésta, por lo que se le considera involucrada en la defensa contra patógenos (Draeger et al., 2015). Este gen se sobre-expresó en la variedad María Huanca y contribuiría a la resistencia desplegada. En el caso del gen pectinasterase se observó una ligera sobre-expresión en la variedad susceptible Chimbina Colorada, sin embargo, no alcanzó un valor de significancia en el cambio de expresión. Pero al analizar la expresión de dicho gen en la variedad resistente a *G. pallida* (María Huanca), se observó una disminución en su expresión, que probablemente atenúe la degradación de la pared celular a nivel de raíz al reducir la conversión de pectina a pectato y permitir que se mantenga la estructura física de la pared celular como barrera para el ingreso de J₂ de *G. pallida*. Estos eventos de expresión de dicho gen contrastan con lo

encontrado por Uehara et al. (2007), quienes reportaron una alta expresión de este gen en la variedad de tomate susceptible a *G. rostochiensis*. Es muy probable que la respuesta en la expresión de este gen dependa de la especie de nemátodo y el hospedero.

Una confirmación de la presencia de rutas metabólicas relacionadas a la defensa contra *G. pallida* en la variedad María Huanca es la expresión del gen Protein kinase que es un componente central en la cascada de fosforilación de proteínas de traducción de señales extracelulares. Es probable que la inducción de la expresión de algunas proteínas quinasas como la detectada en el presente estudio explique que ciertos genes, que codifican proteínas involucradas en reconocimiento de patógenos, fueran expresados en mayor nivel en la variedad María Huanca; tal es el caso de los genes leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, LRR receptor serine threonine protein kinase, Late blight resistance protein y TMV resistance protein N. Las dos primeras enzimas participan en el reconocimiento extracelular, y mediante su dominio quinasa (intracelular), activan rutas de señalización para regular la expresión de genes relacionados a la defensa. En cuanto a las dos últimas proteínas, si bien están relacionadas al reconocimiento y a la resistencia a *Phytophthora infestans* y al virus del mosaico del tabaco (TMV), respectivamente, fueron expresadas en la variedad María Huanca ante la invasión por J₂ de *G. pallida*. La inducción de la expresión de estos dos genes podría confirmar la afirmación de Gururani et al. (2012) en el sentido que, si bien la función de un gen de resistencia depende del genotipo del patógeno, algunos de ellos confieren resistencia contra una gama amplia de potenciales invasores. Otra posible explicación es que la planta podría entrar en un estado de alerta generalizada en respuesta al contacto con los J₂ de *G. pallida*, induciéndose la expresión de genes que favorecen las respuestas de defensa contra distintos patógenos.

En el análisis de la expresión de genes en la variedad María Huanca, se observa también la disminución de la expresión de ciertos genes que se asocian a resistencia contra herbívoros y patógenos necrotróficos por su relación directa con la producción de etileno. Tal es el caso de los genes 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) y ERF transcription factor (Bouaziz, 2015; Muller et al., 2015). La enzima 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) pertenece al grupo de proteínas involucradas en la ruta de producción de etileno. Como señala Puthoff et al. (2007), los precursores de etileno: 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) y 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) incrementan sus niveles en especies de soya susceptibles al nematodo *Heterodera glycines*. La proliferación de pelos radiculares y el crecimiento de la raíz propiamente dicha, promovidos por la acumulación de etileno, incrementan la probabilidad de penetración de nematodos en las zonas de elongación (Chen et al., 2008; Tucker, 2009; Puthoff et al., 2007). En el caso de la respuesta de la variedad resistente María Huanca frente a los J₂ de *G. pallida* a las 72 horas pos inoculación, se observó la disminución de la expresión 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO), sugiriendo que la inhibición del crecimiento radicular de la planta por una baja en la concentración de etileno sería una estrategia de defensa frente al estadio J₂ de *G. pallida*. Este resultado contrasta con lo encontrado respecto de la expresión de COL domain transcription factor, la cual aumentó en la variedad resistente.

En cuanto al gen ERF transcription factor, este también disminuyó en su expresión a las 72 horas pos inoculación con J₂ de *G. pallida* en la variedad María Huanca. Este factor de transcripción media la adaptación de la planta frente a un estrés abiótico y/o biótico al inducirse su expresión por la presencia de ácido jasmónico y etileno (Lorenzo et al., 2003; Müller & Munné-Bosch, 2015). Por lo expuesto en el párrafo anterior, la disminución de la expresión

por parte del gen ERF transcription factor se debería a la baja acumulación de etileno como estrategia de defensa en la variedad María Huanca.

Otros genes que disminuyeron su expresión en la variedad María Huanca fueron los correspondientes a Flavanone 3 beta-hydroxylase y Pyruvate decarboxylase. Da (2013) reportó la acumulación de flavonoides en los tejidos de raíces de variedades de tomate y papa resistentes a *G. rostochiensis*. Esta acumulación se debió a la sobreexpresión de la enzima Flavanone 3 beta-hydroxylase durante la formación de los sincitos, a los 14 días pos inoculación. Los flavonoides son precursores de la lignina, un componente de la pared celular que contribuye en la formación de una barrera física contra el nematodo (Jones et al., 2007). En la presente investigación se observó que la expresión del gen que codifica a la Flavanone 3 beta-hydroxylase se redujo. Es probable que esta disminución de la expresión se deba a la no formación del sincito, puesto que la toma de muestra se realizó a las 72 horas (3 días) pos inoculación, cuando aún no hay formación de dicha estructura. En cuanto a la Pyruvate descarboxilase, la expresión del gen que codifica esta enzima fue analizada por Uehara et al. (2010) en plantas de tomate resistentes a *G. rostochiensis*. Esta enzima cataliza la descarboxilación de piruvato a acetaldehído y CO₂ durante las primeras etapas de la fermentación etanólica. El incremento de la expresión fue determinado a los 3 días pos inoculación, junto a la expresión de la fenilalanina amonio liasa (PAL), MyB y la alcohol deshidrogenasa. A diferencia de aquel estudio, el nivel de transcripción cayó a las 72 horas pos inoculación de J₂ de *G. pallida* en la variedad María Huanca. Es probable que el uso de un hospedero distinto (papa *versus* tomate) y la diferencia entre especies del género *Globodera* expliquen esta discrepancia en la expresión del gen Pyruvate descarboxilase. Otro factor que podría haber influido es la cantidad de J₂ del nematodo inoculada por planta: Uehara et al. (2010) inocularon 1000 J₂ por planta mientras que en la presente investigación se colocaron

solo 100 J₂ por planta. Así mismo debiera considerarse el crecimiento de las plantas, dado que Uehara et al. (2010) inocularon plantas de tomate de 28 días de germinación, mientras que las plantas de la variedad María Huanca utilizadas en esta investigación fueron inoculadas a las 3 semanas de periodo vegetativo en sistema aeropónico, es decir, 56 días después de producida la germinación.

El análisis por RNA-Seq permitió mapear por completo el genoma de referencia y ver qué genes se encontraron modulados diferencialmente en su expresión en respuesta a la invasión por J₂ de *G. pallida*. Dichos genes (Tablas 13 y 14) difieren en su mayoría de los genes y marcadores moleculares de resistencia al género *Globodera* reportados a la fecha (Tabla 4), por lo que resultan novedosos y revelan la importancia y utilidad de realizar estudios con el germoplasma de papa peruano. De los genes incluidos en la Tabla 4, Gpa2 fue el único detectado en el análisis por RNA-Seq, y se encontró tanto en la variedad de papa resistente (María Huanca) como en la susceptible (Chimbina Colorada). Sin embargo, ninguna de las variedades modificó sus niveles de expresión en respuesta a *G. pallida* de modo de alcanzar los valores de significancia y Fold change mínimos establecidos en nuestro estudio para considerarlo en las Tablas 13 y 14. Aún así, si se tiene en cuenta que los genes de resistencia se expresan constitutivamente y que Gpa2 confiere resistencia específica a *G. pallida*, resulta extraño que el gen haya sido detectado también en la variedad susceptible. Por ello sería de interés en futuras investigaciones realizar el secuenciamiento de Gpa2 en ambas variedades de papa para determinar si el gen presenta polimorfismos que afecten su funcionalidad.

Es destacable la cantidad de genes comunes a ambas variedades que se regulan diferencialmente en la variedad resistente María Huanca en el tiempo de 72 horas pos inoculación analizado, y si bien la variedad susceptible Chimbina Colorada posee también la

habilidad de expresar estos genes, no logra ajustar su expresión en la magnitud suficiente para adquirir la resistencia. A ello debe agregarse que en los genes en los que no se ha observado una regulación diferencial, los cambios transcripcionales en la variedad Chimbina Colorada podrían ocurrir con un retraso respecto de la variedad María Huanca, lo que no habría sido detectado por haberse evaluado solo un tiempo pos inoculación (72 horas). Cabe recalcar que los cambios de expresión observados podrían responder a mecanismos regulatorios dependientes de genes particulares de cada variedad y a mecanismos de regulación pos transcripcionales, entre ellos los que involucran micro ARNs.

En términos generales, los cambios de expresión genética en respuesta a la invasión por J_2 de *G. pallida* reportados en la presente investigación deben ser validados, verificándolos a través de ensayos de PCR en tiempo real. Posterior a ello, y en la medida que las expresiones de los genes sean confirmadas, se podrán aplicar métodos de transformación genética de plantas, realizar ensayos a nivel de campo e iniciar la búsqueda de estos genes en otras variedades de papa. Debe señalarse que el estudio realizado ha permitido identificar regiones del genoma de papa que estarían modulando su expresión frente a la invasión de J_2 de *G. pallida*. Dichas regiones específicas, que corresponden a los genes reportados, se señalan en la columna “Locus” de las Tablas 13 y 14. Sin embargo, al no haberse evaluado si los genes corresponden a proteínas que se presentan como una única isoforma o como isoformas múltiples, se sugiere realizar investigaciones empleando los perfiles de los modelos ocultos de Markov o HMM (Hidden Markov Model, por sus siglas en inglés) para cada gen reportado. En aquellos casos en los que se verifique que los genes sean de copia única, se tendrá una mayor certeza sobre su efecto en la resistencia.

Entre los genes que fueron modulados diferencialmente en su expresión en la variedad de papa resistente a *G. pallida*, los que codifican la UDP-GLucosyltransferase, pectinasterase y 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) son los que a nuestro criterio ofrecen un mayor potencial y deberían ser estudiados en mayor detalle en investigaciones futuras. Esta sugerencia se debe, en el caso de la UDP-GLucosyltransferase, porque esta es la primera vez que se reporta su implicancia en la resistencia a *Globodera pallida*; en el caso de la pectinasterease, porque la disminución de su expresión a las 72 horas pos inoculación con J₂ podría estar involucrada en el mantenimiento de la pared celular como una barrera física al nematodo; y en el caso de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO), por su implicancia en la disminución de la concentración de etileno como posible estrategia de defensa.

VI. CONCLUSIONES

- Los Juveniles 2 (J₂) de *Globodera pallida* modulan diferencialmente la expresión de genes a nivel de raíz en la variedad mejorada resistente María Huanca y la variedad susceptible Chimbina Colorada.
- Se han identificado 100 genes regulados diferencialmente en respuesta a la infección por *Globodera pallida* entre la variedad mejorada resistente María Huanca y la variedad susceptible Chimbina Colorada.
- Existieron diferencias significativas ($p=0,006$) en la cantidad de juveniles 2 encontrados en raíces de los tratamientos a las 72 horas post - inoculación de las variedades María Huanca y la variedad susceptible Chimbina Colorada.
- La presencia de genes relacionados a la defensa en el tratamiento a las 72 horas, indican que la variedad María Huanca ejerció resistencia a la infección de juveniles 2 de *Globodera pallida*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asano, K., Kobayashi, A., Tsuda, S., Nishinaka, M., & Tamiya, S. (2012). DNA marker-assisted evaluation of potato genotypes for potential resistance to potato cyst nematode pathotypes not yet invading into Japan. *Breeding Science*, 62(2), 142–150.
2. Bai, J., Pennill, L. a, Ning, J., Lee, S. W., Ramalingam, J., Webb, C. a, ... Hulbert, S. H. (2002). Diversity in Nucleotide Binding Site – Leucine-Rich Repeat Genes in Cereals Diversity in Nucleotide Binding Site – Leucine-Rich Repeat Genes in Cereals, 1871–1884.
3. Bagnaresi, P., Sala, T., Irdani, T., Scotto, C., Lamontanara, A., Beretta, M., ... Sabatini, E. (2013). *Solanum torvum* responses to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *BMC Genomics*, 14(1), 1.
4. Bates C. (2000). The nematode nemesis of potato: research and diagnosis of *Globodera pallida*. University of Idaho.
5. Belkhadir Y. et al. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol* 7: 391-9.
6. Borba N. (2008). La Papa: Un alimento Básico. Uruguay: RAP-AL.
7. Bouaziz, D., Charfeddine, M., Jbir, R., & Najib, M. (2015). Identification and functional characterization of ten AP2 / ERF genes in potato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*.
8. Bouzo C. (2009). El cultivo de papa en Argentina. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
9. Broekaert W. et al. (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*. Vol 44 (pg. 393-416).
10. Bulman SR, Marshall JW. (1997). Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 25, 123-129.
11. Canto-Saenz. M, Scurrah M. (1977). Races of the potato cyst nematode in the Andean region and a new system of classification. *Nematologica* 23, 340-349.
12. Caromel, B., Mugniéry, D., Kerlan, M., Andrzejewski, S., Palloix, A., Ellissèche, D., ... Lefebvre, V. (2005). Resistance Quantitative Trait Loci Originating from *Solanum sparsipilum* Act Independently on the Sex Ratio of *Globodera pallida* and Together for Developing a Necrotic Reaction, 18(11), 1186–1194.
13. Cartaya, E. O. (2008). El nematodo quiste de la papa. I: Origen, diseminación, biología e importancia económica. *Iniahoy*, 4-15.
14. Castelli, L., Bryan, G., Blok, V. G., Ramsay, G., Sobczak, M., Gillespie, T., & Phillips, M. S. (2006). Investigations of *Globodera pallida* invasion and syncytia formation within roots of the susceptible potato cultivar Desiree and resistant species *Solanum canasense*. *Nematology*, 8(1), 103–110.
15. CENAGRO (2012). IV Censo Nacional Agropecuario. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Ministerio de Agricultura y Riego.
16. Centro Internacional de la Papa (CIP) (1996). Principales Enfermedades, Nematodos e insectos de la Papa. Lima – Perú: Asociación Editorial Stella.
17. Chávez R. (2004) Sobre el origen, evolución y diversidad genética de la papa cultivada y la silvestre. *Ciencia y desarrollo*.
18. Chávez P. (2008). La Papa: Tesoro de los Andes. Lima – Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP). Fundación Cátedra Iberoamericana.
19. Chauvin, L., Caromel, B., Kerlan, M., Fournet, S., Chauvin, J.-éric, Grenier, E., & Ellissèche, D. (2008). La lutte contre les nématodes à kyste de la pomme de terre.

- Cahiers Agriculture*, 17(4), 368–374.
20. Chen, N., Goodwin, P. H., & Hsiang, T. (2003). The role of ethylene during the infection of *Nicotiana tabacum* by *Colletotrichum destructivum*, 54(392), 2449–2456.
 21. Chitwood B. et al. (1942) *Heterodera rostochiensis*, the golden nematode in New York state. *Plant Disease Reporter* 26: 390-391.
 22. Coyne, D. L., Nicol, J. M., & Claudius-Cole, B. (2007). *Practical plant nematology: A field and laboratory guide*.
 23. Cucás C. (2014). Fases Fenológicas del Cultivo (*Solanum tuberosum*). Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales. Universidad Politécnica Estatal del Carchi. Ecuador.
 24. Da, J. (2013). Analysis of tomato gene promoters activated in syncytia induced in tomato and potato hairy roots by *Globodera rostochiensis*, 557–569.
 25. Dao F. y González J. (1971). El nematodo dorado de la papa, *Heterodera rostochiensis* (Woll.) y su presencia en los Andes Venezolanos. *Agronomía Tropical* 21: 105-110.
 26. Delgado de la Flor R. et al. (1991). Distribución del nematodo quiste de la papa (*Globodera pallida*) en el departamento de Cusco, Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú.
 27. Devaux A. et al. (2010). El sector papa en la región andina: Diagnóstico y elementos para una visión estratégica (Bolivia, Ecuador y Perú). Centro internacional de la papa.
 28. Díaz G. (2011). Cátedra de Nematología. Chile: Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Carrera de Ingeniería Agronómica, Departamento de Sanidad Vegetal.
 29. Diaz L. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol 10. N°2 (257-267).
 30. Doktorgrades, E., & Achenbach, U. C. M. (2007). Identification and Characterization of Quantitative Trait Loci (QTL) for Resistance to the Cyst Nematode (*Globodera pallida*) in the Potato (*Solanum tuberosum*).
 31. Draeger, C., Fabrice, T. N., Gineau, E., Mouille, G., Kuhn, B. M., Moller, I., ... Ringli, C. (2015). *Arabidopsis* leucine-rich repeat extensin (LRX) proteins modify cell wall composition and influence plant growth. *BMC Plant Biology*, 1–11.
 32. Eguillor P. (2010) El Mercado de la papa 2009 - 2010. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias – Odepa. Ministerio de Agricultura. Santiago, Chile.
 33. Egúsqüiza B.R. (2000). La Papa: Producción, transformación y comercialización. Perú: Proyecto Papa Andina (CIP-COSUDE).
 34. Ellenby, C. (1952). Resistance to the Potato Root Eelworm, *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Nature*.
 35. Ellis, J., Dodds, P., & Pryor, T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 278–284.
 36. Esquivel A. (2009) Nemátodos como agentes patógenos. Universidad Nacional de Costa Rica, Costa Rica.
 37. Estrada R. (2000). La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa. PROINPA/CIA/CIP. Bolivia.
 38. Evans K. et al (1977). A review of the distribution and biology of the potato cyst-nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*. *Pans*, 23: 178-189.
 39. Fonseca C. (2014) Catálogo de variedades de papa nativa. Centro internacional de la papa (CIP).
 40. Fullaondo A. (1999). Caracterización Genética del Nematodo del Quiste de la Patata *Globodera pallida* y *Globodera rostochiensis*. España: Universidad del País Vasco.
 41. Franco J. (1981). Nemátodos del Quiste de la papa *Globodera spp*. Centro Internacional de la Papa CIP. Lima, Perú.

42. Franco J. (1986). Nemátodos del Quiste de la Papa *Globodera pallida*. Centro Internacional de la Papa CIP. Lima, Perú.
43. Franco J. (1994). Problemas de nematodos en la producción de papa en climas templados en la región andina. *Nematropica* 24:179-195.
44. Franco J. (2008). Manejo integrado de los nematodos de la Papa. Fundación PROINPA. XXIII Congreso de la ALAP. Mar del Plata, Argentina.
45. Franco J. (2010). El Nemátodo Quiste de la Papa *Globodera spp*, en Bolivia y Perú. PROINPA – Cochabamba. XXIV Congreso de la asociación Latinoamericana de la Papa. Cusco-Perú.
46. Franco J. et al. (2011). Pérdidas causadas por el nematodo Quiste de la papa (*Globodera sp.*) en Bolivia y Perú. *Revista Latinoamericana de la Papa*. Fundación PROINPA.
47. García Pineda, E., & Lozoja Gloria, E. (2004). Genes de Resistencia a Enfermedades en Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(3), 414–422.
48. Glazer I. et al. (1985) Effect of inhibitors and stimulators of ethylene production on gall development in *Meloidogyne javanica*-infected tomato roots. *Journal of Nematology*. Vol 17 (pa. 145-149).
49. González A. (1993). Técnicas y Métodos para el Nematodo Quiste de la Papa *Globodera spp*. Centro Internacional de la Papa. Cochabamba – Bolivia: Programa de Investigación de la Papa (PROINPA).
50. González A. et al. (1997). Los nematodos en la producción de semilla de papa. Producción de Tubérculos y semillas de papa - Manual de Capacitación. Lima – Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP).
51. Greco N. y Crozzoli R. (1995). Nematodos del quiste de la papa, *Globodera rostochiensis* y *G. pallida*: aspectos generales. *Fitopatol. Venez.* 8: 26-33.
52. Guile C. (1970) Further observations on cyst color changes in potato cyst worm pathotypes. *Plant Pathology* 19, 1-6.
53. Gururani, M. A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C. P., Nookaraju, A., Pandey, S. K., & Park, S. W. (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, 51–65.
54. Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. G. (1997). Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol*, 48, 575–607.
55. Heungens, K., Mucniéry, D., Montacu, M. V. A. N., Gheysen, G., & Niebel, A. (1996). *Globodera* infective juveniles directly from cysts, 19(1), 91–93.
56. Hulbert SH, Webb CA, Smith SM and Sun Q (2001). Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 285-312.
57. Humphreys D. (2006). Evaluación de algunas modificaciones a los métodos de extracción de quistes en un suelo franco-arcilloso infestado con *Globodera pallida* (Stone 1973). Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología. Informe Trabajo Final de Graduación. Cartago, Costa Rica.
58. INIA. (2012). Catálogo de nuevas variedades de papa. Red Latinpapa. Instituto Nacional de Innovación Agraria.
59. Jiménez A. (1999). Interacción *Globodera* y *Verticillium* en la incidencia de la marchites o wilt de la papa [Tesis para optar el grado de Ingeniero Agrónomo]. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco – Perú.
60. Jolivet, K., Grenier, E., Bouchet, J., Esquibet, M., Kerlan, M., Caromel, B., & Mugnie, D. (2007). NOTE / NOTE Identification of plant genes regulated in resistant potato *Solanum sparsipilum* during the early stages of infection by *Globodera pallida*, 427, 422–427.
61. Jones S.(1988). Sistemática vegetal. 2 ed. México. McGraw Hill 536 p.

62. Jones, J. T. J., Urlanetto, C. F., Hillips, M. S. P., Estadual, U., Marechal, C. De, Rondon, C., & Ciencias, C. De. (2007). The role of flavonoids produced in response to cyst nematode infection of *Arabidopsis thaliana*, 9(5), 671–677.
63. Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Perry, R. N. (2013). Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946–961.
64. Kleyhans, K. P. N. (1999). *Collecting and Preserving Nematodes. A Safrinet Manual for Nematology*.
65. Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., & Salzberg, S. L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome, 10(3).
66. Llontop J. et al. (1989). María Huanca, nueva variedad de papa resistente al nematodo de quiste de la papa (*Globodera pallida*). Centro Internacional de la Papa. Revista Latinoamericana de la Papa 2:77-89. Lima, Perú.
67. López M. (2013). Evaluación de genes de resistencia a virus y nemátodos mediante marcadores moleculares en *Solanum tuberosum ssp. tuberosum* del Banco de Germoplasma de papas de la Universidad Austral de Chile. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile.
68. Lorenzo O. et al. (2005). Señalización de ácido jasmónico e interacciones con otras hormonas. *Biojournal.net* 1:1-16.
69. Lozano, R., Ponce, O., Ramírez, M., Mostajo, N., & Orjeda, G. (2012). Genome-Wide Identification and Mapping of NBS- Encoding Resistance Genes in *Solanum tuberosum* Group Phureja, 7(4).
70. Lozano, R., Hamblin, M. T., Prochnik, S., & Jannink, J. (2015). Identification and distribution of the NBS-LRR gene family in the Cassava genome., 1–14.
71. Mancuso S. et al. (2005). Noninvasive and continuous recordemos of auxin fluxes in intact root apex with a carbon nanotube-modified and self-refereing microelectrode. *Analytical Biochemistry*. 341, 344-352.
72. Marone, D., Russo, M. A., Laidò, G., De Leonardis, A. M., & Mastrangelo, A. M. (2013). Plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes: Active guardians in host defense responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7302–7326.
73. Mazarei, M., Liu, W., Areli, P. R., Pantalone, V. R., & Jr, C. N. S. (2011). Gene expression pro W ling of resistant and susceptible soybean lines infected with soybean cyst nematode, 1193–1206.
74. Melillo, M. T., Bleve-zacheo, T., & Zacheo, G. (1990). Ultrastructural response of potato roots susceptible to cyst nematode *Globodera pallida* pathotype Pa 3.
75. Mendoza, H. a. (2008). “Genética Cuantitativa y Mejoramiento de Papas Autotetraploides.”
76. Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W., & Young, N. D. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal*, 20(3), 317–332.
77. Morales S. (2011). Crecimiento, contenido de azúcares y capacidad de brotación en en semilla tubérculo de papa (*Solanum tuberosum* L.). Tesis para el grado de Doctor en Ciencias en Horticultura. Instituto de Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
78. Mulder J. et al. (1996). Hatching agent for the potato cyst nematode. Patent:US5585505. Uggemann-Rotgans, I.E.M.B. United States.
79. Muller & Munné-Bosch (2015). Ethylene response factors: A key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiol. Sep*; 169(1): 32-41-

80. Ochoa C. Las Papas de Sudamérica: Perú. CIP. 1999.
81. Oepp, B. et al. (2013). PM 7/40 (3) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*, 43, 119–138.
82. Ortega E. (2008). El nematodo quiste de la papa. I: Origen, disseminación, biología e importancia económica. Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Mérida, Venezuela.
83. Pan, Q., Liu, Y. S., Budai-Hadrian, O., Sela, M., Carmel-Goren, L., Zamir, D., & Fluhr, R. (2000). Comparative genetics of nucleotide binding site-leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: Tomato and arabidopsis. *Genetics*, 155(1), 309–322.
84. Phillips, B. Y. M. S., Forrest, J. M. S., & Farrer, L. A. (1982). Invasion and development of juveniles of *Globodera pallida* in hybrids of *Solanum vernei* x *S. tuberosum*.
85. Proudfoot N., A. Furger., M. Dye. (2002). Integrating mRNA Processing with transcription. *Cell* 108: 501-512. England.
86. Puthoff DP, Ehrenfried ML, Vinyard BT, Tucker ML. (2007). Gene Chip profiling of transcriptional responses to soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, colonization of soybean roots. *Journal of Experimental Botany* 58, 3407–3418.
87. Ponce R. (2013). Caracterización molecular de las variedades de papas cultivadas (*Solanum spp*) más importantes del Perú mediante el uso de microsatélites. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas Tesis para optar Título profesional de Biólogo genetista biotecnólogo.
88. Ramirez M. (2012). Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrizica: una revisión. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Bogotá, Colombia.
89. Rivas E. (2005). Determinación de la presencia de nematodos de quiste asociados al cultivo de papa *Solanum tuberosum* L., en los municipios de Patzún y Zaragoza, Chimaltenango. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Agronomía. Instituto de investigaciones agronómicas. Tesis. Guatemala.
90. Román O. (1999). Identificación de especies y razas fisiológicas de *Globodera spp* en las zonas semilleros de papa de los distritos de Anta, Huarcocondo (Provincia de Anta) y Chinchero (Prov. Urubamba). Cusco – Perú.
91. Rouppe van der Voort J, Van der Vossen E, Bakker E, Overmars H, Van Zandvoort P, Hutten R, Klein-Lankhorst R, Bakker J (2000) Two additive QTLs conferring broad-spectrum resistance in potato to *Globodera pallida* are localized on resistance gene clusters. *Theor Appl Genet* 101:1122–1130
92. Ruano B.(1999). Evolución de las poblaciones de nematodos (*Globodera spp.*) en patata en Mallorca. Beca de Introducción al I.N.I.A. España: Consejería de Economía, Agricultura, Comercio e Industria.
93. Schaff, J.E.; Nielsen, D.M.; Smith, C.P.; Scholl, E.H.; Bird, D.M. (2007). Comprehensive transcriptome profiling in tomato reveals a role for glycosyltransferase in Mi-mediated nematode resistance. *Plant Physiol.*, 144, 1079–1092.
94. Schuler, M. A. (1996). The Role of Cytochrome P450 Monooxygenases in Plant-Insect Interactions, 1411–1419.
95. Siddiqi M. (2000). Tylenchida: Parasites of Plantas and Insects. Ed Siddiqi MR. CABI Publishing, Wallingford, Oxon (UK).
96. Smith I.M., McNamara D.G., Scott P.R., Holderness M. (1997). *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* Data Sheets on Quarantine Pests. Quarantine Pest for Europe. Second edition. United Kingdom: CAB International & EPPO.
97. Sobczak, M., Avrova, A., Jupowicz, J., Phillips, M. S., Ernst, K., & Kumar, A. (2005). Characterization of Susceptibility and Resistance Responses to Potato Cyst Nematode

- (*Globodera spp.*) Infection of Tomato Lines in the Absence and Presence of the Broad-Spectrum Nematode Resistance Hero Gene, *18*(2), 158–168.
98. Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. G., & Jones, J. D. G. (1992). Plant Disease Resistance W *Science*, *268*(6).
 99. Stone A. (1985) Co-evolution of potato cyst nematodes and their host: implication for pathotypes and resistance. *Bulletin of Organisation of European Plant Protection* *15*, 131-137.
 100. Stone A. (1973). *Heterodera pallida*. CIH. Description of plant parasitic nematodes, Set 2, N 17, CAB, Farnham Royal, UK. 2p.
 101. Storey, G. W., & Evans, K. (1984). *Globodera pallida*, (1960), 113–115.
 102. Swiecicka, M., Filipecki, M., Lont, D., Vliet, J. V. A. N., Qin, L., Goverse, A., ... Helder, J. (2009). Dynamics in the tomato root transcriptome on infection with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*, *10*, 487–500.
 103. Thorpe P. (2012). Bioinformatic and functional characterisation of *Globodera pallida* effector genes. Faculty of Biological Sciences. The university of Leeds. Leeds, England.
 104. Tucker, M. L., Xue, P., & Yang, R. (2009). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) concentration and ACC synthase expression in soybean roots, root tips , and soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) -infected roots, 1–10.
 105. Uehara, T., Sugiyama, A. S., Sage, G. A., & Tomato, A. (2007). Comparative serial analysis of gene expression of transcript profiles of tomato roots infected with cyst nematode, 185–194.
 106. Uehara, T., Sugiyama, S., Matsuura, H., Arie, T., & Masuta, C. (2010). Resistant and Susceptible Responses in Tomato to Cyst Nematode are Differentially Regulated by Salicylic Acid, *51*(9), 1524–1536.
 107. USDA-APHIS 2013. Program Update: Pale Cyst Nematode (*Globodera pallida*) Eradication Program - Idaho Falls, Idaho. 1st Quarter Report 2013.
 108. van't Slot, K. A. E., & Knogge, W. (2002). A dual role for microbial pathogen-derived effector proteins in plant disease and resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *21*(December 2013), 229–271.
 109. Venkatachalam R. et al. (2011). Introductory Nematology. Development of e-Courses for B-Sc (Agriculture)- Degree Program. Tamil Nadu Agricultural University. Tamil Nadu, India. (<http://eagri.tnau.ac.in/eagri50/PATH172/lec07.pdf>).
 110. Vilchez, M. N., Días, T. N., & Quiroz, C. A. (2013). Variedades De Papas Nativas Y Conocimientos campesinos, 20. Retrieved from http://www.agruco.org/bioandes/pdf/Peru/Catalogos/CATALOGO_PAPAS_cajamarca.pdf
 111. Vossen, E. A. G. Van Der, Voort, J. N. A. M. R. Van Der, Kanyuka, K., & Bendahmane, A. (2000). Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode, *23*.
 112. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky J, White TJ, eds. *PCR protocols. A guide to methods and applications*. San Diego, CA, USA: Academic Press, 315-322.
 113. Wille J. Segura C. (1952). *Heterodera rostochiensis*, una plaga de cultivo de las papas recién descubierta en el Perú. Boletín N° 48. Estación Experimental Agrícola La Molina. Lima, Perú.
 114. Williamson, V. M. (1999). Plant nematode resistance genes. *Curr Opin Plant Biol*, *2*(4), 327–331.

115. Williamson, V. M., & Kumar, A. (2006). Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in Genetics*, 22(7), 396–403.
116. Wubben M et al. (2001) Susceptibility to the sugar beet cyst nematode is modulated by ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe interactions*. Vol 14 (pg. 1206-1212).
117. Yen P. (2015). Plant-nematode interactions and the application of RNA interference for controlling root-knot nematodes. Washington State University. Department of Plant Pathology. Doctor of Philosophy. Washington, USA.
118. Yu, Y., Zeng, L., Yan, Z., Liu, T., Sun, K., Zhu, T., & Zhu, A. (2015). Identification of Ramie Genes in Response to *Pratylenchus coffeae* Infection Challenge by Digital Gene Expression Analysis, 21989–22007.
119. Zhang, H., Xie, X., Xu, Y., & Wu, N. (2004). Isolation and functional assessment of a tomato proteinase inhibitor II gene. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Société Française de Physiologie Végétale*, 42(5), 437–44.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Extracción de ADN a partir de quistes de *Globodera pallida*

1. Se colocó 20 quistes de *Globodera pallida* en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

2. Se agregó 50 ul de buffer de extracción (CTAB 2X, recientemente preparado y agregando 0.2% de β -mercaptoetanol).
3. Con ayuda de una punta de plástico se trituraron los quistes durante 2-5 minutos.
4. Se agregó al tubo 550 uL de buffer de extracción (CTAB 2X), tratando de limpiar todos los restos pegados en la punta de plástico. Luego, se mezcló bien los componentes con la ayuda de un vortex.
5. Se agregó 20 uL de proteinasa K (X ng/uL).
6. A continuación, se colocaron los tubos a 65°C durante 2 horas (invertir cada 15 minutos). Luego de las 2 horas se dejó enfriar a temperatura ambiente.
7. Después se agregó 600 uL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo. Se mezcló suavemente y se invirtieron los tubos (mínimo 10 veces).
8. Se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos.
9. Se transfirió la parte acuosa superior a un tubo nuevo de microcentrifuga de 2 ml.
10. Se agregó a cada tubo 50 ul de CTAB 10X. Se mezcló por inversión y se repitió los pasos 7 y 8.
11. Se transfirió la parte acuosa superior a un tubo de 1.5mL
12. Se agregó un volumen igual de isopropanol (500 ul) a cada tubo. Se invirtieron los tubos varias veces y se dejó a 4°C durante toda la noche.
13. Se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos y se descartó el sobrenadante.
14. Se lavó por inversión el pellet con 1 ml de etanol 80% por 1 minuto y se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos. Cuidadosamente se descartó el etanol.
15. Se lavó por inversión el pellet con 1 ml de etanol 90% por 1 minuto y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos. Cuidadosamente se descartó el etanol. Con ayuda de una pipeta se retiró el máximo de líquido posible, luego se dejó secar los tubos sobre un papel toalla.

16. Se re suspendió el pellet de ADN en 30 ul de TE.
17. Agregar 1.5uL de RNAsa (10mg/ml). Incubar a 37°C por 1 hora.

ANEXO 2. Desinfección de quistes de *Globodera pallida*

1. 20 quistes de *Globodera pallida* fueron refrigerados (4°C) durante 3 días.
2. Finalizado el proceso de refrigeración, se colocaron los quistes en el Aparato de Lavado (Jeringa Modificada).

3. Se aspiró 3ml aproximadamente de Etanol al 90% mediante la jeringa modificada.
Se lavó por inversión durante 15 segundos y expulsó el etanol absorbido.
4. Se aspiró 3ml aproximadamente de NaOCl al 1.3% mediante la jeringa modificada.
Se lavó por inversión durante 5 minutos. Se expulsó la solución de NaOCl al 1.3%.
5. Se aspiró 3ml aproximadamente de agua destilada estéril. Se lavó 3 veces por inversión en periodos de 2 minutos cada una.
6. Se dejó secar los quistes de *G. pallida* a temperatura de medio ambiente.

ANEXO N°3. Composición del medio de propagación Murashige & Skoog

Componentes	Cantidad
Medio basal Murashige & Skoog	4.3 g
Sucrosa	25 g
Phytigel o Agar	3.5 g
Volumen final (Agua destilada)	1 Litro

Ajustar el pH del medio a 5.6

ANEXO 4. Protocolo de coloración con Fucsina Ácida de nematodos en raíces

Este protocolo de coloración permite observar nematodos (coloreados en rosado) en las raíces.

1. Pre tratamiento de decoloración: Sumergir las raíces en una solución de NaOCl 2.1% durante 4 minutos o con H₂O₂ 30% durante 1 hora.

2. Enjuagar las raíces bajo el chorro de agua durante 30-45 segundos.
3. Dejar remojar las raíces en agua durante: 15 minutos.
4. Coloración: Preparar la solución de coloración con: 1ml de solución madre de Fucsina ácida (3,5 g Fucsina ácida + 250 ml Ácido acético + 750 ml H₂O) + 30 ml H₂O. Llevar a hervir la solución y sumergir en esta misma las raíces durante 1 minuto (se requiere realizar pruebas preliminares y ajustar el tiempo de coloración según el tipo de material – puede variar mucho de un tipo de raíz a otra).
5. Enjuagar las raíces bajo el chorro de agua durante 30-45 segundos.
6. Decoloración en una solución equiolumétrica (1:1:1) de Ácido láctico, Ácido acético, Agua durante 45 minutos a una temperatura de 45°C.
7. Se puede realizar las observaciones de las raíces enseguida o bien conservarlas en una solución de Glicerina acidificada con algunas gotas de HCL 5N (más o menos 5 gotas por 30 ml).
8. Observación de los nematodos:
9. En caso de raíces muy finas tipo Arroz o Arabidopsis se puede realizar directamente por transparencia con una lupa binocular.
10. En caso de raíces más gruesas o más lignificadas como las de café o tomate, se requiere aplastar las raíces entre láminas y observar bajo microscopio o una binocular. Con este último tipo de raíces solo se podrá realizar observaciones con las partes apicales de las raíces más finas.

ANEXO 5. Concentración de sales que conformaron la solución nutritiva empleado en el sistema aeropónico.

Sales	Concentración (gr/1lt agua)
-------	--------------------------------

Nitrato de Potasio	0.54
Nitrato de Amonio	0.38
Sulfato triple de Calcio	0.28
Sulfato de Magnesio	0.24
Fertilón Combi	0.012

ANEXO 6. EXTRACCIÓN DE ARN A PARTIR DE RAICES

1. Lisis de células.

- Romper el tejido con nitrógeno líquido.
- Colocar 1 ml de TRI REAGENT (Sigma T9424)
- Centrifugar la solución homogenizada a 12 000g por 10 minutos a 4°C para remover el material insoluble.
- Transferir el sobrenadante a un tubo de centrifuga y dejar a temperatura ambiente por

5 minutos.

2. Fase de separación

- Adicionar 0.2ml de cloroformo y mediante un shaker homogenizar por 15 segundos.
- Dejar la solución a temperatura ambiente por 10 minutos y centrifugar a 12 000g por 15 minutos a 4°C.
- Transferir la fase superior acuosa sin color (RNA) a un nuevo tubo eppendorf. (la interfase concierne al DNA y la parte inferior a las proteínas).

3. Precipitación de RNA

- Adicionar 500ul de isopropanol, mezclar y dejar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Centrifugar (12 000g, 10 min, 4°C) y lavar el pellet de RNA adicionando 1ml de Etanol al 75%. (Vortexear y centrifugar a 12 000, 5 min, 4°C)
- Enseguida dejar secar el pellet de RNA por 10 minutos.

4. Solubilización de RNA

- Adicionar 40ul de agua libre de nucleasa al pellet de RNA.

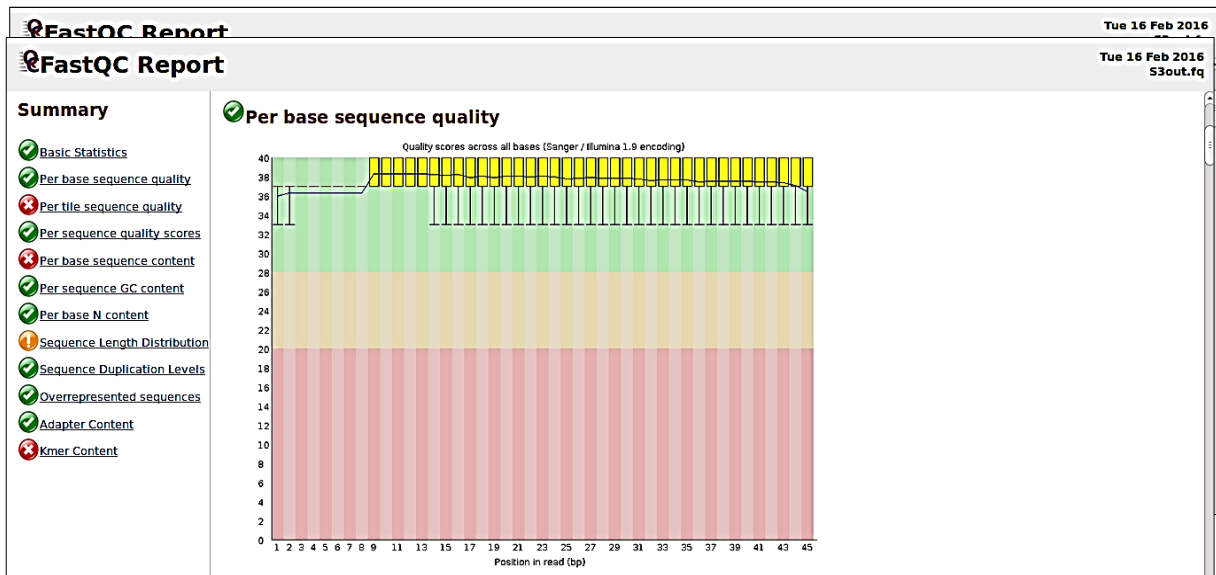
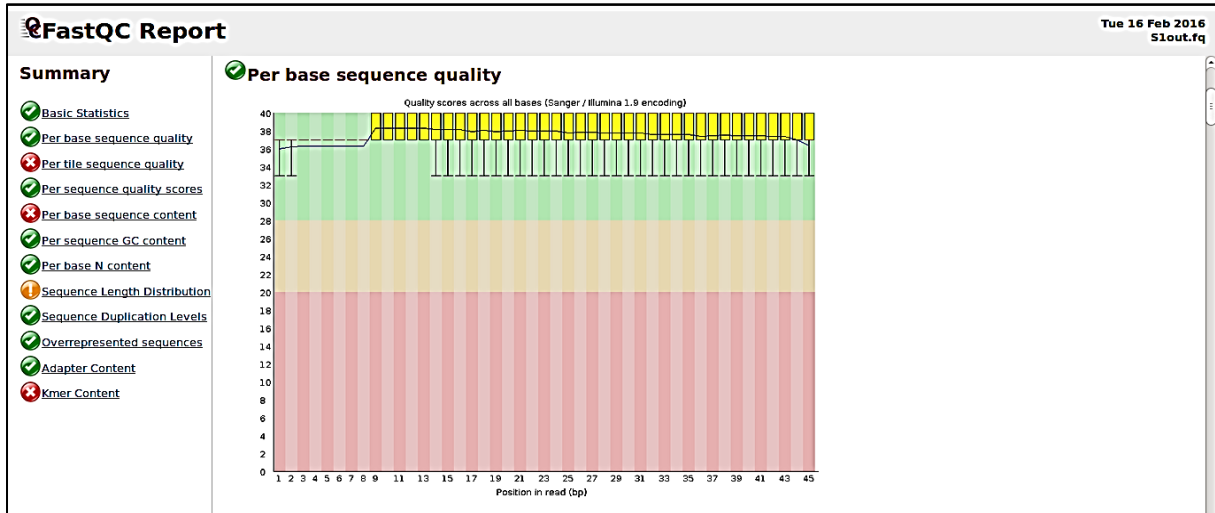
ANEXO 7. Instalación del diseño experimental



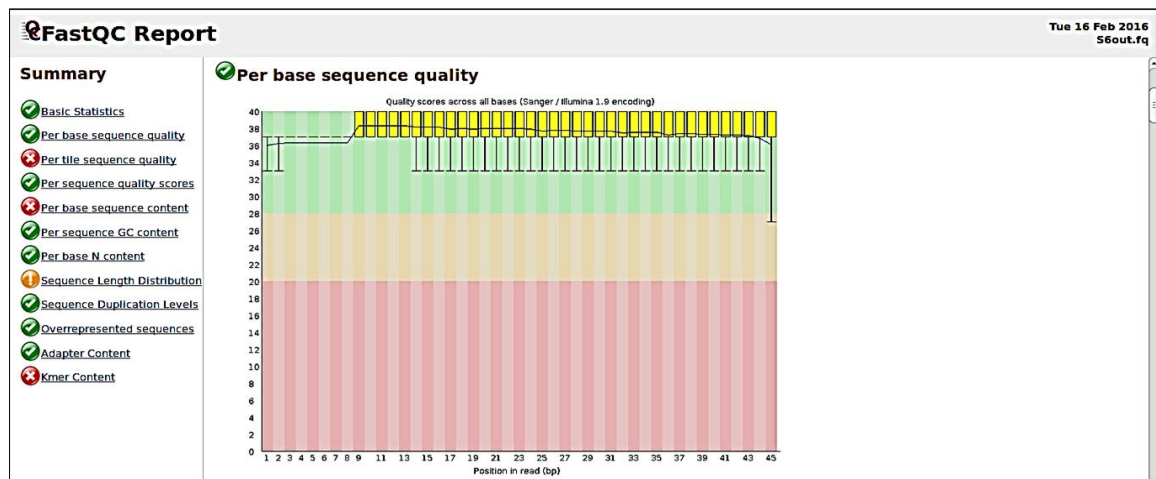
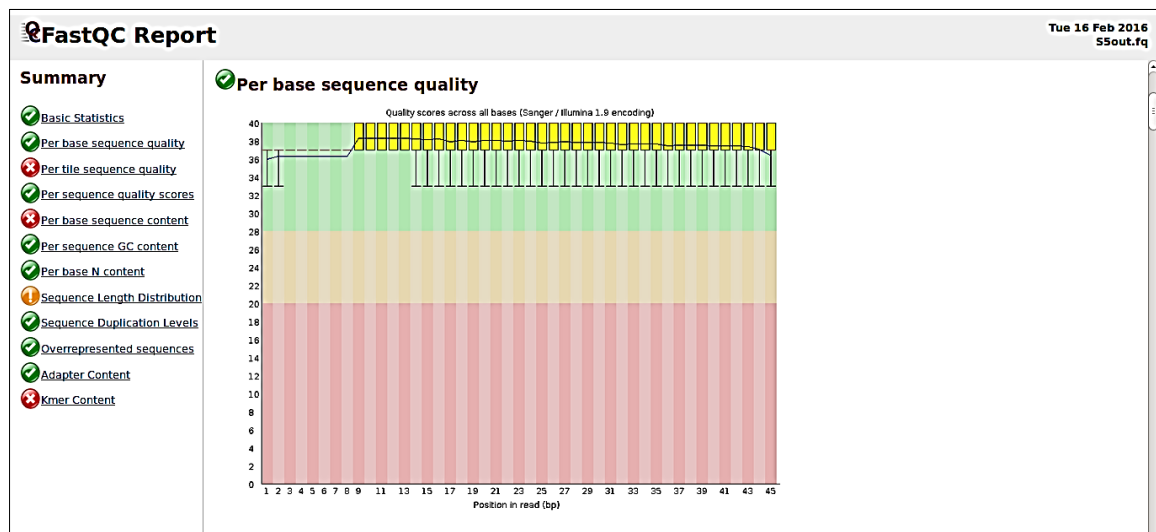
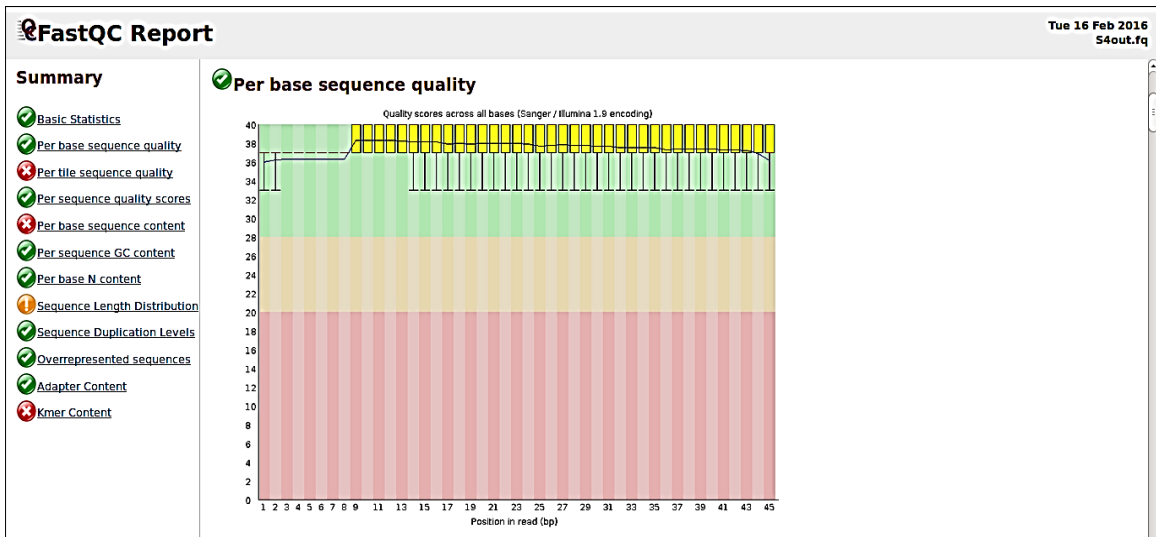
Leyenda: A. Plantas con 3 semanas de crecimiento en el Sistema Aeropónico. B. Instalación del diseño experimental. C. Unidad experimental.

ANEXO 8. Figuras del reporte del programa bioinformático FastQC, indicando las calidades de las secuencias de las 12 bibliotecas secuenciadas.

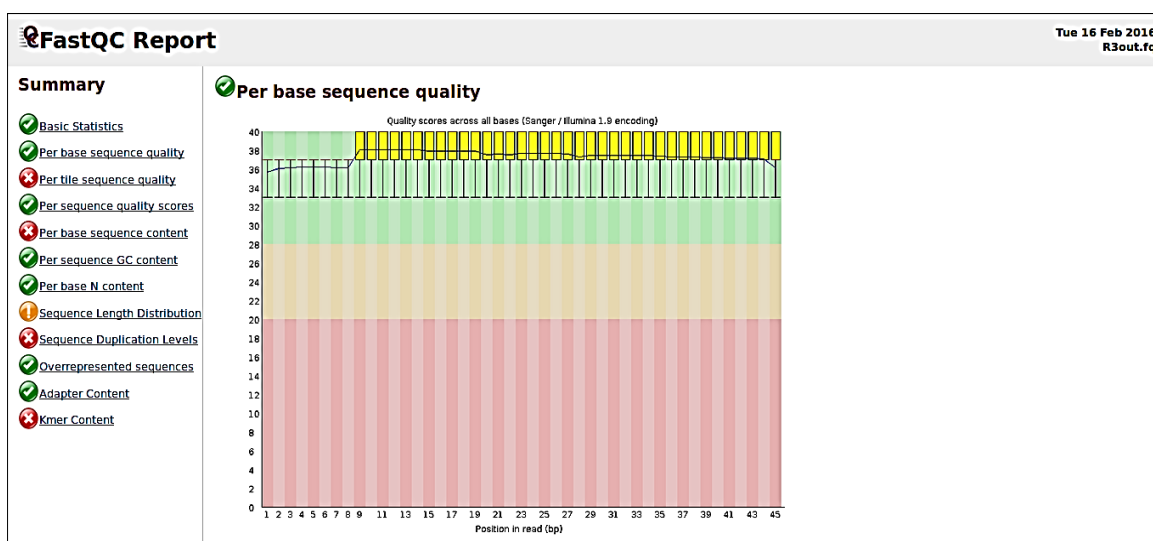
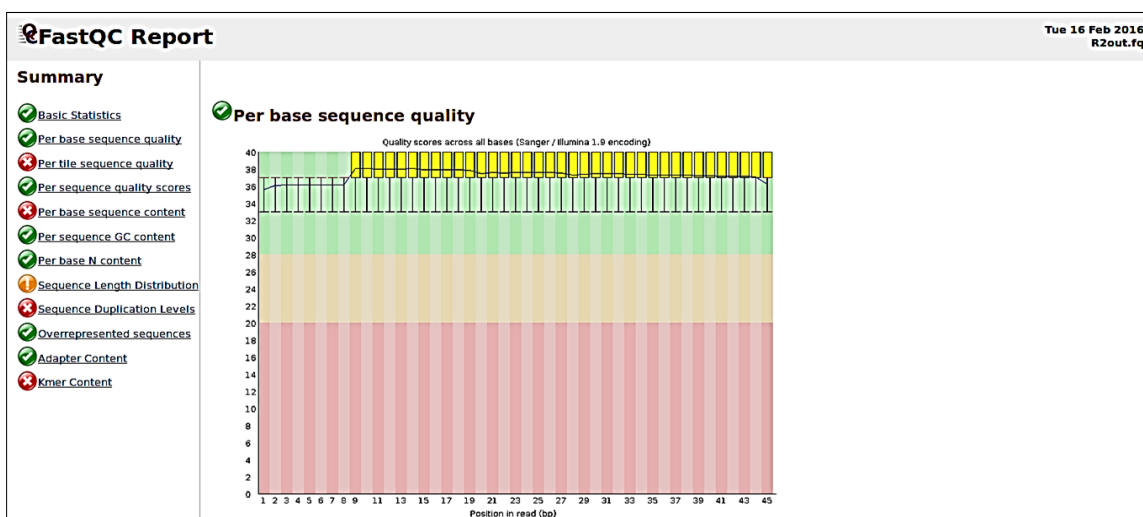
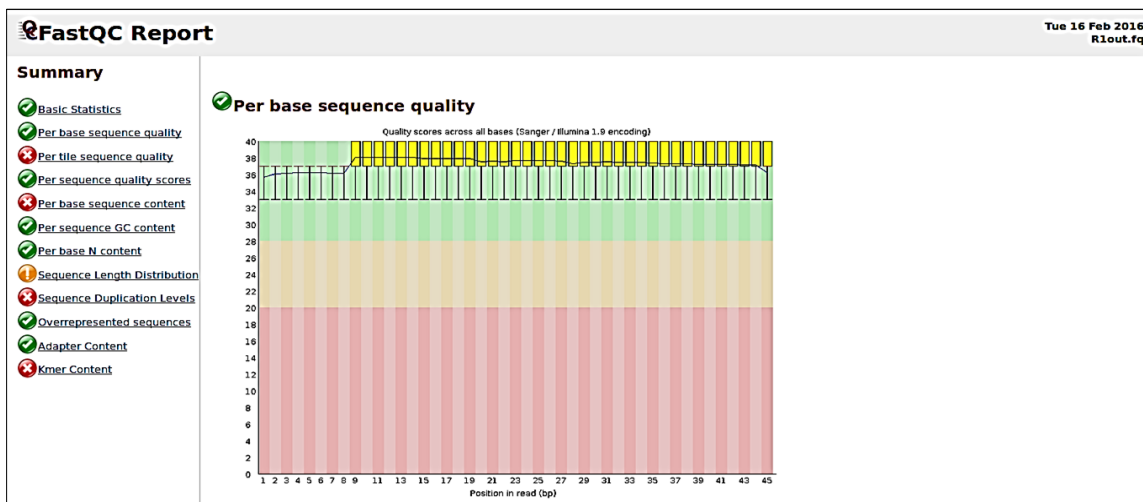
Calidades de las bibliotecas S1, S2, y S3 del tratamiento de control de la variedad Chimbina Colorada



Calidades de las bibliotecas S4, S5, y S6 del tratamiento de infección de la variedad Chimbina Colorada



**Calidades de las bibliotecas R1, R2, y R3 del tratamiento de control de la variedad
María Huanca**



Calidades de las bibliotecas R4, R5, y R6 del tratamiento de infección de la variedad María Huanca

