

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE GENES
CANDIDATOS DE DEFENSA EN LA INTERACCIÓN *Coffea arabica* –
ROYA DEL CAFETO**

FABIAN LEONARDO CARDENAS DIAZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA
2007**

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE GENES
CANDIDATOS DE DEFENSA EN LA INTERACCIÓN *Coffea arabica* –
ROYA DEL CAFETO**

FABIAN LEONARDO CARDENAS DIAZ

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Biólogo**

**Director:
ALVARO LEON GAITAN BUSTAMANTE Ph.D**

**Codirector:
JORGE HERNANDEZ TORRES Ph.D**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGIA
BUCARAMANGA
2007**

DEDICATORIA

A mis padres Hermes y Marina por su incondicionalidad, tenacidad, buenos consejos, quienes son mis mejores profesores y por mostrarme la vida de una manera maravillosa, a mi hermano Hebert por esfuerzo y disciplina en alcanzar los sueños y a Paola quien sin importar las cosas siempre lucha y le pone una buena cara a la vida.

Fabián Leonardo

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme por esta gran oportunidad y el valor de un gran reto.

A la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

Al Centro Nacional de Investigaciones del Café “Pedro Uribe Mejía”
CENICAFE.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

A Alvaro L. Gaitán B. Microbiólogo. Ph.D. Líder Disciplina de Fitopatología
CENICAFE, por sus conocimientos, paciencia, dedicación y consejos para el
correcto desarrollo del trabajo, quien me brindo la oportunidad de una bonita
tarea.

A Jorge Hernández, por su esfuerzo pude conocer la parte molecular de la
biología.

A mis compañeros de las Disciplinas de Fitopatología (Andrés Rodríguez,
Narmer Galeano, Carolina Escobar, Joana Misas), Entomología (Sandra
Idarraga, Javier Mantilla, Alejandra Sánchez, Lucio Navarro) y Bioinformática
(Fernando Rivera, Andrés Chalarca) por aportarme sus conocimientos.

A todas aquellas personas que de una u otra forma me brindaron su amistad
y compañía a lo largo de mi formación académica.

A la Biología por las grandes maravillas que por diminutas que sean siempre
nos sorprenden.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	14
OBJETIVOS	21
1. BUSQUEDA DE HOMOLOGÍA EN BASE DE DATOS	22
1.1 GENERALIDADES	22
1.1.1 Blast	23
1.1.2 GenomeWalker	24
1.2 MATERIALES Y METODOS	25
1.2.1 Localización	25
1.2.2 Material de Investigación	25
1.2.3 Material vegetal	26
1.2.4 Extracción de ADN Híbrido de Timor	26
1.2.5 Cuantificación de ADN	26
1.2.6 Diseño de cebadores	26
1.2.7 Construcción librerías GenomeWalker	28
1.2.8 Amplificaciones GenomeWalker	29
1.2.9 Clonación	29
1.2.10 Verificación de insertos	30
1.2.11 Extracción de plásmidos	31
1.2.12 Secuenciación	31
1.2.13 Análisis Bioinformático	31
1.3 RESULTADOS	33
1.3.1 Librerías y amplificaciones de GenomeWalker	33
1.3.2 Análisis de secuencias y estructuración de genes putativos	35
1.4 DISCUSIÓN	39
2. PRUEBAS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL RELATIVA	42
2.1 GENERALIDADES	42

2.1.1	La PCR de tiempo real	42
2.1.2	Agentes intercalantes	42
2.1.3	Ventajas de la PCR en tiempo real	43
2.2	MATERIALES Y METODOS	44
2.2.1	Localización	44
2.2.2	Material vegetal	45
2.2.3	Tratamientos de inoculación con <i>Hemileia vastatrix</i>	45
2.2.4	Extracción ARN	45
2.2.5	Cuantificación ARN y síntesis de primera cadena de cADN	45
2.2.6	Diseño de cebadores	46
2.2.7	Análisis de expresión por medio de PCR en tiempo real (qRT-PCR)	46
2.2.8	Adquisición de datos y análisis estadístico	47
2.3	RESULTADOS	48
2.3.1	Expresión de genes constitutivos	48
2.3.2	Especificidad de la amplificación	48
2.3.3	Análisis de expresión relativa diferencial	49
2.4	DISCUSIÓN	52
	CONCLUSIONES	54
	RECOMENDACIONES	55
	BIBLIOGRAFIA	56
	ANEXOS	61

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Cebadores GenomeWalker PCR 1.	28
Tabla 2 Cebadores GenomeWalker PCR 2 o PCR Anidada.	28
Tabla 3 Eficiencia GenomeWalker.	36
Tabla 4 Lista de las 15 unigenes comparados con blastx de GenBank.	38
Tabla 5. Búsqueda de dominios y motivos por medio de ScanMotifs en la base de datos de ProSita.	38
Tabla 6. Cebadores específicos para expresión diferencial relativa por gen.	46

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Esquema general de las amplificaciones por medio de GenomeWalker y búsqueda de homología en bases de datos.	25
Figura 2 Diseño de cebadores para GenomeWalker.	27
Figura 3 Repique de transformantes.	30
Figura 4 Digestión ADN genómico de café Híbrido de Timor.	33
Figura 5 Amplificaciones GenomeWalker librería 1.	34
Figura 6 Verificación de inserto por PCR de colonias.	35
Figura 7 Ensamble de Unigenes.	37
Figura 8 Esquema general de la metodología realizada para el análisis de expresión relativa.	44
Figura 9 Productos únicos obtenidos en la amplificación de los fragmentos de interés por el Tm en PCR de tiempo real.	48
Figura 10 Diferencia de C(t) para el gen 48H21 y 48H37.	49
Figura 11 Diagramas de expresión relativa en hojas entre tres réplicas de Híbrido de Timor y Caturra para los genes control de inducción .	50
Figura 12 Diagramas de expresión relativa en hojas entre tres réplicas de Híbrido de Timor y Caturra para los genes 48H21(contig 17_18) y 48H37 (contig 7_8) .	51

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A Agrupamientos por Tukey de los promedios de expresión de Ubiquitina en Caturra e Híbrido de Timor inoculados con <i>Hemileia vastatrix</i> .	61
Anexo B Ensamble de Unigenes.	62
Anexo C Nucleótidos de unigenes obtenidos.	63

ABREVIATURAS

aa	: Aminoácidos
Pb	: Pares de bases
PCR	: Reacción en Cadena de la Polimerasa
qRT-PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
C(t)	: Threshold cycle
Tm	: Temperatura de disociación
SSH	: Subtractive Supression Hibridization
Var	: Variedad
Kb	: Kilobases
gr	: gramos
mM	: milimolar
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
Rpm	: Revoluciones por minuto
Min	: Minutos
Mbar	: Milibares
BrEt	: Bromuro de Etidio
dNTP`s	: Deoxynucleosidos
EST	: Expressed Sequence Tags
HdT	: Híbrido de Timor
ul	: Microlitro
g	: Gravedad

RESUMEN

TITULO

CARACTERIZACION ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE GENES CANDIDATOS DE DEFENSA EN LA INTERACCION *C. arabica*– ROYA DEL CAFETO*

Autor: CARDENAS DIAZ, Fabián Leonardo**

Palabras Claves: *Coffea arabica*, *Hemileia vastatrix*, qRT-PCR, GenomeWalker, Expresión relativa, Defensa.

Diez fragmentos entre 110 y 600 pb, generados a partir de librerías sustractivas de hoja de *Coffea arabica* inducidas con la roya del café (*Hemileia vastatrix*) 24 horas pos-inoculación, fueron utilizados para caracterizar estructuralmente las secuencias aledañas 5' y 3' mediante la técnica de GenomeWalker. Con una tasa de extensión promedio de 3,5 bases nuevas por cada base conocida, se obtuvieron 15 unigenes con longitudes que variaron entre 510 y 2900 pb. Sólo tres unigenes presentaron homología con secuencias reportadas en GenBank: un retrotransposon, una proteína rica en Glicina y una proteína de función desconocida de *Arabidopsis thaliana*, impidiendo asignar una función putativa a alguno de ellos. Para validar si estos genes podían considerarse como candidatos a genes de defensa en la interacción *C. arabica* – *H. vastatrix* se realizó un análisis de expresión diferencial relativa para cada una de las secuencias por medio de qRT-PCR en los dos genotipos de café, susceptible y resistente (cultivar Caturra e Híbrido de Timor), en una serie de tiempos de 39, 63 y 87 horas pos-inoculación. Dos secuencias (48H21 y 48H37) presentaron una inducción en su expresión en el genotipo resistente, en el tiempo descrito para la aparición de las primeras células madres de haustorio del patógeno (hora 63). La formación de las células del haustorio desencadena en otras plantas una cascada de defensas que culmina en interacciones incompatibles. Estudios más detallados de la expresión y estructura de estos genes pueden ser útiles para proveer herramientas para el diseño de alternativas de control genético más eficientes y durables para el café y otros cultivos.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director Álvaro L. Gaitán B., Codirector Jorge Hernández.

ABSTRACT

TITLE

FUNCTIONAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF DEFENSE GENES IN THE INTERACTION *C. arabica* – COFFEE LEAF RUST*

AUTHOR: CARDENAS DIAZ, Fabián Leonardo**

KEYWORDS: *Coffea arabica*, *Hemileia vastatrix*, qRT-PCR, GenomeWalker, Relative Expression, Defense.

Ten fragments varying in size between 110 and 600 bp, generated from subtractive libraries of *Coffea arabica* leaves induced with the coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) 24 hours post-inoculation, were used for the structural characterization of the 5' and 3' flanking sequences of their genes using the GenomeWalker technique. With an average extension rate of 3.5 new bases for every known base, 15 unigenes were obtained with lengths between 510 and 2900 bp. Only three unigenes displayed homology to known sequences reported in Genbank: a retrotransposon, a glycine rich protein and a protein of unknown function from *Arabidopsis thaliana*, preventing the assignment of a putative function to any of them. To validate if these genes could be considered as defense genes candidates in the interaction *Coffea arabica*-*H. vastatrix*, a relative differential expression assay was carried out for every sequence by qRT-PCR in the two coffee genotypes, susceptible and resistant (Caturra cultivar and Timor Hybrid), in a time series of 39, 63 and 87 hours post-inoculation. Two sequences (48H21 and 48H37) showed induction in their expression in the resistant genotype, in the time described for the onset of haustorial mother cells of the pathogen (63 hours). The formation of haustorial cells triggers in other plants a cascade of defenses that ends up in incompatible interactions. More detailed studies of the expression and structure of these genes could be useful to provide tools for designing more efficient and durable alternatives of genetic control of diseases in coffee and other crops.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director Álvaro L. Gaitán B., Codirector Jorge Hernández.

INTRODUCCION

El cultivo del café (*Coffea arabica* L.), introducido a Colombia a principios del siglo XVIII, se convirtió en el principal producto de la economía nacional en el siglo XIX y se consolidó como el mayor motor de la economía colombiana en el siglo XX. La primera exportación del grano se registró un siglo después de su introducción en 1835¹. Considerada inicialmente como planta productora de una bebida exótica, el café paso rápidamente a ocupar un puesto de vanguardia en la economía nacional, hasta convertirse en el principal productor de divisas² en la década de 1980. En el 2004 el café fue el segundo producto agrícola en extensión en Colombia con 560.000 hectáreas, con una producción de 680.580 toneladas métricas, representando el 15% del área cosechada en Colombia y el 26% de los cultivos permanentes, y correspondiendo así al 9.4% del valor de la producción agropecuaria y al 17% de la actividad agrícola Colombiana. La producción del país, cercana a 700.000 toneladas de café pergamino seco al año (más de 12 millones de sacos), participa con el 8,8% del total de la producción mundial³. Las variedades de café sembradas en Colombia han contribuido significativamente a la consolidación de la industria cafetera nacional, siendo estas de la especie *Coffea arabica* L, la única tetraploide ($2n=4x=44$ cromosomas) y autocompatible en el género *Coffea*⁴.

¹ CADENA, G. Desarrollos científicos de Cenicafé en la última década. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 2005 Vol 29 p. 89-99.

² FEDERACAFE, Estudios especiales, citado por MORENO, Germán. Obtención de variedades de café con resistencia durable a enfermedades, usando la diversidad genética como estrategia de mejoramiento. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 2004 Vol 28 p. 187-200

³ ESPINAL G, C.; MARTINEZ C, H.; ACEVEDO G, X. La cadena del café en Colombia. Documento de trabajo No. 104. Bogotá, enero 2006 p. 5-15

⁴ CARVALHO, A.; MONACO C, L. The breeding of arabica coffee. citado por MORENO, Germán. Obtención de variedades de café con resistencia durable a enfermedades, usando

Durante varios años la caficultura colombiana transcurrió sin grandes sobresaltos, hasta 1970 cuando una enfermedad limitante, la roya anaranjada de la hoja del café, causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, apareció en el continente Americano. Trece años después la roya fue descubierta en Colombia⁵. La roya anaranjada es la enfermedad más agresiva de este cultivo, e hizo su aparición por primera vez en el Africa Oriental en 1861 cerca del lago Victoria, y poco después causó epidemias devastadoras en plantaciones del Ceilán, India, Java y Filipinas. La enfermedad fue descrita en 1869 en muestras colectadas en *C. arabica* en Sri Lanka (antiguamente Ceilán)⁶.

La aplicación intensiva de fungicidas cúpricos en los últimos 50 años constituye un control preventivo de la enfermedad, pero es un método costoso para el usuario además del deterioro causado al medio ambiente. Al mismo tiempo el parásito puede desarrollar razas insensibles al fungicida⁷. En Colombia, las epidemias observadas no dejan duda sobre su severidad ni sobre el grave daño que causa la roya en los cafetos cuando no se ejercen medidas de control o cuando este es deficiente⁸. La roya causa una fuerte defoliación en las plantas, que se traduce en disminuciones importantes de la

la diversidad genética como estrategia de mejoramiento. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 2004 Vol 28 p. 187-200

⁵ CASTILLO Z, J. y MORENO G, R. La Variedad Colombia: Selección de un cultivar compuesto resistente a la roya del cafeto. Manizales, Centro Nacional De investigaciones del Café. 1986 p. 169

⁶ WELLMANN F, I. Peligro de introducción de la *Hemileia* del café a las Americas. Turrialba 1952 Vol 2 p. 47-50

⁷ BAKER, K,F and COOK, R,J. Biological control of plant pathogens. W.H Freeman and Co., San Francisco, 433 pp., 1974

⁸ FERNANDEZ B, CASTILLO GJ, BAEZA AC, SIERRAS SC, ARISTIZABAL BR. Tercer informe de la misión Técnica "Evaluación de la presencia de la roya del cafeto en Colombia". Bogotá, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia-Instituto Colombiano Agropecuario. Agosto 31 de 1984. 17p

producción, donde en ausencia de medidas de control, la roya puede disminuir la producción hasta en un 23%⁹. Los genotipos resistentes a la roya como la variedad Colombia y el Híbrido de Timor no ven afectada su producción al ser atacados por el patógeno, en tanto los susceptibles presentan disminuciones equivalentes a la pérdida de una cada cuatro cosechas¹⁰.

Con el fin de obtener plantas resistentes a las diferentes razas de la roya del cafeto CENICAFE utilizó el Híbrido de Timor como recurso genético en el cruce con el cultivar Caturra donde un gran número de progenies se escogieron por sus características agronómicas y por la ausencia de ataques de roya. Estas progenies formaron una nueva variedad, la variedad Colombia, liberada en 1982. Esta es un cultivar compuesto con un alto grado de diversidad genética, una aceptada uniformidad fenotípica, características agronómicas similares a la del cultivar Caturra y buena calidad en la bebida¹¹.

La resistencia es un fenómeno general de las plantas, su naturaleza puede ser deducida de diferentes orígenes: adquirida, agronómica, aparente, bioquímica, fisiológica o morfológica¹²; muchas veces se presenta como una combinación de varios factores. Aunque todavía no son totalmente conocidos los mecanismos de resistencia a nivel celular y molecular, las interacciones

⁹ RIVILLAS O, C.; LEGUIZAMON C y GIL V. Recomendaciones para el manejo de la roya del cafeto en Colombia. Cenicafé, Chinchiná. Boletín Técnico No. 19 p. 36

¹⁰ MORENO R,G y ALVARADO A,G. La variedad Colombia: Veinte años de adopción y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del cafeto. Cenicafé. Chinchiná 2000, Boletín técnico (22): 1-32

¹¹ CASTILLO, Op. Cit., p.15

¹² BECKER,S.; MORAES,W,B.; RICO, Q,M. La roya del cafeto conocimiento y control. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH. Eschborn. Cooperación técnica República Federal de Alemania. 1991 p. 112-118.

que establece la planta y el patógeno, sean exitosas o no, empiezan con el contacto físico entre los dos organismos; en este proceso participan macromoléculas presentes en las estructuras de infección del patógeno y de las células del hospedero, estas macromoléculas interactúan y el producto resultante sirve como señal que estimulará o reprimirá los mecanismos de resistencia del hospedero, aumentando o reprimiendo la síntesis proteica e incluso la síntesis de nuevos componentes no existentes antes de la interacción¹³.

Cualquiera que sea el tipo de resistencia considerada, esta no es más que la respuesta a la expresión bioquímica del potencial genético de la planta hospedera, además la expresión de este potencial genético puede estar sometida a la influencia de factores intrínsecos del hospedero (edad de la planta, madurez del tejido afectado, estado nutricional, etc.) o de factores ambientales (luz, temperatura, humedad, fotoperíodo, etc.). El proceso de interacción entre la planta y el patógeno, cualquiera que resulte en susceptibilidad o resistencia, involucra una serie coordinada de cambios bioquímicos a nivel celular y molecular, que a su vez van a generar cambios fisiológicos y estructurales principalmente en los tejidos del hospedero¹³.

Entre los cambios que experimentan las plantas en respuesta al ataque de patógenos, se encuentran la formación de una efectiva barrera en contra de la invasión, el aumento en el ARNm correspondiente a rutas metabólicas de síntesis de ácido salicílico y jasmonatos, con cascadas de reacciones en la célula mediadas por enzimas fosfoquinasas, generación de especies reactivas de oxígeno y activación de promotores en el núcleo, similares a las descritas en células animales. Los primeros eventos de la interacción juegan

¹³ SARASOLA, A.A. La resistencia y la lucha contra las enfermedades de las plantas. En: Fitopatología. General y control. ED. Hemisferio Sur, Argentina, 1975 p. 125-126,

un papel clave para generar una rápida inducción de las reacciones de defensa, y esta velocidad de reacción es la que diferencia a las interacciones incompatibles de las compatibles¹⁴.

Las plantas presentan dos tipos de respuesta de defensa, dentro de las cuales existe la defensa preformada donde el patógeno activa vías de defensa pasivas tales como barreras físicas o químicas, donde puede aumentar la cantidad de cutícula que cubren las células epidérmicas, la estructura y talla de la pared celular y la forma del estoma¹⁵. Entre las barreras químicas están la producción de fenoles, quininas, lactonas, glucósidos cianogénicos, saponinas, terpenoides, estilbenos y taninos, haciendo que proliferen el crecimiento celular adyacente¹⁶

La defensa inducida es aquella que presenta una respuesta hipersensitiva (HR), en donde ocurre una rápida muerte localizada de pocas células hospederas en respuesta a la invasión del patógeno virulento, esta respuesta es muy común en la interacción gen por gen, caracterizándose por una rápida pérdida de la integridad de la membrana de la célula que es infectada y la acumulación de productos fenólicos¹⁷. En las vías enzimáticas de HR se han reportado la influencia de especies que reaccionan con el

¹⁴ COLLINS T,J.;MOERSCHBACHER B,M.; READ N,D. Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signal. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2001 Vol 58. p. 259-266.

¹⁵ AGRIOS, G,N. (1997) *Plant Pathology*. 4th Ed, Academic press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.

¹⁶ PILLING E, HOFTE H. Feedback from the wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003. 6:611-616.

¹⁷ GOODMAN R,N.; NOVAVACKY A,J. *The Hypersensitive Reaction in Plant to Pathogen: a resistance phenomenon*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 1994

oxígeno (ROS) liderando una de la vías de señalización para la respuesta diferencial de defensa contra patógenos¹⁸.

Otro tipo de respuesta es la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (proteínas PR) la cual no sólo se acumula en el tejido infectado sino se inducen sistémicamente como las quitinasas¹⁹.

No existe evidencia de que la defensa es preformada en café, la cual pudiera limitar el crecimiento de *H. vastratrix* a través de varios mecanismos de defensa que pudieran ser inducidos después de la inoculación del patógeno²⁰. Las Urediniosporas de *H. vastratrix* usualmente germinan y se diferencia el apresorio sobre el estoma tanto en la planta resistente como en la susceptible. Para varios genotipos de café (*Coffea* spp) la resistencia post-haustorio expresa rápidamente la HR, la muerte de las células subsidiarias y guardianas en los sitios de infección en los cuales el hongo se puede observar al tercer día después de la inoculación pero en un pequeño número de sitios infectados²⁰.

Estudios bioquímicos han mostrado que los genotipos resistentes presentan una alta actividad enzimática de fenilalanina amonio liasa (PAL) y actividad

¹⁸ LALOI C.; APEL K.; DANON A. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2004 7:323-328.

¹⁹ VAN LOON L, C.; PIERPOINT W,S.; BOLLER T.; CONEJERO V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1994 12:245-264.

²⁰ VÁRZEA V,M.; RODRIGUES JR C,J.; MARQUES D,V.; SILVA M,C. International survey of coffee leaf pathotypes. Evolution of virulence in *H. vastatrix* detected in resistant coffee varieties. 2004. In: Proceedings of the 20th International Conference on Coffee Science (ASIC), Bangalore, India. (in press).

²⁰ SILVA M,C.; NICOLE M.; GUERRA-GUIMARÃES L.; RODRIGUES JR. C,J. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2002. 60:169-183.

peroxidasa antes de que empiece a observarse la muerte celular por HR, indicando que estas enzimas puedan estar involucradas en la HR. Los genotipos resistentes han sido sometidos a diferentes tratamientos mediante sustancias químicas como diaminobenzidina (DAB), 2,4-diclorofenol, ácido salicílico hidroxámico, para poder indagar en la respuesta celular como el aumento de la cutícula, la inducción de la actividad de peroxidases y otras oxidasas y poder corroborar la presencia de inhibidores enzimáticos y rutas metabólicas²¹. Rojas et al., (1993)²² reveló un incremento de la actividad de la lipoxigenasa durante la interacción incompatible de la hoja del café y *H. vastatrix*.

En vista de la realización de estos trabajos y para poder entender aún más los mecanismos envueltos en el metabolismo de la defensa, la HR, y demás actividades enzimáticas las cuales están gobernadas por expresión genética, han llevado a la búsqueda de aquellos genes implicados en esta actividad, catalogando genes que se expresan tempranamente cuando se expone un genotipo resistente ante la acción del patógeno. Con el uso de nuevas técnicas de biología molecular se han podido caracterizar genes expresados en diferentes horas. Fernández et al., (2004)²³ generó librerías de cDNA en hojas de café inoculadas con *H. vastatrix* tomando como horas control 24 y 48 horas post-inoculación, para encontrar genes asociados a los

²¹ SILVA M,C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; NICOLE M.; LOUREIRO A.; FERNANDEZ D.; RIBEIRO A.; SANTOS P.; RODRIGUES JR. C,J. Involvement of peroxidases in the hypersensitive reaction of coffee (*Coffea arabica*) plants to orange rust (*Hemileia vastatrix*). 2003 In: 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand. Abstract, pp.199.

²² ROJAS M,L.; MONTES DE GÓMEZ, V.; OCAMPO C,A. Stimulation of lipoxigenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1993. 43:209-219

²³ FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C.; BON, M.C.; PETITOT, A.S.; SILVA, M.; GUERRA, L.; RIBEIRO, A.; ARGOUT, X.; NICOLE, M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). 2004. *Mol plant path* 5 (6), 527-536.

mecanismos de defensa. El 13% de los ESTs generados representaron genes implicados en los mecanismos de defensa y el 34% fueron similares a genes de plantas con función desconocida.

Actualmente se están realizando análisis de expresión genética mediante pruebas de microarreglos y qRT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo Real de manera cuantitativa) como forma de evaluación y validación de genes candidatos a defensa. Ganesh et al., (2006)²⁴ evaluó 3 genes candidatos a defensa con función desconocida, cuantificando los niveles del transcrito producido en dos rangos de tiempo (12-16 y 24h), post-inoculación con *H. vastratrix* en la interacción incompatible con *C. arabica*. Tomando la ubiquitina como gen de referencia, se observó la sobreexpresión de los genes en las horas post-inoculación 12-16, con una expresión significativa comparada con la variedad susceptible.

Las plantas tienen la habilidad de reconocer una potencial invasión por un patógeno y por ende desarrollan varios mecanismos de defensa contra determinado patógeno²⁵. A su vez los patógenos desarrollan estrategias que comprometen la resistencia de la planta mediante mecanismos evolutivos²⁶. Algunos de estos mecanismos conllevan a expresar constitutivamente barreras físicas o químicas que sólo después de que el patógeno ataca

²⁴ GANESH, D.; PETITOT, S.; SILVA, M.C.; ALARY, R.; LECOULS, A.C. and FERNANDEZ, D. Monitoring of early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. No publicado. Plant Science. 2006

²⁵ STASKAWIC Z, B. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. Plant Physiol. 2001. **125**: 73-76

²⁶ KENN N, T. Plant Disease resistance: Progress in basic understanding and practical application. 1999. In: Callow JA (eds), Advances in Botanical Research, pp.291-328. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney.

desencadena una red de señales de traducción y la rápida activación de la expresión genética²⁷.

La interacción del complejo genético y citoplasmático del hospedero con el patógeno, a nivel molecular, puede tener muchos matices específicos entre la planta y un patógeno determinado. Por esta razón es necesario profundizar en el conocimiento de los productos genéticos de esta interacción, así como en las rutas metabólicas resultantes en la expresión de resistencia a la enfermedad.

En el caso particular del café, en la búsqueda de genes de defensa, las secuencias producto de las librerías diferenciales no siempre tiene una relación de similitud con funciones conocidas en las bases de datos públicas, desconociéndose así si verdaderamente están involucrados en la defensa de la planta. Para esto hay que evaluarlos utilizando técnicas moleculares que den un acercamiento de su posible función putativa y validar su expresión en diferentes tiempos con el fin de determinar el intervalo de tiempo en el que los genes son activados por el patógeno. Llegar a candidatizar estos genes como genes de defensa sería útil en futuros estudios de mejoramiento genético de la planta de café.

En este trabajo se pretende dar un acercamiento a la posible función putativa que cumplen 10 genes expresados diferencialmente ante la inoculación de la planta del café con *H. vastatrix*, conocer regiones adyacentes de estas secuencias y validar la expresión de estos en el genotipo resistente, mostrando el intervalo de tiempo en el cual los genes son inducidos.

²⁷ HEATH M,C. Signalling between pathogenic rust fungi and resistant or susceptible host plants. Ann. Bot. 1998. 80: 713-720

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar estructuralmente genes de *Coffea arabica* con expresión diferencial en la interacción con urediniosporas de la roya anaranjada *Hemileia vastatrix* y el tiempo de inducción al cual estos se expresan.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Conocer regiones adyacentes a fragmentos de cDNA de función desconocida y expresados diferencialmente post-interacción con *Hemileia vastatrix*.
- Explorar mediante herramientas de bioinformática estructural, la posible relación a nivel estructural con proteínas conocidas.
- Determinar por PCR en Tiempo Real el intervalo de tiempo en el cual se activan estos genes comprobando que se activan por la presencia del patógeno.

1. BUSQUEDA DE HOMOLOGIA EN BASE DE DATOS.

1.1 GENERALIDADES

1.1.1 Bases de Datos. Existen bases de datos primarias, que contienen información directa de la secuencia, estructura o patrón de expresión de ADN o proteína, y secundarias, que contienen datos e hipótesis derivados del análisis de las bases de datos primarias, como mutaciones, relaciones evolutivas, agrupación por familias o funciones, implicación en enfermedades, etc.

De nucleótidos. La colaboración de las tres bases de datos más importantes hace posible acceder a casi toda la información de secuencias de ADN desde cualquiera de sus tres sedes:

- **EMBL-BANK** en el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI).
- **DNA Data Bank of Japan (DDBJ)** en el Centro de Información Biológica (CIB).
- **GenBank** en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

De proteínas. Bases de datos de secuencias de aminoácidos.

- **Swissprot** contiene secuencias anotadas o comentadas, es decir, cada secuencia ha sido revisada, documentada y enlazada a otras bases de datos.

- **TrEMBL** por *Translation of EMBL Nucleotide Sequence Database* incluye la traducción de todas las secuencias codificantes derivadas del (EMBL-BANK) y que todavía no han podido ser anotadas en Swissprot.
- **PIR** por *Protein Information Resource* está dividida en cuatro sub-bases que tienen un nivel de anotación decreciente.
- **ENZYME** enlaza la clasificación de actividades enzimáticas completa a las secuencias de Swissprot.
- **PROSITE** contiene información sobre la estructura secundaria de proteínas, familias, dominios, etc.
- **INTERPRO** integra la información de diversas bases de datos de estructura secundaria como PROSITE, proporcionando enlaces a otras bases de datos e información más extensa.
- **PDB** por *Protein Data Bank* es la base de datos de estructura terciaria 3-D de proteínas que han sido cristalizadas.

De genomas:

- **Ensembl** integra genomas eucariotas grandes. Por el momento contiene genoma humano, ratón, rata, fugu, zebrafish, mosquito, *Drosophila*, *C. elegans*, y *C. briggsae*.
- **Genomes server** y **TIGR** son portales con información o enlaces de todos los genomas secuenciados por el momento, desde virus a humanos.

- **Wormbase** es el portal del genoma del nematodo *C. elegans*.
- **Flybase** es el portal de la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*.

1.1.2 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Herramienta especializada en encontrar regiones similares entre secuencias. Este programa compara tanto secuencias de nucleótidos como aminoácidos en una base de datos predeterminada bajo cierto cálculo estadístico de significancia. BLAST es usado para inferir relaciones funcionales como evolutivas entre secuencias así como también ayuda a identificar miembros en familias de genes.

BLAST está basado en teoría estadística formulada por Altschul y colaboradores en 1985, que produce un resultado con un valor esperado (E-value) por cada par de alineamientos con la respectiva secuencia blanco. Este resultado indica que tan bueno puede ser el alineamiento. El valor del resultado es calculado de una fórmula que tiene en cuenta la identidad y/o similitud de los residuos alineados así como la introducción de espacios (gaps) en el alineamiento de las secuencias. Un elemento clave en esta comparación y en el cálculo es la sustitución de matrices las cuales asignan un valor por cada posible alineamiento, BLOSUM62 es la matriz por defecto en la mayoría de los programas BLAST. El significado estadístico del valor esperado (E-value) en el alineamiento refleja el tamaño de la base de datos y el sistema de puntuación usado, donde los E-values bajos o cercanos a cero son los mas significativos, el alineamiento de una secuencia e.g un E-value de 0.05 significa que su similitud tiene una probabilidad de 5 en 100 (1 en 20) que ocurra por azar únicamente. Aunque estadísticamente se podría

considerar esta probabilidad como significativa, esta podría no tener un significado biológico²⁹.

1.1.3 GenomeWalker. Actualmente es sencillo amplificar regiones genómicas de interés una vez conocidas su secuencia. Sin embargo, en muchas ocasiones es necesario amplificar las regiones adyacentes a sitios caracterizados, lo que se dificulta por imposibilidad de diseñar un cebador específico debido al desconocimiento de la secuencia aledaña. Como una de las alternativas, se dispone hoy de la técnica denominada GenomeWalker³⁰, donde mediante digestión del genoma y el uso de adaptadores y la aplicación del principio de supresión de PCR, se pueden amplificar regiones adyacentes a la región conocida en las direcciones 5' y 3', para así hacer mapas de empalme entre exon/intron y obtener promotores. Las amplificaciones pueden generar amplicones hasta de 6 kb.

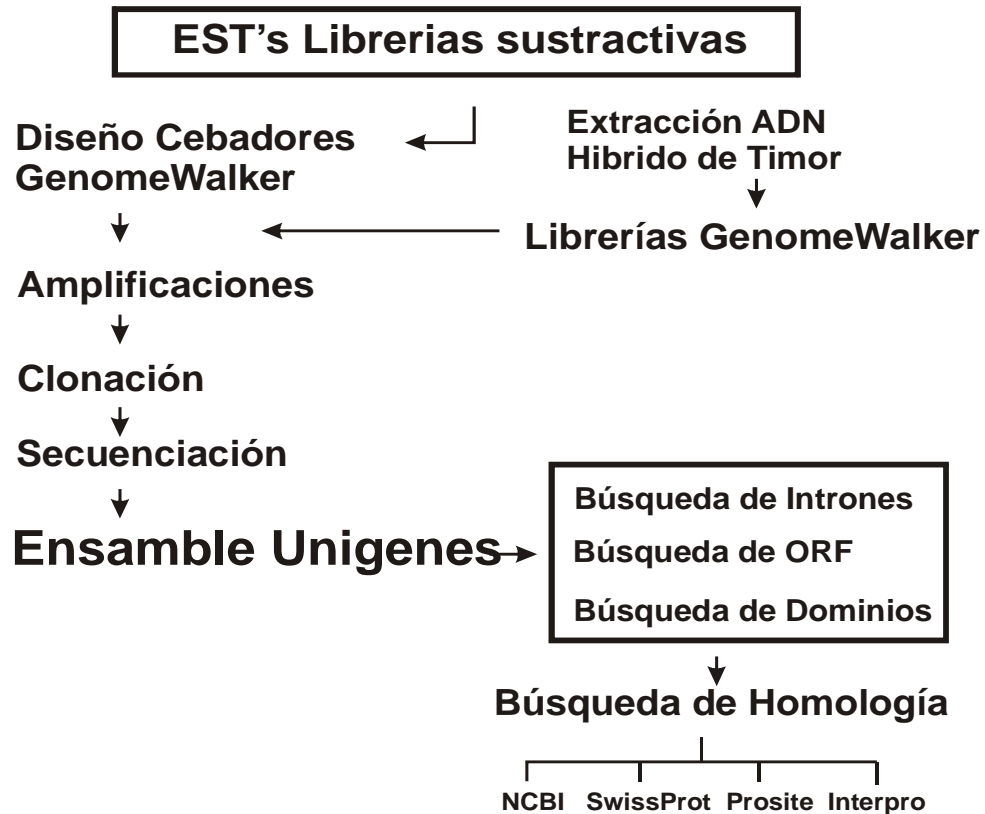
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Ubicación. Este estudio fue realizado en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones del Café “Pedro Uribe Mejía” CENICAFE, Laboratorio de Biología, Disciplina de Fitopatología. Ubicado en el municipio de Chinchina departamento de Caldas (Colombia), en el cual se realizó la totalidad del proyecto y facilitó el material vegetal colectado y las instalaciones.

²⁹ MADDEN, T. The blast sequence analysis tools.NCBI. Agosto 13, 2003 p. 2-6

³⁰ SIEBERT, P.; CHENCHIK, A.; KELLOGG D.; LUKYANOV K and LUKYANOV, S. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA.. Nucleic Acids Research. 1995 Vol **23**, No. 6 p.1087-1088.

Figura 1. Esquema general de las ampliaciones por medio de GenomeWalker y búsqueda de homología en bases de datos.



1.2.2. Material de investigación (secuencias desconocidas). A partir de 10 secuencias candidatas a genes de defensa producto de librerías diferenciales sustractivas (**SSH**), inducidas con roya (*Hemileia vastratix Berk & Br*) en hojas de café Híbrido de Timor a 48 horas después de inoculación, obtenidas en CENICAFE, las cuales no presentaron ninguna homología en comparación con bases de datos sometidas mediante la herramienta Blastn y Blastx utilizando diferentes matrices para la búsqueda en el GenBank del NCBI.

1.2.3 Material vegetal

- **Café Híbrido de Timor.** Se tomaron las primeras y segundas hojas sanas de las ramas de un árbol adulto de café Híbrido de Timor 1343 del banco de germoplasma de CENICAFE subestación experimental Naranjal, Caldas. Estas muestras fueron inmediatamente almacenadas en medio húmedo, para evitar fenolización y listas para extracción de ADN.

1.2.4 Extracción ADN Híbrido de Timor. El ADN genómico total de café Híbrido de Timor se realizó de acuerdo al protocolo de Bernatzky & Tanksley (1986)³¹, donde se tomaron 5 gr de material fresco hojas jóvenes las cuales se licuaron durante 1 minuto con 50 ml de buffer de extracción [350mM de Sorbitol; 100mM de Trizma base; 5mM de EDTA; 0.2 de β -mercaptoetanol]. El homogeneizado se filtró y se guardó a 4°C por 24 horas. Se vertió en tubo Corning de 50ml y se centrifugó 20 min a 3000g, el pellet se resuspendió en 5ml de buffer de extracción Sorbitol y se pasó 2ml de N-Lauryl Sarcosine al 5%. Se lavó el tubo con 5ml de buffer de lisis nuclear CTAB:[200mM de Trizma base, 50mM de EDTA, 2M de NaCl]. Se incubó a 65°C por 60 minutos agitando por inversión. Se hizo un pase de cloroformo isoamil alcohol (24:1) en proporción 1:1 con respecto al homogenizado. Se centrifuga a 4°C por 20 min a 3000g.

Se adicionó RNAsa a cada tubo y se incubó a 37°C 30 minutos, se añadió 2-propanol a -20°C en proporción 1:1. Se centrifugó a 3500g 20 min a 4°C. Se hizo dos lavados con etanol al 70%, se transfirió a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó por 20 min a 14000 rpm, se descartó el sobrenadante y se secó el etanol restante por vacío en un Concentrator 5301 Eppendorf (20 mbar por 5min), se resuspendió en 200ml de agua. Se tomó 1 ul de la

³¹ BERNATZKY R and TAKSLEY S (1986) Methods for detection of single or low copy sequences in tomato on southern blots. Plant Mol Biol Rep 4: 37-41

muestra y se visualizó en un gel de agarosa al 1% con 0,5ul de BrEt en electroforesis 30 min a 90 voltios.

1.2.5 Cuantificación de ADN. El ADN genómico se cuantificó por fluorometría con picogreen en un equipo Turner Biosystems 380. El equipo fue calibrado con diluciones del marcador de peso molecular λ (100 ng/ul) de INVITROGEN. Se sometió a lectura 1 ul de la muestra del ADN extraído.

1.2.6 Diseño de cebadores. Partiendo de una secuencia conocida, EST, que se ha generado a partir de una librería diferencial sustractiva SSH, se tomó esta secuencia y se diseñaron cebadores que amplificarán hacia 5' y 3' para así poder conocer las regiones adyacentes a la secuencia de interés. Esto se hizo con las 10 secuencias candidatas (figura 2).

Las condiciones para el diseño de cebadores exigidos por el kit GenomeWalker son:

- a. 26 – 30 bases
- b. Contenido de GC entre 40 – 60%
- c. Un T_m mayor a 58°C
- d. Las primeras 6 bases no deben ser más de tres G o C.

Se utilizó el programa de libre acceso de la empresa IDT technologies: Oligo analyzer 3.0. ³³Bajo estas condiciones se elaboraron 20 cebadores para realizar la PCR 1 (Tabla1) y 20 cebadores para la PCR 2 o PCR anidada (Tabla 2)

³³ Integrated DNA Technologies, Oligo Analyzer, [Online] consultado, 2006-03-02, disponible en internet : <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>>

Figura 2. Diseño de cebadores para GenomeWalker. Partiendo de una secuencia previamente conocida, se elaboran dos cebadores para cada dirección 5'y 3', donde se elige un cebador interno y un cebador más externo o anidado.

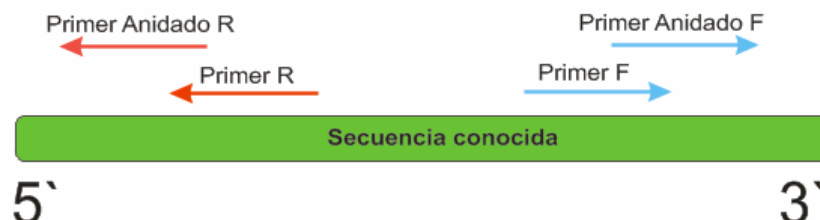


Tabla 1. Cebadores GenomeWalker PCR 1

Secuencia	Unigen	Cebador Caminando 5'(sec 5'-3')	Cebador Caminando 3'(sec 5'-3')
Contig 5	1_2	CCAATGGGTCACTCAATCTTCCGCTTA	CACACATCGTGTGTCGTGATCACATGTCC
48H197	3_4	GAGACACGTAGCACGTTTGCCCAAAG	TCACTCAAGTCAGTTGGAAGGCTGTT
48H40	5_6	TACGGCCTCTCATGAGACAAGAAAGC	GGGAAGTGCCTTAAGAAGGGCACATTC
48H37	7_8	GCCTTTGGTCCAAATTAAGAGGCTTAA	CTGGCTCAGTGAACCAGCGTCCTTT
48H24	9_10	TCTGAGGGCAAGCCAAGAGCAACAAA	CCCACCACCACCCCAGTTTACAAGT
Contig8	11_12	GAATGGGTTTCGGGTGAGCAATGAATCT	CGCTTCGGTTTATACACCAGGGCCAAA
48H08	13_14	GAAGCTCCACGAGCCCTTTTACGCA	GGATCCTGATGAGCCTCACCTGAGCT
48H53	15_16	ACCCTTGCCGGCTCGACTCGATTAACCT	GTGGAGTGTTATCTCCTCGCAATCCG
48H21	17_18	TATTCCCGGAAACCGTAGGACCTTTT	CTTCTGACCTCCTCGCGATCTGGTAT
48H210	19_20	TTCCCTTGACCGTAGGAAAGGCATT	AACTAGACATGTGCTTCACCTCCTCT

Tabla 2. Cebadores GenomeWalker PCR 2 o PCR Anidada.

Secuencia	Unigen	Cebador Caminando 5' (sec 5'-3')	Cebador Caminando 3' (sec 5'-3')
Contig 5	1_2	CAAACACGTAGCCGTGACACGATGTG	CCTAATAGGGTGGAGTGGCGTGACCT
48H197	3_4	GGACCTAAAACCAAACGGACGACATGA	CCACCACGCAACTCTTCACTTGCAAA
48H40	5_6	GAAGCTTCTAGAGCCGTATCCTAACCT	TGCTTGGTGAACCTCCGACTGAACTG
48H37	7_8	TTCACCATCAGGTGAATCACTGCAAA	TCACCAGCATATGTGCAGCATCTGCA
48H24	9_10	AGGAGTCAGCCCAGACCCCATTGCTT	ATAAGTCACCACCACCACCTCCTCAT
Contig8	11_12	GTTGGTAGTTCAAGCTCGCCTCTAGG	CTTCCGGTTTCGATAAGACCAGCTCTTT
48H08	13_14	ACAGGGGAGGCATGTAATGAGTACCT	TCTGCTGTTGTACATCAGCGGAAAT
48H53	15_16	CCACAGGGTTTCTGAAATTCAGGCAT	TACTCGAGTATTACCACCCGTGTTTCG
48H21	17_18	TTGTCCGGTTGCAGCTGCCTACTTTT	AACAGTTCCCCACATCCCATGACGTA
48H210	19_20	TGACCGTAGGAAAGGCATTGCTTTAG	CTAGACATGTGCTTCACCTCCTCTAG

1.2.7 Construcción de librerías de GenomeWalker. Con ADN genómico total de Híbrido de Timor se construyeron las librerías de GenomeWalker por medio del kit GenomeWalker Universal kit (Clontech), siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Para un total de 4 librerías construidas, se hicieron digestiones de extremos romos con enzimas de restricción a 10 unidades del tipo II con una secuencia de reconocimiento de 6pb (*Dra* I, *EcoR* V, *Pvu* II y *Stu* I). Para las digestiones se usaron 25 ul de DNA genómico a 100 ng/ul, 8 ul de enzima de restricción a 10 unidades/ul, 10 ul de buffer de restricción 10X y 57 ul de H₂O, y fueron incubadas a 37°C dos horas. Cada digestión fue visualizada en gel de agarosa al 0,5% utilizando 1 ul de cada digestión. Cada librería fue purificada usando fenol 1/1 v/v, con pases posteriores de cloroformo 1/1 v/v y precipitando con dos volúmenes de etanol absoluto y 1/10 v/v de NaOAc. Para la ligación de adaptadores provistos por el kit, se usaron 4 ul de ADN digerido y purificado, 1,9 ul de Adaptador GenomeWalker (Clontech), 1,6 ul de Buffer de Ligación 10X y 0,5 ul de T4 DNA ligasa incubándose a 4°C toda la noche.

1.2.8 Amplificaciones GenomeWalker

- **Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) 1.** Para cada amplificación se siguieron las recomendaciones del Kit GenomeWalker (Clontech por cada reacción se utilizó 1ul de ADN (100ng/ul) de la librería construida, 1 ul de Advantage Polymerasa BD 50X (Clontech), 1ul del cebador diseñado (10mM), 1ul de cebador AP1 del kit GenomeWalker (10mM), 1ul de dNTP (10mM), 5ul de buffer 10X Advantage BD y 40ul de agua nanofiltrada un volumen final de 50 ul, esta reacción se realizó con el programa de amplificación de 7 ciclos a 94°C por 25seg seguido de 72°C 3 min y 32 ciclos a 94°C por 25seg y 67°C 3min con una amplificación final de 7min a 67°C. Esto en un termociclador PTC-200 BioRad.

De cada muestra amplificada se tomó 1ul y se visualizó en un gel de agarosa al 1% con BrEt en electroforesis a 90 voltios 30 min.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) 2 o Anidada. Para esta PCR, primero se tomó 1 ul de producto obtenido en la PCR 1 y se realizó una dilución de 1/50, después de esto se utilizó 1 ul de la dilución y se utilizó las mismas condiciones de reacción de la PCR 1, cambiando los cebadores, donde se utilizó el cebador diseñado de manera anidada y el cebador AP2 del kit GenomeWalker, las condiciones de amplificación fueron 94°C por 25seg y 72°C 3 min, 5 ciclos luego 94°C seg y 67°C 3 min durante 20 ciclos luego de esto se realizo una extensión final 7 min a 67°C. De cada muestra amplificada se toma 1ul y se visualiza en un gel de agarosa al 1% con BrEt en electroforesis a 90 voltios 30 min.

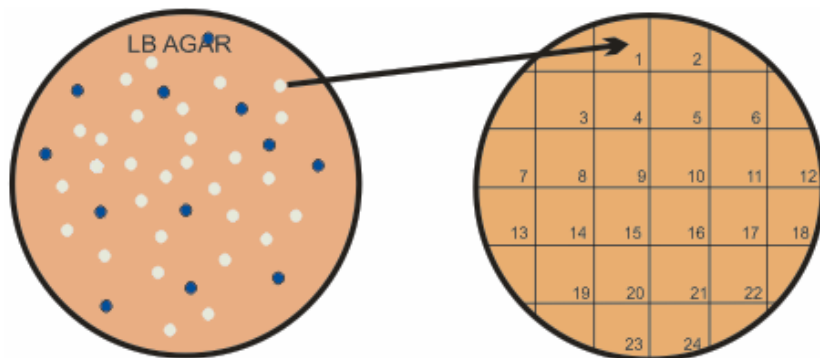
1.2.9 Clonación

Ligación de Fragmentos. Para la ligación de fragmentos se empleó el kit de ligación pGEM-T Easy vector (Promega), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, se tomaron aquellas muestras que presentaron una amplificación mayor a 900 pb. En tubo eppendorf de 0,5 ml se añaden 3 ul de producto PCR anidada, 5 ul de buffer de ligación 2X, 1 ul de pGEM-T easy (50ng/ul) y 1 ul de T4 ADN ligasa (3 U/ul) para obtener volumen final de 10 ul. Se incubó a 4°C toda la noche.

Transformación. Se utilizaron células competentes *E. coli* One Shot Mach1-T1 (INVITROGEN), siguiendo el protocolo del fabricante. La transformación fue servida en caja de Petri con medio Luria-Bertani (LB) agar el cual contenía X-gal y ampicilina (100mg/ml). Luego de la incubación a 37°C 16 a 18 horas, se enfriaron las cajas a 4°C dos horas para intensificar el color azul. Las colonias blancas fueron repicadas en una caja con medio LB agar

con ampicilina (100mg/ml) y X-gal, que tenían marcada en la parte posterior una cuadrícula con cuadros de 1cm² que se enumeran para saber el número del clon que se utilizó (**Figura 3**). El medio de repique se dejó incubando a 37°C 18 horas.

Figura 3. Repique de transformantes. Las colonias blancas poseen plásmidos recombinantes con el inserto de interés y son repicadas en una caja con LB agar, con cuadrículas numeradas. Las colonias azules contienen plásmidos no recombinantes y son descartadas.



1.2.10 Verificación de Insertos. En un tubo eppendorf de 0,5 ml se agregaron 30 ul de agua nanopurificada, se depositó la colonia y se hizo lisis bacteriana por choque térmico (95°C/3 min seguido de inmersión en hielo), y se deja incubar por 7 min a 96 °C. Luego se preparó la reacción de PCR agregando para una reacción: 5 ul de Buffer Taq 10X, 5 ul de MgCl₂ (10mM), 0,5 ul de dNTP's, 0,2 de cada cebador universal SP6 y T7 (10mM), 0,4 ul de Taq polimerasa (CENICAFE) y 3,9 ul de agua nanopurificada, se utilizó un termociclador PTC-200 BioRad con el programa de amplificación: 95°C 3min, 94°C 30seg, 57°C 30seg, 72°C 2 min, 94°C 3 min, 52 °C 30seg y 72°C 30 seg repitiéndose desde el paso 5 a 35 ciclos con una extensión final de 72°C 10 minutos.

Cada amplificación es visualizada en gel de agarosa al 1,5%, montando 20ul de la reacción, se deja correr en electroforesis por 30 min a 90 voltios.

1.2.11 Extracción de Plásmidos. Previamente se deja crecer la colonia que presenta el inserto de interés en caldo LB con ampicilina (100mg/ml), a 37°C en agitación por 18 horas, en tubos Corning de 15 ml con 5 ml de medio. Se centrifugan a 9000 rpm por 3 min y se procede a realizar el protocolo de extracción de Plásmidos por medio del kit QIAprep Spin Miniprep (QUIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

1 ul del producto final de cada extracción fue visualizado en gel de agarosa al 1% BrEt, en electroforesis 30 min a 90 voltios para verificar la concentración del ADN plasmídico extraído.

1.2.12 Secuenciación. Macrogen recomienda para el envío de las muestras a secuenciar un volumen de 10 – 15 ul y una concentración de 100ng/ul, cuando son plásmido. Se escoge el cebador para secuenciar una sola cadena en este caso se escoge T7 y SP6 (cebadores universales)

1.2.13 Análisis bioinformático

Construcción de unigenes. Las secuencias fueron analizadas por medio del programa Codon Code Aligner v1.5.2 (Code Corporation) para Macintosh, la calidad de las bases fue estimada con un 99% de confianza (calificación por PHRED de al menos 30) donde se descartaron secuencias con menos de 50 pb, se eliminaron secuencias del vector con similitud del 100% y se confirmaron la presencia de los cebadores con similitud del 100%. El ensamble de las secuencias se realizo con parámetros de identidad del 90% y solapaje de mínimo 20 pb.

Predicción de intrones y Proteínas Homólogas. Los unigenes construidos fueron sometidos a búsqueda preliminar de intrones por medio del programa GeneSplicer³⁴, tomando como modelo *Arabidopsis thaliana*. Utilizando las herramientas ORFinder y Blastx³⁵, disponibles en NCBI, se hizo búsqueda de homologías con proteínas reportadas en la base de datos de The National Center for Biotechnology Information (**NCBI**). Se tomó el código genético estándar para predecir los marcos de lectura de los unigenes y se tuvieron en cuenta las proteínas de mayor tamaño en cada búsqueda, Los datos arrojados se sometieron a Psi & Phi Blast³⁶ para búsqueda de proteínas relacionadas, estableciendo como matriz BLOSUM 64 y base de datos nr. Finalmente, a cada proteína codificada se le hizo una búsqueda de dominio y motivos por medio de la herramienta ScanMotifs³⁷, en la base de datos de Prosite.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Librerías y Amplificaciones de GenomeWalker. Se obtuvieron 220ng/ul de ADN genómico total de café Híbrido de Timor por medio de maxi extracción³⁸, para una concentración de trabajo de 100 ng/ul. La calidad del ADN fue verificada con la enzima *Dra* I. Para GenomeWalker fueron

³⁴ PERTEA, M.; LIN, X and SALZBERG, S,L. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res.* 2001 Vol 29, No. 5 p.1185–1190

³⁵ ALTSCHUL ,S,F.; THOMAS, L,M.; SCHÄFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W and LIPMAN, D,J. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 1997 Vol.25 p. 3389-3402.

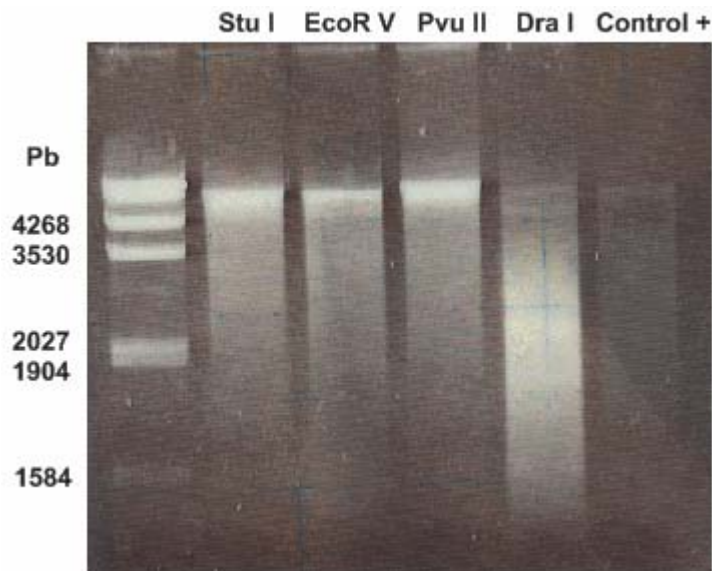
³⁶ Ibid., p. 27

³⁷ FALQUET, L.; PAGNI, M.; BUCHER, P.; HULO, N.; SIGRIST, C,J.; HOFMANN, K and BAIROCH, A. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* 2002 (1):235-248.

³⁸ Bernatzky & Tranksley. Op. Cit.,p. 24.

construidas las 4 librerías (una por enzima) con *Pvu* II, *EcoR* V, *Dra* I y *Stu* I (Figura 4).

Figura 4. Digestión ADN genómico de café Híbrido de Timor. Marcador de peso molecular ADN Lambda *Hind* III + *Eco* R I. Control positivo ADN genómico humano digerido *Pvu* II.

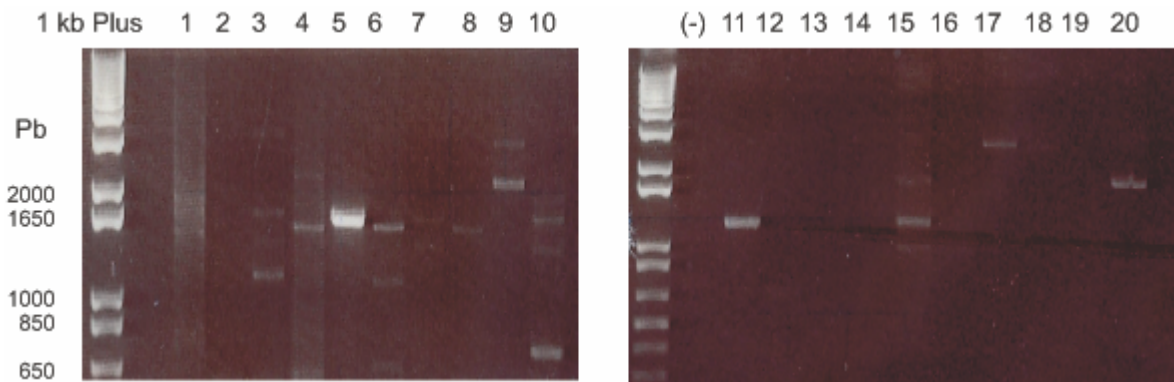


En la Figura 5 se muestran las diferentes amplificaciones realizadas en las dos rondas de PCR GenomeWalker (a. PCR1 y b. PCR anidada) en la librería 1 construida con la enzima *Stu* I, utilizando los diferentes cebadores (uno por cada dirección). De esta manera se realizaron amplificaciones en las tres librerías restantes con fragmentos que variaron entre 500 y 3000 pb.

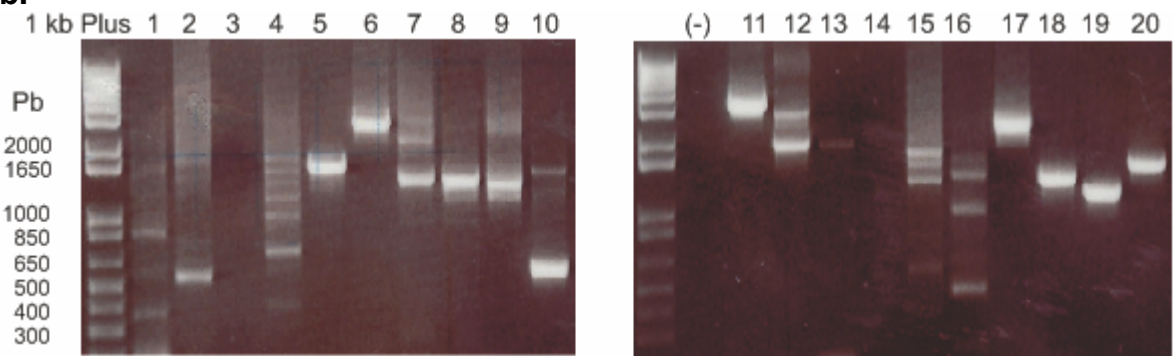
Figura 5. Amplificaciones GenomeWalker librería 1 (enzima *EcoR* V). a. PCR 1. Carril 1. Contig 5 F1. 2. Contig 5 R1. 3. 48H197 F1. 4. 48H197 R1. 5. 48H40 F1. 6. 48H40 R1. 7. 48H37 F1. 8. 48H37 R1. 9. 48H24 F1 10. 48H24R1. 11. Contig 8 F1. 12. Contig 8 R1. 13. 48H08 F1. 14. 48H08 R1. 15

48H53 F1. **16.** 48H53 R1. **17.** 48H21 F1. **18.** 48H21 R1. **19.** 48H210 F1. **20.** 48H210 R1. **b. PCR 2.** Amplificación con cebadores anidados utilizando el mismo orden de carril por combinación.

a.



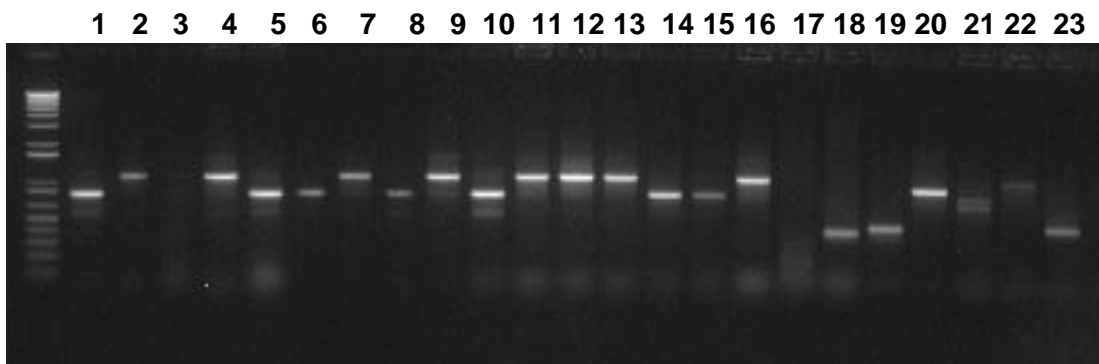
b.



Por cada gen se seleccionaron aquellas bandas mayores a 800 pb y se clonaron en el vector pGEM-T easy vector. La verificación de los insertos por PCR de colonias permitió elegir aquellos clones que presentaron el fragmento de interés para su posterior secuenciación (el tamaño de fragmento amplificado en la verificación por PCR de colonias corresponde a la suma del fragmento conocido más 200 pb del plásmido debido a que los sitios de unión de los cebadores SP6 y T7 se encuentran a cierta distancia del sitio de clonación). Cuando no se presencié el inserto observándose una

banda amplificada alrededor de los 200 pb, descartándose del experimento. La **Figura 6** muestra la verificación de 23 colonias, donde se escogieron aquellas que presentaron un tamaño superior a 1000 pb para su posterior secuenciación. De cada librería, los 6 a 10 fragmentos más representativos (banda definida y tamaño) fueron elegidos.

Figura 6. Verificación de inserto por PCR de colonias. Marcador de peso molecular 1 kb plus. En cada carril se encuentra el orden de las colonias repicadas en medio LB, los cebadores utilizados para verificación de insertos fueron SP6 y T7.



Los clones que presentaron fragmentos de interés fueron sometidos a extracción de plásmido, obteniéndose una concentración de ADN plasmídico de entre 100 y 120 ng/ul. Las 98 muestras de ADN plasmídico enviados a secuenciar presentaron una longitud entre 500pb y 900pb.

1.3.2 Análisis de secuencias y estructuración de genes putativos.

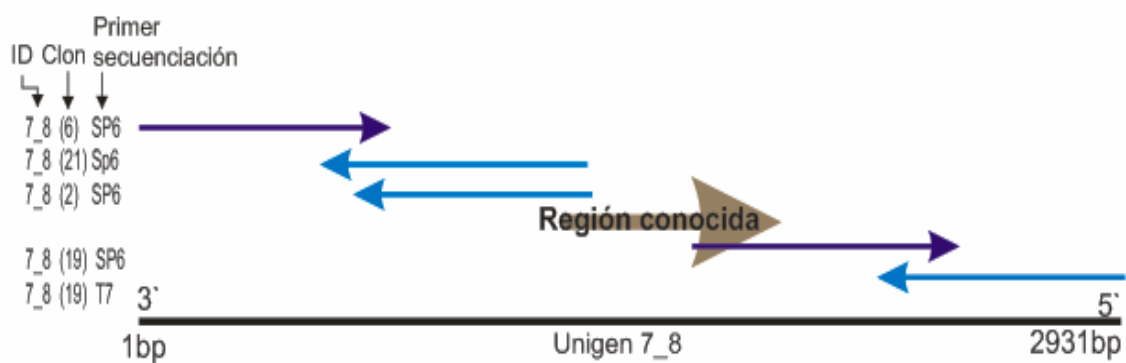
Unigenes. Se obtuvieron 15 unigenes ensamblados por medio de CodonCode Aligner, a partir de 85 clones secuenciados con cebadores SP6 y T7 específicos para el vector de clonación pGEM-T easy. La dirección de la secuencia fue establecida de acuerdo a su posición en el vector pGEM. El ensamble de cada unigen constó de una región conocida previamente, sobre

la base de la cual se ensamblaron las secuencias recorridas hacia las regiones 5'y 3' específicas para cada gen (**Figura 7**). La secuencia más larga en nucleótidos obtenida fue de 2931 pb que pertenece a la secuencia 48H37(Unigen7_8), donde se pudo recorrer más de 2600 pb, partiendo de una secuencia de 274 pb (**Tabla 1**). En promedio, por cada base conocida se obtuvieron mediante esta técnica 3,5 bases nuevas, con variaciones entre 0,2 y 9,7.

Tabla 3. Eficiencia de GenomeWalker. Los pares de bases (pb) iniciales muestran la longitud de la secuencia conocida de la que se partió para poder recorrer regiones adyacentes a esta. *pb Contig*: longitud total del unigen ensamblado mediante CodonCode Aligner. *Tasa de extensión*=número de bases nuevas/número de bases conocidas

Secuencia (unigen)	pb Iniciales	Clones/ contig	pb Contig	Tasa de extensión
48H37(Unigen7_8)	274	6	2931	9,7
48H210(Unigen 19_20(2))	112	8	844	6,5
48H53(Unigen 15_16(2))	245	3	1835	6,5
48H210(Unigen 19_20(1))	112	12	808	6,2
Contig8(unigen 11_12)	399	9	2196	4,5
48H40(Unigen 5_6(2))	178	4	920	4,2
48H21(unigen 17_18)	602	13	2520	3,2
Contig5(Unigen 1_2)	200	6	661	2,3
48H53(Unigen 15_16(1))	245	6	798	2,3
48H40(Unigen 5_6(1))	178	4	579	2,3
48H24(Unigen9_10)	358	9	861	1,4
48H197(Unigen 3_4(1))	257	5	582	1,3
48H08(Unigen13-14(1))	418	6	755	0,8
48H197(Unigen 3_4(2))	257	4	449	0,7
48H08(Unigen13-14(2))	418	3	513	0,2
Promedio	283,5	6,5	1150	3,5

Figura 7. Ensamble de Unigenes. Unigen7_8, conformado por una región conocida sobre la que se ensamblaron 5 clones los cuales presentaron una identificación característica del gen que amplifican, el número del clon y el cebador de secuenciación empleado. ID: Identificación; Clon: Número del clon empleado.



Para cada unigen se escogieron dos ORF que codificaron las proteínas de mayor tamaño. La secuencia más larga encontrada fue de 127 aa con traducción en el marco de lectura -1 para el unigen 11_12. El unigen 1_2 no presentó ningún codón de inicio bajo la lectura de código genético estándar debido al tamaño de la secuencia por lo tanto no se le asignó un marco de lectura (Tabla 4). Las búsqueda de homología por medio de Blastx mostró para el unigen 17_18 relación con una identidad de 58% con una proteína desconocida de *A. thaliana*, el unigen 7_8 presentó una región rica en glicina y para el unigen 15_16(2) se encontró una región correspondiente a una integrasa con una identidad del 78% reportada como elemento Gypsy en *Gossypium hirsutum*. Las demás secuencias presentaron un *valor E* no significativo.

En la búsqueda de dominios y motivos en las proteínas codificadas se encontró para el unigen 7_8 el motivo repetitivo NHL con actividad catalítica y ha sido reportado en una serie de enzimas de cobre tipo II, el motivo Extensin 2 para el unigen 9_10 reportado en proteínas de membrana en modificaciones post-transcripcionales, el motivo PAAR relacionado en familias de proteínas de membrana al igual que formando tripletes repetidos en proteínas hipotéticas, y el motivo DUF321 con función desconocida (**Tabla 5**).

Tabla 4. Lista de los 15 unigenes comparados con blastx de GenBank

Unigen	Identificación putativa Blastx	GenBank	E-value
17_18	unknown protein Arabidopsis thaliana	gi 15810257	6,00E-38
15_16(2)	integrase Gossypium hirsutum	gi 32396100	1,00E-19
7_8	glycine-rich protein Citrus unshiu	gi 7024449	1,00E-04
3_4(1)	hypothetical protein Onion yellows phytoplasma	gi 39722074	0.007
9_10	BRAP2 Squalus acanthias	gi 24637027	0.008
19_20(1)	hypothetical protein O2ColV204 Escherichia coli	gi 84060733	0.008
13_14(1)	EvpH Edwardsiella tarda	gi 45332450	0.018
15_16(1)	putative dihydrouridine synthase Ruminococcus flavefaciens	gi 1101718	0.045
5_6(1)	PAS sensor histidine kinase/response regulator Aurantimonas sp. SI85-9A1	gi 90419214	0.25
19_20(2)	glycerol kinase Robiginitalea biformata	gi 88804907	0.52
1_2	NADH dehydrogenase subunit 5	gi 499190	0.69
3_4(2)	hypothetical protein Onion yellows phytoplasma	gi 39722074	1.1
11_12	Glycoside hydrolase family 2, TIM barrel:Glycoside hydrolase	gi 89211246	1.1
5_6(2)	Xylose isomerase-like TIM barrel Anabaena variabilis ATCC 29413	gi 75910388	2.4
13_14(2)	Cytochrome P450 family protein, expressed Oryza sativa (japonica cultivar-group)	gi 77548657	7.2

Tabla 5. Búsqueda de dominios y motivos por medio ScanMotifs en la base de datos de Prosite.

UNIGEN	# Aminoácidos	Dominio o motivo
1_2	Sin marco de lectura	Ninguno
3_4(1)	Frame -1 46 aa	Patrón repetitivo de baja probabilidad
3_4(2)	Frame -2 40 aa	
	Frame +1 37 aa	Patrón repetitivo de baja probabilidad
	Frame -2 35 aa	
5_6(1)	Frame +1 66aa	Subunidad alpha fenil-transferasa
	Frame -3 56aa	prf:LEU_RICH región rica en leucina
5_6(2)	Frame +3 53aa	Patrón repetitivo de baja probabilidad
7_8	Frame -3 91aa	prf:REELIN Perfil de Dominio REELIN
	Frame -1 71aa	prf:NHL perfil repetitivo NHL
9_10	Frame -2 90aa	pfam_fs:Extensin_2; Region rica en prolina
	Frame +1 85aa	Patrón repetitivo de baja probabilidad
11_12	Frame -1 127aa	pfam_fs:PAAR_motif
	Frame +3 105aa	pre: NLS_BP <i>Bipartite nuclear localization signal</i>
13_14(1)	Frame -1 74aa	Patrón repetitivo de baja probabilidad
13_14(2)	Frame +2 47aa	pfam_ls:DUF321, función desconocida de motivo
15_16(1)	Frame -6 106aa	Patrón repetitivo de baja probabilidad
15_16(2)	Frame +2 48aa	Patrón repetitivo de baja probabilidad
17_18	Frame -3 99aa	Patrón repetitivo de baja probabilidad
	Frame +2 60aa	pfam_ls:DUF321, función desconocida de motivo
19_20(1)	Frame +2 120aa	Patrón repetitivo de baja probabilidad
19_20(2)	Frame -1 55aa	Patrón repetitivo de baja probabilidad
	Frame +1 53aa	Patrón repetitivo de baja probabilidad

1.4 DISCUSIÓN

Se realizaron dos rondas de amplificación PCR1 y PCR anidada en las cuatro librerías GenomeWalker construidas, obteniéndose un amplificado más definido y preciso. Las mejores bandas presentaron concentraciones entre 80 y 100 ng/ul de reacción y amplificaciones con longitudes entre 500pb y 1500pb aproximadamente. Se tuvieron amplificaciones en la PCR1 que no mostraron productos, pero que fueron positivas en la PCR anidada, debido a la baja concentración inicial del DNA plantilla.

El contig de mayor tamaño obtenido fue de 2931 pb a partir de una secuencia inicial conocida de 274 pb; otros reportes tanto en animales como plantas mostraron amplificaciones de fragmentos de similar tamaño hasta de 2 a 3 Kb con la implementación del mismo método^{39 40 41}. El unigen de menor tamaño fue de 513 pb. La diferencia en el tamaño de los unigenes puede deberse a la efectividad de los cebadores usados en las dos amplificaciones, cuyo diseño depende a su vez de la secuencia conocida.

Se esperaba obtener un total de 10 unigenes, sin embargo el resultado final fueron 15. Esto puede ser debido a dificultades en encontrar regiones que se traslapen sobre la secuencia conocida, ya sea porque las regiones comunes son muy pequeñas, o bien a que las regiones terminales en algunos clones correspondieron a secuenciaciones de baja calidad. Otra posible causa es que la región conocida sea compartida por varios genes (familias) que difieran en pocas o muchas bases de las regiones aledañas.

La predicción preliminar de intrones de cada unigen realizadas con el programa GeneSplicer mostró posibles intrones con secuencias comprendidas entre 100 y 200 pb para los unigenes más largos. En las secuencias menores a 900 pb no se presentó ninguna probabilidad de intrón bajo la relación conservada de donador-aceptor de intrones AT-AC y GT-AG⁴², con una sensibilidad del 90%. Se debe tener en cuenta que los patrones utilizados para la predicción de intrones en café se realizó en base

³⁹ LI, Q.; DASHWOOD, W.M.; ZHONG, X.; AL-FAGEEH, M and DASHWOOD, R.H. Cloning of the rat B-catenin gene (*Ctnnb1*) promoter and its functional analysis compared with the *Catnb* and *CTNNB1* promoters. *Genomics* 2004 No.83 p. 231-242

⁴⁰ SUMIN, G,U.; HYWEL, L, R.; CAMACHO, P and JEAN, X, J. Identification and characterization of an amino acid transporter expressed differentially in liver. *PNAS* 2000 No. 97 p. 3230 – 3235

⁴¹ SIEBERT, P.; CHENCHIK, A.; KELLOGG D.; LUKYANOV K and LUKYANOV, S, Op. Cit., p.22

⁴² SUMIN, G,U.; HYWEL, L, R.; CAMACHO, P and JEAN, X, J Op. Cit.,p.37

a los algoritmos calculados con el genoma de *Arabidopsis thaliana*, el cual es el modelo disponible para plantas en la matriz del programa⁴³. Intrones de este tamaño ya han sido reportados por varios autores, quienes plantean en el modelo de exón que si este es de gran tamaño el intrón siguiente deber ser muy pequeño y viceversa, pero nunca iguales ni parecidos en longitud⁴⁴⁴⁵. Para tener la certeza y corroborar que las regiones amplificadas alrededor de la secuencia previamente conocida no son intrones, se deben utilizar técnicas a nivel de mRNA tal como RACE⁴⁶, o comparar las secuencias contra bases de datos extensas de ESTs de café, que permitan confirmar la predicción hecha por el algoritmo del programa empleado. Hasta el momento, las búsquedas en las dos bases de datos de EST de café (*C. canephora* y *C. arabica*) presentes en el servidor de Bioinformática de café y en el servidor del proyecto SOL (www.sgn.cornell.edu) no han arrojado similitudes significativas con los contigs estudiados.

En la búsqueda de homología de los 15 unigenes por BLASTX contra la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) sólo tres unigenes mostraron un valor E aceptable representativo de significancia biológica menor a 0,001⁴⁷, sin que ninguno de los homólogos tenga todavía función conocida. Aún en genomas tan estudiados como el de *A. thaliana*

⁴³ PERTEA, M.; LIN, X and SALZBERG, S,L Op. Cit., p. 30

⁴⁴ BERGET, S,M.. Exon recognition in vertebrate splicing. J. Biol. Chem. 1995 No.270 p.2411–2414.

⁴⁵ STAMM, S.; ZHANG, M, Q.; MARR, T, G and HELFMAN, D, M. A sequence compilation and comparison of exons that are alternatively spliced in neurons. Nucleic Acids Res. 1994. No. 22 p.1515–1526

⁴⁶ FROHMAN, M,A.; DUSH, M,K and MARTIN, G,R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988 Vol. 85, p. 8998-9002.

⁴⁷ PONTING, C. Issues in predictioning protein function from sequence. Briefings in Bioinformatics 2001. Vol 2. No. 1 p. 19-29.

solo el 10% de los 25.000 genes funcionales reportados tienen asociado una evidencia experimental de su función⁴⁸. El unigen 15_16(2) presentó homología con la integrasa de un retrotransposón Gypsy de *A. thaliana*, que concuerda con lo visto en otros genomas ya secuenciados, donde se ha reportado la presencia en menor o mayor grado de elementos móviles que pueden causar diferentes fenómenos en la expresión genética⁴⁹. Con el análisis de búsqueda de dominios y motivos reportados en PROSITE, sólo se identificaron patrones repetitivos de baja probabilidad, que no dan luces en cuanto a las funciones putativas.

La abundancia de secuencias con valores E lejanos de cero sugiere la necesidad de prolongar la amplificación de secuencias aledañas (diseñando nuevos cebadores a partir de las secuencias obtenidas por GenomeWalker) o el descubrimiento de genes nuevos. La continuación de GenomeWalker puede justificarse si por azar se están obteniendo secuencias poco conservadas (probablemente intrones) a partir de un exón (la secuencia conocida) o secuencias muy cortas, que no permiten detectar homologías. De otro lado, por la naturaleza de la planta estudiada (una rubiaceae) y por el tipo de inducción a la que fue sometida la planta (el patógeno *H. vastatrix*), es posible que nuevos genes aún no estudiados en otras plantas y ausentes de las colecciones de ESTs de café, hayan sido obtenidos por el método de librería sustractiva. Cabe anotar que la comparación hecha se realizó en bases de datos de acceso público. Si bien existen otros estudios sobre el genoma del café sus datos no son de libre acceso como es el caso de los estudios llevados a cabo en Brasil, Italia y Francia.

⁴⁸ BREYNE, P and ZABEAU, M. Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Curr Opin Plant Biol* 2001 No.4 p.136-142.

⁴⁹ BENNETZEN, J,L. Comparative Sequence Analysis of Plant Nuclear Genomes: Microcolinearity and Its Many Exceptions. *Plant Cell* 2000 No.12 p. 1021 –1030

Teniendo en cuenta que el genoma estimado para café es de 1158 Mb⁵⁰, mucho mayor a los tres genomas secuenciados actualmente en plantas (*Arabidopsis thaliana* 157Mb, *Oryza sativa* 430Mb y *Populus trichocarpa* 550Mb), se incrementa la probabilidad de tener genes específicos de esta especie. Estos genes novedosos pueden ser muy importantes como herramientas para control de plagas y enfermedades no sólo en café sino en otros cultivos, o en aplicaciones aún más amplias.

Por el momento, la asociación de estos genes con la reacción de resistencia de café ante un patógeno debe ser confirmada mediante estudios de expresión genética, experimentos que se tratarán en el siguiente capítulo.

⁵⁰ ARUMUGANATHAN, K and EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Mol. Biolo. Rep. 1991 No. 9 p. 208-218

2. PRUEBAS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL RELATIVA

2.1 GENERALIDADES

2.1.1 La PCR en tiempo real. En la PCR en tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación⁵¹.

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR en tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR de tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos.

2.1.2 Agentes intercalantes. Son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR en tiempo real es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la

⁵¹ HIGUCHI, R.; FOKLER, C.; DOLLINGER, G and WATSON, R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 1993;11 p. 1026-1030

optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además es más barato que las sondas específicas.

El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores, muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los cebadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además, es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (*hot-start PCR*), lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Para ello se pueden usar polimerasas recombinantes modificadas que sólo funcionan después de ser activadas a temperaturas elevadas⁵² o anticuerpos que bloquean el centro activo de la polimerasa hasta que la reacción alcanza temperaturas altas en las que el anticuerpo se desnaturaliza liberando la polimerasa y permitiendo su actividad⁵³. Además la mayoría de los equipos para PCR en tiempo real tienen la posibilidad de determinar la temperatura de fusión de los fragmentos amplificados (T_m = temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR. Por otra parte, los agentes intercalantes no permiten la identificación de polimorfismos en la secuencia *diana* .

⁵² MORETTI, T.; KOONS, B and BUDOWLE, B. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *Biotechniques* 1998 ; 25 p. 716-722 .

⁵³ PALMER, S.; WIEGAND, F.; MALDARELLI, H.; MICAN, M.; POLIS, M.; DEWAR, A. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in Plasma. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41 p. 4531-4536

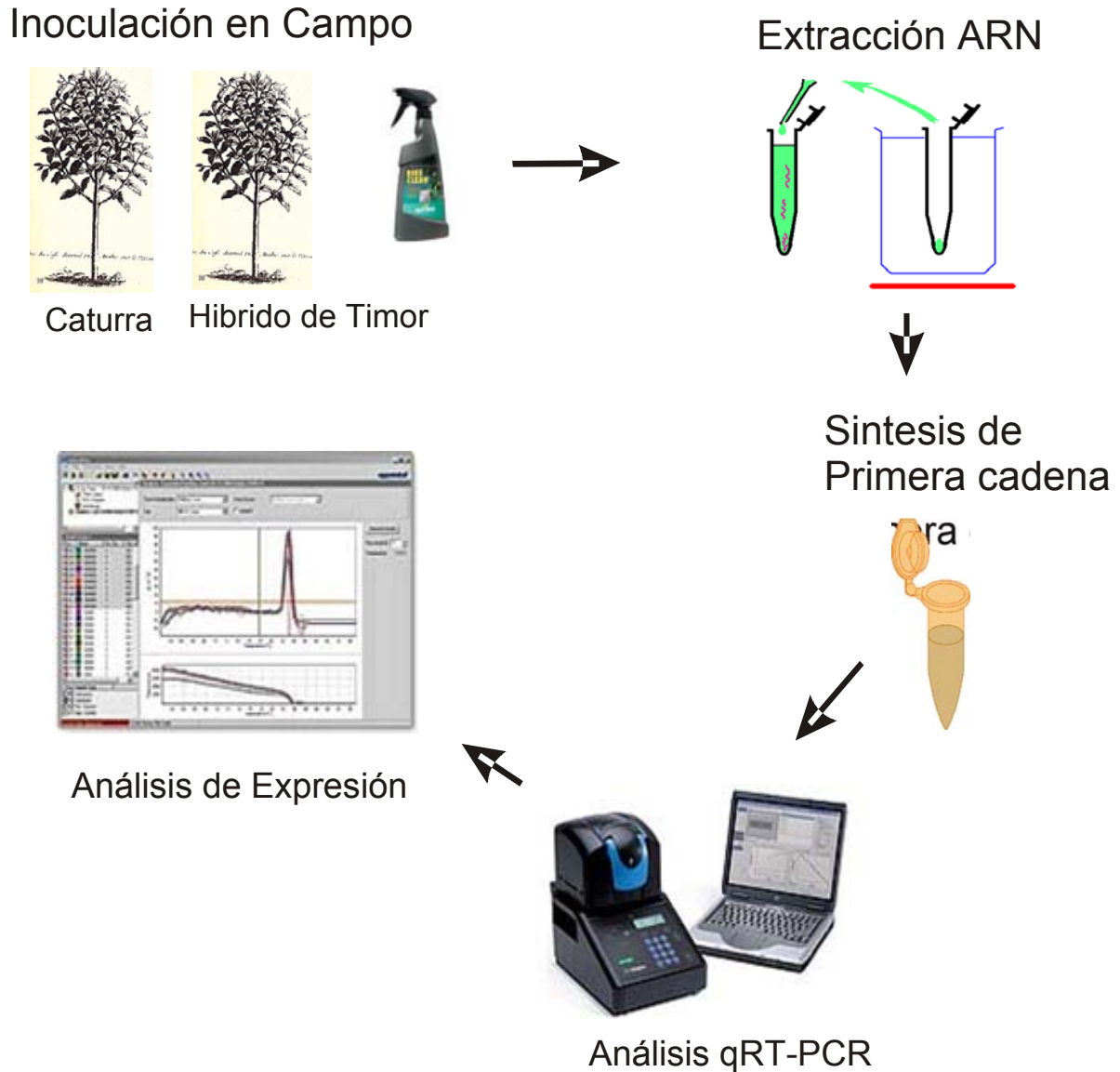
2.1.3 Ventajas de la PCR en tiempo real. La primera gran ventaja de la PCR en tiempo real es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección. Si el equipo empleado es el Light Cyclor o equivalente, esta ventaja todavía es más acusada, pudiéndose completar el proceso de amplificación y detección en 30 - 40 min. Además, gracias a su rapidez, estos equipos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos.

Otra ventaja muy importante de la PCR a tiempo real es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Los sistemas en tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla, más precisa y sobre todo en un rango mucho mayor (5-6 log) que en los procedimientos convencionales (2-4 log). Los equipos para PCR en tiempo real tienen una capacidad muy elevada ya que en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR múltiple, etc., mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples equipos.

2.2 MATERIALES Y METODOS

2.2.1 Localización. Este estudio fue realizado en las instalaciones del Centro Nacional de Investigaciones del Café “Pedro Uribe Mejía” CENICAFE, laboratorio de Biología, Disciplina de Fitopatología. Ubicado en el municipio de Chinchiná departamento de Caldas (Colombia), en el cual se realizó la totalidad del proyecto y facilitó el material vegetal colectado y las instalaciones.

Figura 8. Esquema general de la metodología realizada para el análisis de expresión relativa.



2.2.2 Material vegetal

Híbrido de Timor y *C. arabica* variedad Caturra. Se emplearon dos árboles del Híbrido de Timor accesión 1343 de la Colección Colombiana de Café, en la subestación experimental de Naranjal, Caldas. Los materiales en estado adulto presentaban hojas sanas y una altura cercana a 1,70 cm. En

las instalaciones de CENICAFE, lote El Calvario, se escogieron dos árboles de la variedad Caturra de similar desarrollo. En total se utilizó material vegetal u hojas jóvenes de cuatro árboles, dos de ellos pertenecientes al genotipo Híbrido de Timor y los dos restantes al genotipo Caturra. Como control se utilizó un árbol de cada genotipo.

2.2.3 Tratamientos de inoculación con *Hemileia vastatrix*. En cada planta (Caturra e Híbrido de Timor) fueron inoculados por aspersión 2 ml de 9×10^4 uredosporas /ml de *H. vastatrix* genotipo CU975, tomando ramas sanas y asperjando pares de hojas por el envés. Se tomó un árbol control el cual se asperjó con agua de la misma forma que las ramas inoculadas. Las hojas se inocularon a las 5 pm, se cubrieron con una bolsa negra para mantener la humedad y finalmente se retiró 12 horas después. Las hojas se cortaron a diferentes horas post-inoculación (39, 63 y 87) e inmediatamente fueron congeladas por inmersión en nitrógeno líquido. La réplica biológica consistió en inocular el mismo árbol con un intervalo de ocho días. El número de réplicas se basó en la metodología llevada a cabo por Ganesh et al., 2006⁵⁴.

2.2.4 Extracción de ARN. El tejido congelado fue macerado en mortero y guardado a -80°C . De este material se tomaron 100 mg y se realizó la extracción de RNA total utilizando el kit RNAasy plant (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.2.5 Cuantificación de ARN y Síntesis de Primera cadena de cDNA. El RNA total extraído se cuantificó por fluorometría con Ribogreen en un equipo Turner Biosystems 380. El equipo fue calibrado con diluciones de marcador de peso molecular λ (100 ng/ul) de INVITROGEN y se sometió a lectura 1 ul de la muestra del RNA extraído.

En tubo Eppendorf 0,5 ml se adicionaron 600ng de RNA total y 1 ul de cebador oligo (dt)₁₈, y se denaturó a 70°C 2 min para inmediatamente dejarlo en hielo, donde se adicionó por reacción: 4 ul de buffer de reacción 5X, 1 ul de dNTP mix (10mM), 0,5 ul de inhibidor de RNasa y 1 ul de MMLV transcriptasa reversa. Luego de la incubación a 42°C por una hora, se detuvo la síntesis con calentamiento a 94°C 5 min y se adicionó 1 ul de RNasa A, seguido de una incubación por 2 horas a 37°C

2.2.6 Diseño de cebadores. Se diseñó un juego de cebadores (forward y reverse) específico para cada gen utilizando el programa de libre acceso Oligo Analyzer 3.0⁵⁵ de IDT technologies. Cada juego fue diseñado para producir un amplicon entre 140 y 180 pb. El gen Ubiquitina se usó como gen de expresión constitutiva y se utilizó como control positivo de inducción el gen WRKY⁵⁶ (Tabla 6).

Tabla 6. Cebadores específicos para Expresión Diferencial relativa por gen.

Secuencia	Cebador Forward 5'- 3'	Cebador reverse 5'- 3'
Contig 5	ACATGTGATCACGACACG	GTGTCACGGCTACGTGTT
48H197	GCAAGTGAAGAGTTGCGT	CGCAATTCAAGCGTTGGA
48H40	CACCCCTAAAGCCAACTT	GGCTCTAGAAGCTTCTGC
48H37	AGCCAGGACGTATGGATC	GGGCAGGTACATCATCAT
48H24	GCAAAAGCAATGGGGTCT	AGGTATATGCACTGGAGG
Contig8	AGCGGAACCAAGCTACTC	CCGATCCTTCTTCAGCCA
48H08	TCAGGTGAGGCTCATCAG	GGTGTTACGGATCTCACA
48H53	ACACGAAACACGGGTGGT	CAGAAACCCTGTGGCTAG
48H21	GGGCGCTTACGCCTTATT	TATGGCCCGCTGCAACTA
48H210	ATTCTCTGGTGTCCCCTC	TTCCCCGTGTACTCTTCA
Ubiquitina	AACATTGAGGGTGGTTCTGTTC	GCAGAAAACCAACTAAGACCTAACAA
WRKY	TGGCCAAAAACCTGATGCA	TGGAACCCCTCCCCAGAA

⁵⁴ GANESH, D. et al. 2006 op. cit. p 19.

⁵⁵ Integrated DNA Technologies, Oligo Analyzer, [Online] consultado, 2006-05-15, disponible en internet : <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>>

⁵⁶ GANESH, D. et al. 2006 op. cit. p. 19

2.2.7 Análisis de expresión por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en Tiempo Real (qRT-PCR). La evaluación de expresión diferencial relativa de cada gen se realizó con los cebadores diseñados específicamente para cada gen. Se utilizó el kit DvNamo HS SYBR Green qPCR (FINNZYMES) y el equipo Chromo4 de BIO-RAD con el programa: un ciclo de activación de la polimerasa a 94°C 11min, 40 ciclos de denaturación a 96°C 15 seg, un ciclo de alineamiento de cebadores a 55°C 20seg, extensiones a 72°C 30 seg y una extensión final de 1 min a 72°C. Se realizó una curva de disociación con lectura cada dos segundos. Se escogió la Ubiquitina como gen constitutivo de referencia y como normalizador la muestra de la variedad susceptible Caturra, del cual se extrajo RNA a las 39 horas después de la inoculación. Se utilizaron como controles positivos de amplificación los genes reportados por Fernández en el 2006 (WRKY y R111) y la endoquitinasa AECHI-3 (CENICAFE, 2006). Se construyó una curva estándar de cuatro puntos con diluciones de 1/1, 1/4, 1/16 y 1/64 para cada muestra. Se corrieron tres réplicas biológicas, y dentro de estas, dos réplicas técnicas.

Para el análisis de expresión relativa de cada gen y para las curvas estándar por reacción, se tomó en un tubo de 0,5 ml 4 ul de cada cebador (1mM), 2 ul de cDNA y 10 ul de reacción de SYBR Green.

2.2.8 Adquisición de Datos y Análisis Estadístico. Los niveles de expresión fueron cuantificados usando el programa OpticonMonitor 3 versión 3.1 (MJ GeneWorks, BIO-RAD Laboratories). Las expresiones relativas para cada gen se determinaron de acuerdo a los métodos del boletín informativo #2, The Perkin-Elmer Corporation[©] 1997⁵⁷, tomando como gen constitutivo la Ubiquitina.

Los datos concernientes a las pruebas de expresión relativa fueron promediados de forma independiente para cada hora en las tres réplicas. Se realizó un análisis de varianza mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0,01$) con el programa InfoStat 2006⁵⁸, con el fin de detectar cambios en los patrones de expresión relativa por hora en los tres tratamientos.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Expresión de genes constitutivos. Para todos los genes evaluados fue posible detectar amplificados por qRT-PCR. En las tres réplicas biológicas se determinaron las ecuaciones de las curvas estándar:

($y = -3.487x + 31.61$, $r^2 = 1$; $y = -3.356x + 31.48$, $r^2 = 1$; $y = -3.578x + 28.05$, $r^2 = 0.998$ respectivamente), detectándose diferencias significativas para el gen referencia Ubiquitina ($\alpha = 0,01$) entre la réplicas (Anexo A), pero no así entre los genotipos o entre los tratamientos (horas de post-inoculación).

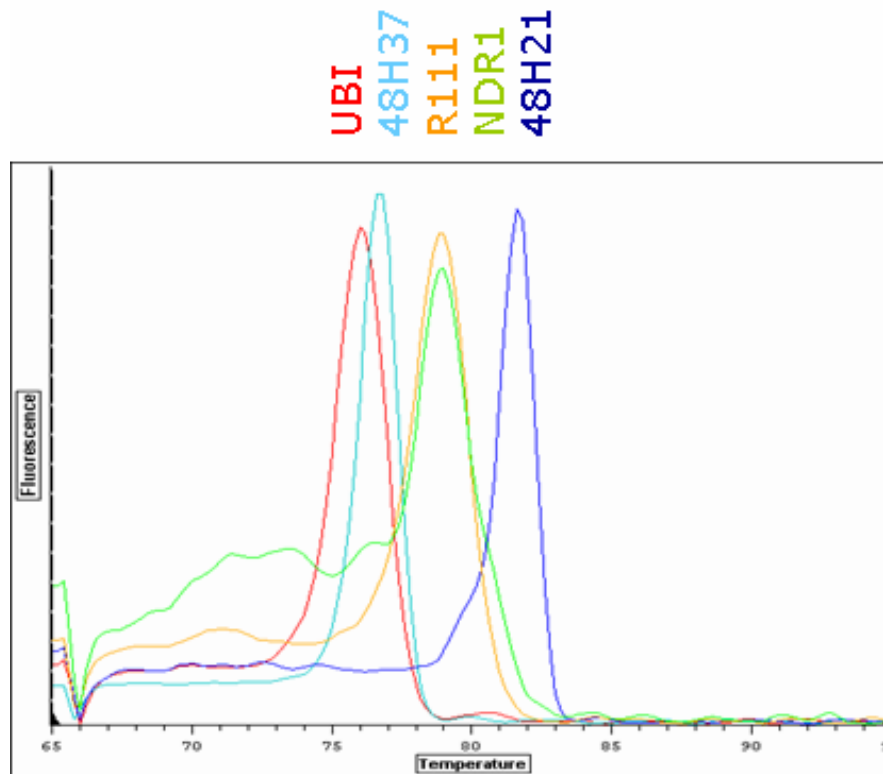
2.3.2 Especificidad de la amplificación. La temperatura de disociación, determinada por el tipo de cebador diseñado, da identidad a cada producto amplificado según su temperatura óptima de amplificación para cualquier genotipo bajo diferentes tratamientos.

Los genotipos en estudio HdT y Caturra mostraron amplificados específicos por cada cebador empleado para los diferentes análisis de expresión (**Figura 9**)

⁵⁷ USER, Bulletin #2. Relative quantitation of gene expression. December 11, 1997 p. 1-36.

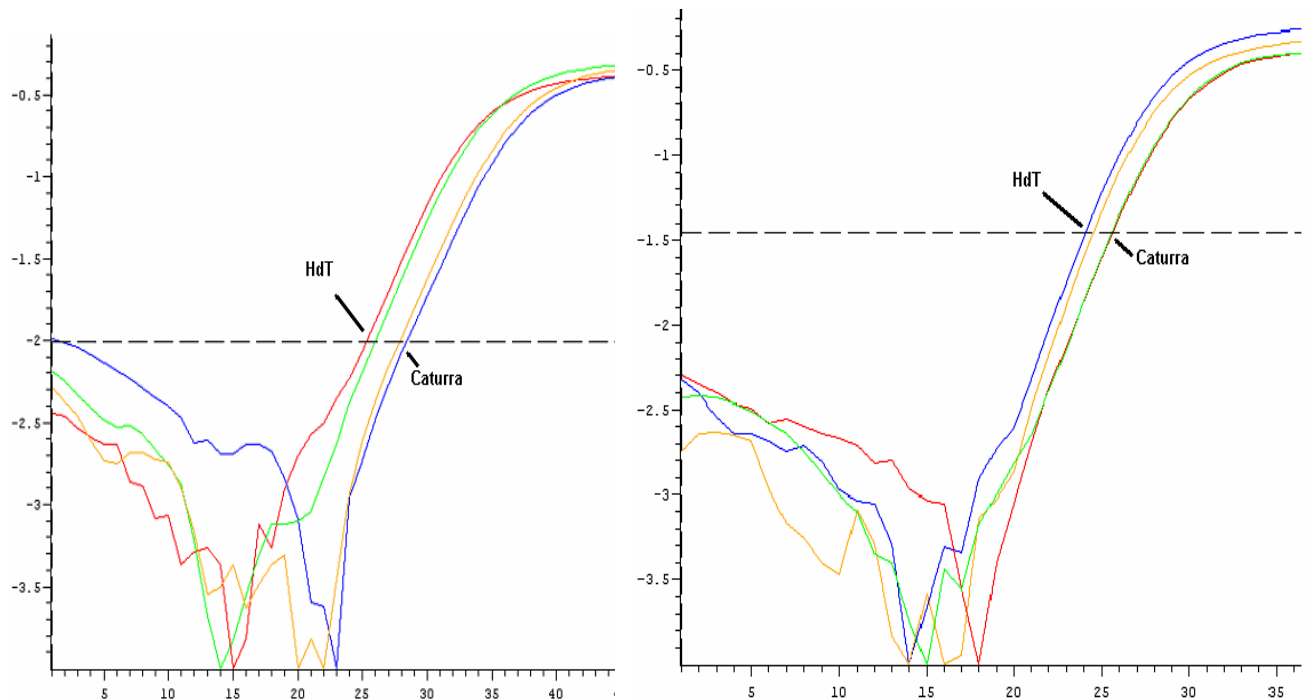
⁵⁸ INFOSTAT - Software estadístico version 2006 www.infostat.com.arg. consultado en internet 2006-07-08

Figura 9. Productos únicos obtenidos en la amplificación de los fragmentos de interés, determinados por el Tm en PCR de tiempo Real.



2.3.3 Análisis de Expresión Relativa Diferencial. De los genes provenientes de librerías de expresión diferencial, sólo 48H21 y 48H37 presentaron inducción en el Híbrido de Timor en la segunda réplica biológica (**Figura 10**), sin embargo los patrones no fueron consistentes entre estas. Los datos de expresión relativa normalizados utilizando la planta susceptible Caturra, indican que sólo tres de los genes evaluados presentan una inducción diferencial significativa ante la presencia de roya en el Híbrido de Timor, y corresponden a WRKY y R111 descritos por Fernández y usados como control positivo en estos ensayos, así como el gen AECHI-3 (**Figura 11**).

Figura 10. Diferencia de C(t) para el gen 48H21 (izquierda) y 48H37 (derecha). Fluorescencia emitida en diferente número de ciclos para los genotipos Híbrido de Timor (HdT) y Caturra inoculados con *H. vastatrix* 63 horas post-inoculación.



La sensibilidad de qRT-PCR permitió determinar la diferencia en expresión de los dos genotipos evaluados, con sólo un ciclo de diferencia entre las dos interacciones. Se obtuvo una expresión más temprana en HdT con respecto al cultivar Caturra, apreciándose una acumulación del producto amplificado en el análisis cuantitativo. La curva de disociación corroboró que no se trataba de una amplificación de dímeros de cebador u otros artefactos.

Figura 11. Diagramas de expresión relativa en hojas entre tres réplicas de Híbrido de Timor y Caturra para los genes control de inducción WRKY y R111, y los prueba AECHI-3, a diferentes tiempos de post-inoculación en condiciones de campo con *H. vastatrix*.

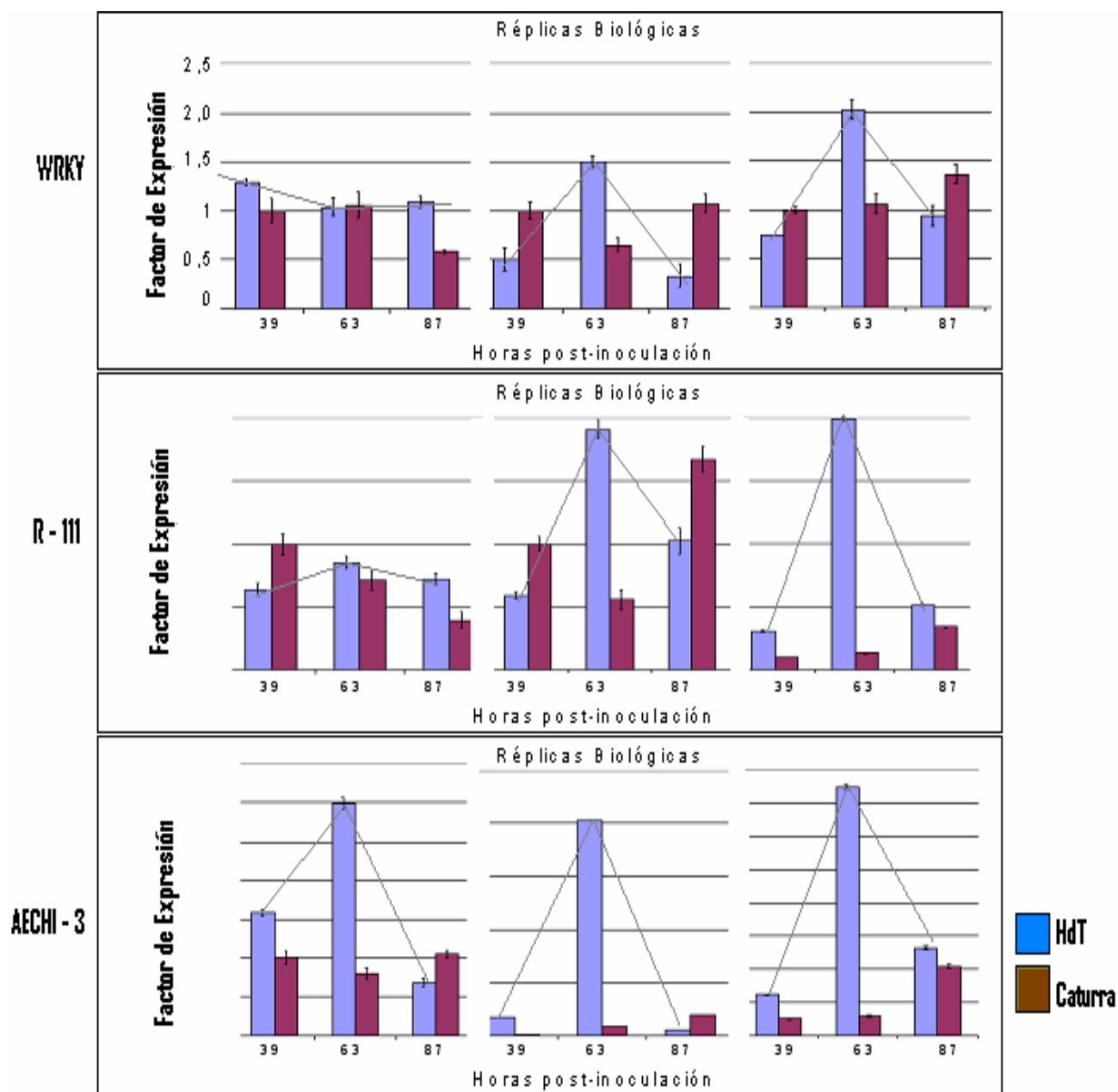
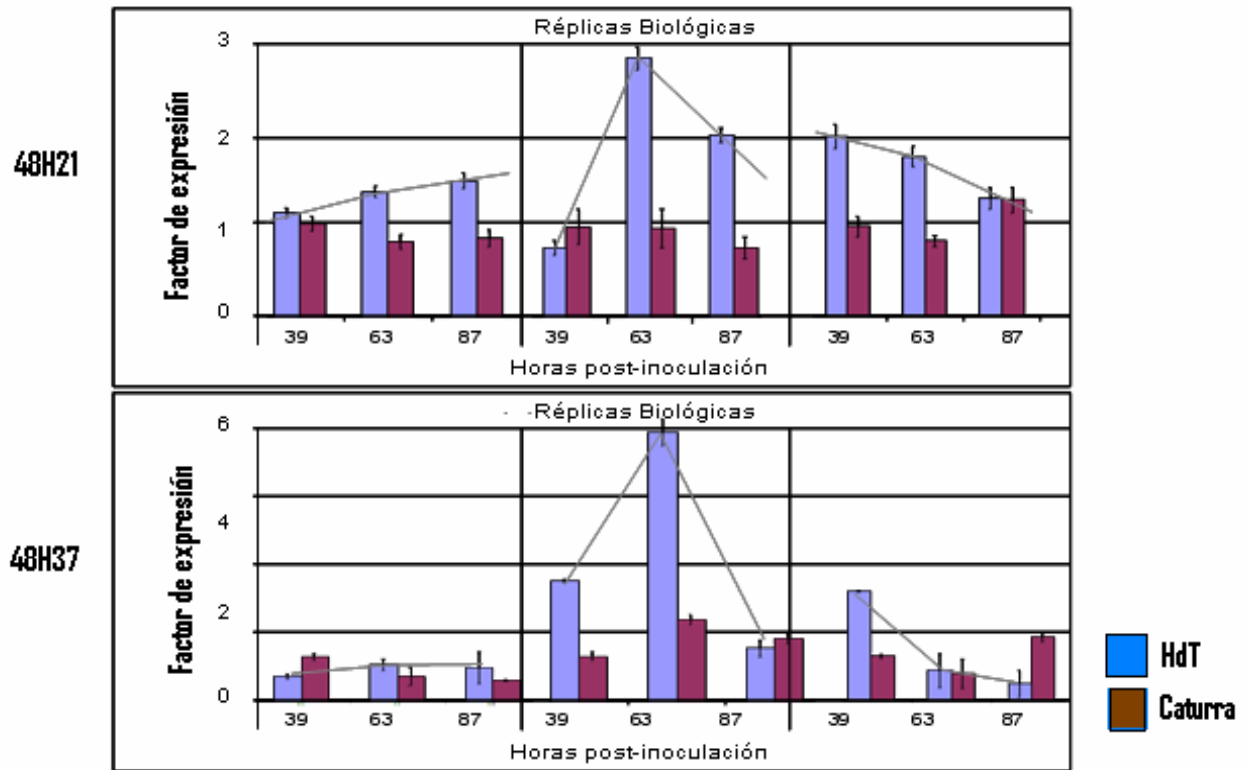


Figura 12. Diagramas de expresión relativa en hojas entre tres réplicas de Híbrido de Timor y Caturra para los genes 48H21(contig 17_18) y 48H37 (contig 7_8) a diferentes tiempos de post-inoculación en condiciones de campo con *H. vastatrix*.



2.4 DISCUSION

Utilizando qRT-PCR se determinó que los genes candidatos provenientes de librerías diferenciales efectivamente se expresan en hojas de los genotipos Híbrido de Timor y Caturra. Sin embargo, en los tiempos post-inoculación con *H. vastatrix* de 39, 63 y 87 horas, solamente se observó inducción de los genes 48H21 y 48H37, especialmente hacia la hora 63 en la planta resistente Híbrido de Timor. Para la hora 87, la inducción en los dos genes se apagó al igual que con otros genes conocidos de la interacción (WRKY, R-111 y Chitinasa AE_CHI3). Los patrones entre réplicas no fueron consistentes

debido a que la planta reacciona a los estímulos del día (temperatura, humedad, insectos, etc.) y las condiciones ambientales en campo no son las mismas entre estos intervalos de tiempo.

A partir de los trabajos de Heath en 1997 y Silva et al. en 1999, puede suponerse que la acumulación de estos transcritos en la hora 63 es debida al reconocimiento del patógeno, dado que en estos momentos se producen las primeras células madre de haustorio (CMH) que interactúan directamente con las células de la epidermis inferior de la hoja. De acuerdo con lo observado en los tiempos de desarrollo de *H. vastatrix* en *C. arabica*, estas células representan el 56% de estructuras activas del hongo después de dos días de infección⁵⁹. En otras plantas la respuesta de defensa en la interacción planta-hongo se presenta ante la formación de los primeros haustorios fúngicos⁶⁰. Igualmente, por la naturaleza biotrófica del patógeno, este debe activar genes en la planta que faciliten su metabolismo, ya sea acelerando la síntesis de carbohidratos, convirtiéndolos a formas asimilables, y aumentando los niveles de señalización de la planta, aún desconocidos⁶¹. En varias interacciones planta – hongo ocurre una expresión diferencial en genes con relación de defensa (relación enzimática, señalización, transcripción) después de la penetración del hongo dentro del estoma de la planta hospedera coincidiendo con la formación del haustorio; en frijol blanco (*Vigna unguiculata*) el patógeno *Uromyces vignae* aumenta la regulación de los genes de frijol después de la penetración de la pared celular en células

⁵⁹ SILVA, M.; NICOLE, M.; RIJO, L.; GEIGER, J.P and RODRIGUES, C.J. Cytochemical aspects of the plant-rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra)-*Hemileia vastatrix* (race III). J. Plant Sci 1999. Vol 160 No. 1 p. 79-91.

⁶⁰ HEATH, M,C. Op. cit. p. 19.

⁶¹ HEATH, M,C. Signal Exchange between higher plants and rust fungi. Can. J. Bot. 1995 73 p. S616-S623.

epidérmicas⁶². En cereales, los hongos *Puccinia graminis tritici* y *P. graminis avenae* activan los genes de defensa en trigo⁶³. En avena la expresión diferencial ocurre cuando las CMH han sido formadas en casi todos los sitios de infección⁶⁴.

La variedad de morfología en hoja entre especies de plantas varía, obligando a la roya a adaptarse a diferentes tipos de reconocimiento⁶⁵. El tipo de función que cumplen estos genes es aún incierta debido a la falta de homología en las bases de datos actualmente disponibles, y a la poca evidencia experimental disponible de los genomas secuenciados⁵³.

Experimentos de silenciamiento de genes por VIGS⁶⁶ o por ARNi (ARN interferente)⁵⁶, podrían ayudar a comprender el papel de estos genes, donde se podría indagar como el patógeno actúa en ausencia de la expresión de estos.

⁶² MOULD, M,J.; XU, T.; BARBARA, M.; ISCOVE, N,N.; HEATH, M,C. cDNAs generated from individual epidermal cells reveal that differential gene expression predicting subsequent resistance or susceptibility to rust fungal infection occurs prior to the fungus entering the cell lumen. *Mol Plant Microbe Interact.* 2003 Vol 16 (9) p.835-45

⁶³ ROSTOKS, N.; STEFFENSON, B,J and KLEINHOF, A. Structure and expression of the barley stem rust resistance gene Rpg1 messenger RNA. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2004. 64 p. 91-101.

⁶⁴ LIN K,C.; BUSHNELL, W,R.; SMITH, A,G and SZABO, L,J .Temporal accumulation patterns of defense response gene transcripts in relation to resistant reactions in oat inoculated with *Puccinia graminis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1998, 52 p. 95- 114.

⁶⁵ NIKS RE and RUBIALES D. Potentially durable resistance mechanisms in plants specialised fungal pathogen. *Euphytica* 2002, 124 p. 201-216.

⁵³ BREYNE, P and ZABEAU, M. *Op. Cit.*,39

⁶⁶ ANANDALAKSHMI, R.; PRUSS, J,G.; GE, X.; MARATHE, R.; MALLORY, C,A.; SMITH, H,T.; and VANCE, B,V. A viral suppressor of silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998 (95) p. 13079 – 13084

⁵⁶ WATERHOUSE, M,P.; GRAHAM, W,M and WANG, B,M. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998 (95) p. 13959 – 13964

CONCLUSIONES

El tipo de función que cumplen estos genes es aún incierta debido a la falta de similitud en las bases de datos actualmente disponibles así como de la poca evidencia experimental de los genomas secuenciados. Puede tratarse de genes novedosos, específicos de las Rubiaceas o del género *Coffea*, que cumplen una función muy específica aún desconocida.

La caracterización funcional en la interacción Roya anaranjada (*Hemileia vastatrix*) y planta del café, mostró que dos de estos genes, 48H21 y 48H37, se inducen a la hora 63 pos-inoculación en la planta resistente Híbrido de Timor postulándose como genes candidatos de defensa. Los 8 genes restantes no mostraron inducción clara pos-inoculación, pero se confirmó que efectivamente las secuencias obtenidas corresponden a genes expresados en las hojas de la planta.

La utilización de técnicas de expresión diferencial, GenomeWalker y PCR en Tiempo Real como herramientas para determinar las bases moleculares de la resistencia del café ante la Roya, sirve como un modelo aplicable para cualquier clase de cultivo donde se quiera identificar genes candidatos de defensa. Estas herramientas complementan estrategias a futuro para el mejoramiento genético de plantas que permitan disminuir los costos de producción por el uso de pesticidas y afectar en menor grado el medio ambiente.

RECOMENDACIONES

Es de interés buscar las regiones promotoras de estos genes e identificar los posibles motivos de nucleótidos asociados a la inducción, de manera que se puedan identificar nuevos genes en las vías metabólicas por la presencia de estos motivos, o modificar la intensidad de la expresión mediante modificaciones por ingeniería genética de estos promotores.

En especial, deben reducirse al mínimo las posibles variaciones en la expresión de RNA de los tejidos estudiados.

- Para esto es importante que las plantas en las cuales se hacen las inoculaciones permanezcan en un lugar donde se las condiciones sean controladas, debido a que cualquier cambio afecta la expresión genética de la planta en tratamiento.
- Adicionalmente, debe especificarse aún más el tipo de tejido que va a estudiarse. En la hoja, y bajo estos tiempos de inducción, el tejido más afectado es la epidermis inferior. Por lo tanto deben buscarse maneras de tomar solo este tipo de tejido para las extracciones de RNA
- Utilizar kits de amplificación de RNA para compensar por las bajas cantidades a obtener de tejidos específicos.

BIBLIOGRAFIA

AGRIOS, G.N. 1997. Plant Pathology. 4th Ed, Academic press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto

ALTSCHUL ,S.F.; THOMAS, L.M.; SCHÄFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W and LIPMAN, D.J. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 1997 Vol.25 p. 3389-3402.

ANANDALAKSHMI, R.; PRUSS, J.G.; GE, X.; MARATHE, R.; MALLORY, C.A.; SMITH, H.T.; and VANCE, B.V. A viral suppressor of silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998 (95) p. 13079 – 13084

ARUMUGANATHAN, K and EARLE, E.D. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biolo. Rep.* 1991 No. 9 p. 208-218

BAKER, K,F and COOK, R,J. Biological control of plant pathogens. W.H Freeman and Co., San Francisco, 433 pp., 1974.

BECKER,S.; MORAES,W,B.; RICO, Q,M. La roya del cafeto conocimiento y control. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH. Eschborn. Cooperación técnica República Federal de Alemania. 1991 p. 112-118.

BENNETZEN, J,L. Comparative Sequence Analysis of Plant Nuclear Genomes: Microcolinearity and Its Many Exceptions. *Plant Cell* 2000 No.12 p. 1021 –1030

BERGELSON, J.; KREITMAN, M.; STAHL, E and TIAN, D. Evolutionary dynamics of plant R-genes. *Science* 2001 No. 292 p. 2281-2285

BERGET, S.M.. Exon recognition in vertebrate splicing. *J. Biol. Chem.* 1995 No.270 p.2411–2414.

BERNATZKY R and TAKSLEY S (1986) Methods for detection of single or low copy sequences in tomato on southern blots. *Plant Mol Biol Rep* 4: 37-41

BREYNE, P and ZABEAU, M Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Curr Opin Plant Biol* 2001 No.4 p.136-142.

CADENA, G. Desarrollos científicos de Cenicafé en la última década. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 2005 Vol 29 p. 89-99.

CARVALHO, A.; MONACO C, L. The breeding of arabica coffee. citado por MORENO, German. Obtención de variedades de café con resistencia durable a enfermedades, usando la diversidad genética como estrategia de mejoramiento. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 2004 Vol 28 p. 187-200

CASTILLO Z, J. y MORENO G, R. La Variedad Colombia: Selección de un cultivar compuesto resistente a la roya del cafeto. Manizales, Centro Nacional De investigaciones del Café. 1986 p. 169.

COLLINS, T,J.; MOERSCHBACHER B,M.; READ N,D. Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signal. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2001 Vol 58. p. 259-266.

ESPINAL, G, C.; MARTINEZ C, H.; ACEVEDO G, X. La cadena del café en Colombia. Documento de trabajo No. 104. Bogota, enero 2006 p. 5-15

FALQUET, L.; PAGNI, M.; BUCHER, P.; HULO, N.; SIGRIST, C.J.; HOFMANN, K and BAIROCH, A. The PROSITE database, its status in 2002. Nucleic Acids Res. 2002 (1):235-248.

FEDERACAFE, Estudios especiales, citado por MORENO, Germán. Obtención de variedades de café con resistencia durable a enfermedades, usando la diversidad genética como estrategia de mejoramiento. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 2004 Vol 28 p. 187-200

FERNANDEZ, B.; CASTILLO, G.J.; BAEZA, A.C.; SIERRAS, S.C.; ARISTIZABAL, B.R. Tercer informe de la misión Técnica “Evaluación de la presencia de la roya del cafeto en Colombia”. Bogotá, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia-Instituto Colombiano Agropecuario. Agosto 31 de 1984. 17p

FERNANDEZ, D.; SANTOS, P.; AGOSTINI, C.; BON, M.C.; PETITOT, A.S.; SILVA, M.; GUERRA, L.; RIBEIRO, A.; ARGOUT, X.; NICOLE, M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). Mol. Plant. Pathol. 2004. 5 (6), 527-536.

FROHMAN, M,A.; DUSH, M,K and MARTIN, G,R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988 Vol. 85, p. 8998-9002.

GANESH,D.; PETITOT, S.; SILVA, M.C.;ALARY,R.; LECOULS, A.C. and FERNANDEZ, D. Monitoring of early molecular resistance responses of

coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. No publicado. Plant Science. 2006

GOODMAN, R,N.; NOVAVACKY A,J. The Hypersensitive Reaction in Plant to Pathogen: a resistance phenomenon. APS Press, St. Paul, Minnesota. 1994

HEATH, M,C. Signal Exchange between higher plants and rust fubgi. Can. J. Bot. 1995 73 p. S616-S623.

HEATH, M,C. Signalling between Pathogenic Rust Fungi and Resistance or Susceptible Host Plants. Annals of Botany 1998. 80 p. 713-720

HIGUCHI, R.; FOKLER, C.; DOLLINGER, G and WATSON, R. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. Bio/Technology 1993;11 p. 1026-1030

INFOSTAT - Software estadístico version 2006. www.infostat.com.arg. Consultado en internet 2006-07-08

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, Oligo Analyzer, [Online] consultado, 2006-03-02, disponible en internet :

<<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>>

KENN N,T. Plant Disease resistance: Progress in basic understanding and practical application. 1999. In: Callow JA (eds), Advances in Botanical Research, pp.291-328. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney.

LALOI, C.; APEL K.; DANON A. Reactive oxygen signalling: the latest news. Curr. Opin. Plant Biol. 2004 7:323-328.

LI, Q.; DASHWOOD, W,M.; ZHONG, X.; AL-FAGEEH, M and DASHWOOD, R,H. Cloning of the rat B-catenin gene (*Ctnnb1*) promoter and its functional analysis compared with the *Catnb* and *CTNNB1* promoters. *Genomics* 2004 No.83 p. 231-242

LIN, K,C.; BUSHNELL, W,R.; SMITH, A,G and SZABO, L,J .Temporal accumulation patterns of defense response gene transcripts in relation to resistant reactions in oat inoculated with *Puccinia graminis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1998, 52 p. 95- 114.

MADDEN, T. The blast sequence analysis tools.NCBI. Agosto 13, 2003 p. 2-6

MORENO R,G y ALVARADO A,G. La variedad Colombia: Veinte años de adopción y comportamiento frente a nuevas razas de la roya del cafeto. *Cenicafé. Chinchina* 2000, Boletín técnico (22): 1-32

MORETTI, T.; KOONS, B and BUDOWLE, B. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *Biotechniques* 1998 ; 25 p. 716-722 .

MOULD, M,J.; XU, T.; BARBARA, M.; ISCOVE, N,N.; HEATH, M,C. cDNAs generated from individual epidermal cells reveal that differential gene expression predicting subsequent resistance or susceptibility to rust fungal infection occurs prior to the fungus entering the cell lumen. *Mol Plant Microbe Interact.* 2003 Vol 16 (9) p.835-45

NIKS, R,E and RUBIALES, D. Potentially durable resistance mechanisms in plants specialised fungal pathogen. *Euphytica* 2002, 124 p. 201-216.

PALMER,S.; WIEGAND, F.; MALDARELLI, H.; MICAN, M.; POLIS, M.; DEWAR, A. New real-time reverse transcriptase-initited PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in Plasma. J. Clin. Microbiol. 2003, 41 p. 4531-4536

PERTEA, M.; LIN, X and SALZBERG, S,L. GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. Nucleic Acids Res. 2001 Vol 29, No. 5 p.1185–1190

PONTING, C. Issues in predictiong protein function from sequence. Briefings in Bioinformatics 2001. Vol 2. No. 1 p. 19-29.

RIVILLAS O, C,; LEGUIZAMON C y GIL V. Recomendaciones para el manejoye la roya del cafeto en Colombia. Cenicafé, Chinchina. Boletin Tecnico No. 19 p. 36

ROJAS, M,L.; MONTES DE GÓMEZ, V.; OCAMPO, C,A. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1993. 43:209-219

ROSTOKS, N.; STEFFENSON, B,J and KLEINHOF, A. Structure and expression of the barley stem rust resistance gene Rpg1 messenger RNA. Physiol. Mol. Plant Pathol. 2004. 64 p. 91-101.

SARASOLA, A,A. La resistencia y la lucha contra las enfermedades de las plantas. En: Fitopatologia. General y control. ED. Hemisferio Sur, Argentina, 1975 p. 125-126,

SIEBERT, P.; CHENCHIK, A.; KELLOGG D.; LUKYANOV K and LUKYANOV, S. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA.. Nucleic Acids Research. 1995 Vol **23**, No. 6 p.1087-1088.

SILVA,M.; NICOLE, M.;RIJO, L.;GEIGER,J.P and RODRIGUES, C.J. Cytochemical aspects of the plant-rust fungus interface during the compatible interaction *Coffea arabica* (cv. Caturra)-*Hemileia vastatrix* (race III). J. Plant Sci 1999. Vol 160 No. 1 p. 79-91.

STAMM, S.; ZHANG, M, Q.; MARR, T, G and. HELFMAN, D, M. A sequence compilation and comparison of exons that are alternatively spliced in neurons. Nucleic Acids Res. 1994. No. 22 p.1515–1526

STASKAWIC, Z, B. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. Plant Physiol. 2001. 125: 73-76

STATES D,J.; GISH, W and ALTSCHUL, S,F. Improved sensitivity of nucleic acid database searches using application specific scoring matrices. Methods 1991 3 p. 66-70

SUMIN, G,U.; HYWEL, L, R.; CAMACHO, P and JEAN, X, J. Identification and characterization of an amino acid transporter expressed differentially in liver PNAS 2000 No. 97 p. 3230 – 3235

USER, Bulletin #2. Relative quantitation of gene expression. December 11, 1997 p. 1-36.

VAN LOON, L, C.; PIERPOINT, W,S.; BOLLER, T.; CONEJERO, V.
Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Mol.
Biol. Rep. 1994 12:245-264.

VÁRZEA, V,M.; RODRIGUES, JR C,J.; MARQUES, D,V.; SILVA, M,C.
International survey of coffee leaf pathotypes. Evolution of virulence in *H.
vastatrix* detected in resistant coffee varieties. 2004. In: Proceedings of the
20th International Conference on Coffee Science (ASIC), Bangalore, India. (in
press).

WATERHOUSE, M,P.; GRAHAM, W,M and WANG, B,M. Virus resistance
and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of
sense and antisense RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998 (95) p. 13959 –
13964

WELLMANN F, I. Peligro de introducción de la *Hemileia* del café a las
Americas. Turrialba 1952 Vol 2 p. 47-50

ANEXOS

Anexo A. Agrupamientos por Tukey de los promedios de expresión de Ubiquitina en Caturra e Híbrido de Timor inoculados con roya y evaluados por qRT-PCR.

Test:Tukey Alfa:=0.01 DMS:=44.55042

Error: 1213.6053 gl: 33

Replicas	Medias	n		
3.00	163.20	12	A	
1.00	199.31	12	A	B
2.00	216.77	12		B

Test:Tukey Alfa:=0.01 DMS:=36.37199

Error: 1598.2033 gl: 34

Genotipos	Medias	n	
HdT	183.06	18	A
Cat	203.12	18	A

Test:Tukey Alfa:=0.01 DMS:=52.47206

Error: 1683.5655 gl: 33

Tiempos	Medias	n	
63.00	184.49	12	A
87.00	190.71	12	A
39.00	204.08	12	A

Anexo C. Nucleótidos obtenidos

>1_2

CGGGCTGGTCCTAGAAATGGTTTGAATCATTAAATTTATGAACGCAATATA
CCAAAATCTTTAAACGTGCAATAGCCTATCTACAAGGGTAGGTCTTAAAA
GAAGGCCATGCCAGACCTCTTATTTCTTAATGTTTGTGAATGCCAAAAAC
AAAAACAAGGAAACGTGAGCTCAACACATAATCACATAACACATTTGGA
CAAATAGATAAATATAAAAGGCAATAAAGATAAAATAAGAAAAGAGGGTTGG
GACCCCTCCCCTCGTGAATAGTGTCCCTAGTTCAGGATAATGGCTAACTC
TACCCTAGGCAATTCTAATATGAATGCCATGAGGCTTGGCTTACTAATGCA
TCTAGACTCGATAGGTATAGGCCCCGAGCCTTCAGACTTAGAAACCAA
GGGTCAATCAATCCCAAGGTTCTTTGTGCGGTGGCTCGAGCGATTCCCCAAA
CACCGCTACGCACACATCGTGTACGGCTACGTGTTTGTGAGTGAATCTATC
AAAACCTCAATCTTCGACCAAAGCTAAAGGCTATCAACCAATAGCTTTA
AGCGGAAGATTGAGTGACCCATTGGAACATGCTACACACACATCGTGTGCG
TGATCACATGTCCAAGTGAGTCACTTAATCCTAATAGGGTGGAGTGGCGT
GACCTGCCCGG

>3_4 (1)

ACTATAGGGCACGCGTGGTTGCTCAAATAACCCTTGCCAAGCAAGTAGGA
ATGTACTCTCGAAATTGTAAGAGAACAAATTGAAATTTTATTATCAAAAAG
TGTCTAACCTTTGCTGGTACAAAAGGCGCCTTTTATAGGCTAGAAACCT
TTGTGGTCAAGGATTGGCGGCCACCAACCTAAACTAGAAAAGGAGCTCG
ATCCACTCTTGAAACATGAGTGGGCCGATTGTTTACTCCAATAACTAATA
AACTATTAATTAACACGACTAACAAACCACTAACAACTAATGACTCG
ATAATGATCAAAACCACTAACAACTCATACTGACTAACAACTAATGACTCG
CCTAGTGCTCGGCCAAGTAGCTAAGGCCGCGCTTGATGCTTCTTGTACT
TGGATCAATGTGTAGATGCCTTGATTAGCAACTTCCAAGCCTTCAATGTT
CCTATGGAAGCCTTGAGTCAAGGCCGCCATCCGTGCACACATCAGTCCCC
TCCACTTGAGAAGGATTTGTCTTCAAATCTGGATGGAAATGAATGATACC
AGCCCGGGCCGTGACCCACGCGTGCCTTATAG

>3-4 (2)

TACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGTATCAGATAGGAGA
CCAAGTCGAGATGAAGTCACCCTGAGAAAAGCTAAGGCTGGCCTCGGGAG
GTGAGGCAATGAGCCGAGGTGATACGGGACTCATGAAGATCACCTTGCCC
AGTCGCGAAACCGAAGAGGGCCGAGGTGGACGCCCTCAGTGTGCTAACAA
AATGAGTCTAAAGCCAACATAGAAGTACCACTATTATTGTAGAATGTTTT
TGCCCTAAAAATTTGGAACAATTCTAACTCAAACCTTGTGATCTTATTTGA
AGCTGATTTAAAAAAAATTTGTGAATATCTTCGTCAACTTCAAATCTCA
AGTCCAAACCCGCCCGACATTATTTCTTGTGGATCTGATTTCACTATTA
CACATCATCTCTCTGTTTTCTTGCTTTCTTGTCTCATGAGAGGCCGTAA

>5_6 (1)

CGGGCTGGTCCTATTATCTACTTTTTTTTGTAGAGGCTGATCGGCTTAGAT
CAGAGTAAAGCCAGAAGACCGGAGAGAAGTAAACATTCTATATTGAGTAA
GAGTTTTTCTTTTCCCTTATTTCCACGGCTAAGAGTAAGAGAGTTAGTTT
CCAAGTGTGTAACCTAAGCCGCGTAAGGAGCTCGGGAGGCAAGAACTCA

AGCAAGAGAAGAAGCCGCATCCCCTTGATATTGAGTTTGAGTTTCTTTTAT
CAGCTAGACCTGTAACCTAACCCCGATAGGGGAACCAATCCATATATATG
AATACCCCTCTTAGGTCGGTTTACGCCAAAGCAACTACTAAAACAAAGAA
TCATTCCCTTCCAACACGAGTGGGATCGCTTCGTTTCGGATGCCGTCCCCCA
AGAGCCAAAGATCTTCTCTTTACAGCAGGAATCTTTCTTGCTCTTCAG
CTCGAGTTTCGAGTTAGGAAGCTATGAGTTTGAGTTTGAGTTTCGAGTAAAT
AACACCAGATGTAACCTAAAGAAAAGAAAAGAAGCTCAAGCGCTAGCGGCTT
TTAAGAATGAATCCCTCCGGATCGCTCTCTTTTAGGTTACCACTTGG

>5_6(2)

CTGAATCAGGTTAGGATACGGCTCTAGAAGCTTCTGCTTTCTTGTCTCAT
GAGAGGCCGTAGCCGTGAATGGAGCAGCAGAAAGGGCTACTAGATCGGGA
AGTGCCTTAAGAAGGGCACATTCTTTGCTTGCTTGGTGAACCTCCGACTG
AACTGAAAGAAGTTGGCTTTAGGGGTGTACTAGAATAAATGAATTAATTG
GTAGGAGAAATGGCCTTTGTTAAAGCAGCAGAGTCAGGACCCTCATTTCAT
CTGCAAGGGAAGAGATTGAATTAGGAGTTGATAAGGCGCTCCCAAGGGAA
GAGGAGATTTGATTCAATTACCTGTAGTAAGTGAAAGCGGGAGGAGAGAT
TACATGAGCTTCTGGGGAAAGAGTTGCTTGAGTTGAAGCGGCTTTACCAT
GACTTTTCATCTCATGTCAACAACCCCGTCAAAAAAAGAAGCTTGCAACC
CGATTTCTAAACGTAGCTGGTGAGTGCGCATCTCCTCTGTTGTTAGAACA
GGTTGTCAGATCCACATTGCCATAGTTCTTCGAAGAGGGGGACAAAACAA
GGGCGTATCGGCATCCATCGGCTTTCTTGCTTGGATTGCTTGTTCGATAT
GTTAGTTAGATAGTCTATACTGCTTTACCAACTTGACTTCCTTTTCAATG
AGATCAATGAGCTAGGACTGCCTTGGGGAAGGTAGTCCGTAGCGGGGATA
GAGACGAGCAAGTTGACTCCGCCGACTGAGATGAAGGTGAAAGAGAGAGC
GAAGAGTTCTGAGTGAAGTTGCTAACATAGGAACTAGGGATTCCCTTACT
TATTTGAGAACGTTTCGTGCCCTTGCAGAAAGGGTTACTGCTCTCCGTAGT
TGGGACCGGTAGATTCACTCCGGGATTCATTTCAATTCACGGTTCGTATCG
AATTCCTTCTTTTCGGGGTA

>7_8

CGGGCTGGTATCCTGGGGGGTGGATATGGTGGTACCCTGGTGGTGGTTAC
GGTGGATATTGCCGCTTTTATTGTTGCAGCTGAAGCTGTTAAGGTAGGGG
TTGCAGGTGCTGCCCATATCCTGGTACGCTGAGGATACTGAGCATCAGA
ACTAACACAAATAAGTGCTTGAGAAGTGATGTAATATTCAGTGTATGTAT
TTGCTAGTTCGACAGGAGAAGGTGGGTTTGACGGTAAGGTGAGAAGAAT
CATAATTAGAATATCTTATATTCAAGACCTTTTACTTATAAAAAAAATTT
ATGTGTCTCTTTTATGAGTATTTTTGTGTCATGGCAAAACAATCTCATGC
TACATGAAGTCTTTTTTTTTTAAATTAATAGGGATAACCATCCCTTAATAT
ATTAAAAACCAAAAAAATACATCAAATTAGAGGGGGGCTGCTACATGAA
GTCATTTTAGTGGCTTTGCACCAAAAAATTTGTAATTTTAGTAGTTCAAA
TGTACAACAATTTCAAGGCTAAATTTGGTACGTTGGTTCATCTATAAATC
AGTTAACCATCTTAAAAGTAGTTTTTATTTTTTATTTTTGCAATTTTAAAT
ATACATAATCAACTAATCTAATCCCAATATTTGTGATAATAGCTTTTACA
AACTCACTATCTATCCGGTTTTGTTAAGTGTGTTGATTAATAAATAGATTTA
AAAAAAACCTTATCTTCCCCTCTGTCAAATATAATATAGGAGCTGAAA
AGAAATGATAAAACCAATATTTAATCTAGCCATAACCAAAATCATGTCA
AAAGGACAAGGAGATTTTGATTATTTAACTAGTTTAAATTTCAAGAAAG
TTAAAAGTCTAATGACTAGCTGACTACAAGAGCGCAATTTATCCTATAC
AGAAAAAGTATGAGTACACTGAATTTGAGACTCGAGGACGTATAATGATC

AGTTCAAAGGAAGGGGTCCGGTAATTAATTGTAGCATGTCGTTTTTCCAAT
ATCAGGAACATGACTATCCAATTTTATAAGCTTTAACAGCACGATACACT
AAATAAATTCAAAAACATGACTTTGTTCTTGCCTGAAGTTTGTGCTC
AAATGACAAAACACTGTCTCTAGATCTACTAGTAAATGATCACAAAAGGAGC
TTTACCCCTTTTGGCATTCTTTTTCTGTCTGAAAGGAGTCAAGGCTTAA
GATAGTGTAGCTTTTGGGAATCTCTTGTGAAACCTCGAAGTGTAAAAA
ATTTCTCAGCAAATGTTCTTGAATTATTTGGGTATAATTTAGATTTAGAC
AACGAAGCATGTGAGTATATTTGTGAATCCAAGCAGAAGTAATGGCTGTT
GAAACTTGAAACACGCATAAGATTTCAATTTACACCTCATTGAAGTTGAGA
AAAGTACATCATCATTTGCAGTGATTACCTGATGGTGAATTCGATACCA
CTGATAAAGCTCTTATTCTTATCACACAATACATAATTTTATTACTTTTA
AGCCTCTTAATTTGGACCAAAGGCATTTAAGCGCCATGATCCATACGTCC
TGGCTATTAGTTTTGCGGTTTTGGTTTTCTGGCTCAGTGTAACCAGCGTCT
TTGGCTCACCAGCATATGTGCAGCATCTGCAGCCTCCATGTCCGTAGCCA
TAGCCGCCGCCACCACCACAATGGCCTCCATAACAACCGCCGCCACC
ACCATACTTGGATTCTTCCAGGCCTTCACTACTCTTCTCTCCTGCATTGG
CTGCAAATAGTCACGGGATCATGCAGAACTATTTAGTTAGTACCAATATT
TTTTTTAAAAGGAAAAAAGGGTCTTGAGGAATTCATGTTTTGCAGGTAT
AAAATTGTTGATAAAGGAAAGAGTAGGTTATTGAATGGATAGCTAACTAT
TTTCGGTCACTTTAAAAAAGCTTACTATTTTCGGCCAAATCC
CTGGCTGTCACCTCTGAGGCAATCATTAGAAGTCTGCCAAAAGGCATAG
GAGGAGAATTGCCTTGGAACCCATTTTTGTTTTCTCACACAAATTGGTT
TACGAACTGAAGAATTGGAGTTGAGAACAAATGAGAAGGCTGAGGAAGCTG
GAGCATCCTCTTCTCTATTTATAGGGAATTTACGTGACATGTTTCACGA
TGGAGAGATAAACTATGCATGGAAATGTTTCGACCGCACGATTTAGTCGG
TGGTTGAAGATAATTATGATGCCATATGTGATAAGAATATCCGACACAGA
CGGAGCCAAAAGTTTTGCTTCGGGGGTAAATAATGGAGAGCTTGAAATA
CAAAGAATGTAAACAACGAAAGTATCACAAATTGTGATTCTGAATTCAAA
ATAGCATAACTAGCATTTTAGTGAAAGGATAAGTCTGAAGCAAATAAATT
ATAATAAAATTCAATACAATTCTGCTCTTTATTAATGAGAGTGTTATACA
ACGAAAAATATTACTTTTATTATCATTCACTATATCGAAACGTATTATTGG
ATTTACTTTTTTACAAAAATTATCCTAGAATTCAAGAGTATCAAGTTTGAT
TTGATATTAAGTAAGATAACCATAAAAAAATCGCTTAAACCATATTGCA
TTAAAGTTAGTTGTTAGGAAGAATAACTATATGGCTAAGAATAATTGT
TTAAATAGAGAATTACTGACGATTGAAAAGAATAATAGAAGAATTTCTAA
AGAAAAAACCTTAAAGATAGGACTTGCCTTAGTGACTTAAAGTTGGAA
TTTGGAGATTGATAGATAGAGTTGAACACAAGATGGTCTAACTTTTTGTG
TTTCTCACAAATGACATTTTGGCAGTTGTGTCTGTTACAATGACTATCAAT
GACATTTTAATTTTTTTATTTTCGGTTGTATTTTCATTTTATATATATTAT
ATCTATTTTAAGTGATAACCAGCCCG

>9_10

ACC[~]GGATGAGGAGGTGGTGGTGGTACTTATACTTGTA[~]AACTGGGTGTGG
TGGTGGGGTGGTGGAGATTTGTACTTGTA[~]AACAGGATGAGGTGGAGGTA
TATGCACTGGAGGTGGTGGTGGGATAGTGGTAAGGAGGAGGAGGAGAT
GAATACTTGTAGTGATCATCAGCTGCAGTTTCTGAGGGCAAGCCAAGAGC
AACAAACACCACTAAAACAGTGGCAAGAAGAGGAGTCAGCCCAGACCCCA
TTGCTTTTGCTTTGCTTCCCATCTTAACTACAAATTCTTGTTTTAGGCTG
ATATGCTTCTAGGCAGCCTCTATTTCCCTTTTTTATAGCACTCAGTGCCTT
CATTTTTAACTCCCAAGGCTCGGAGGATGTAAGCATGGTAAGTCTTTTTA
CAGCTCTCAACAAC[~]TTAGAAAAGTAAAAAATCTTTTGCAGGTGGAATG

GGTTGTCCTCAAACCTGTGCTTTGACAGATTTGACAAACGTGAATGTTTCAT
TATTC AATTGTGTTAGGTGGAGGGTTATGCTCTAAAGTTTTGAATCGTAA
GCTATATAATAACATGTGTTTCGTACTTTTTTTG CAGCTTAGCCATGCAAT
GACTTGGAATATTATCGTGTGAATGCGATCGATTTTCGCAATATTGTACT
ATCTATGAAAAGTAGACCGGATGCAGCCGGCTCCCCCTCTACCTCTATT
ACCAATCCTATCAAGAAGGATTGAATCACACATGCCATAGAAGCTGGGTG
GGGAATGGTGGCCAGGGATTGGTTGGGAAGATTGCGGGGGCCTGGGCTGT
TCCAAATTTTAGCTGTGCCAGTCCAAAGGT CGAAGAAGCAAAGGCGCTAA
GGACCAGCCCG

>11_12

CGGGCTGGTCCTCATATCGAGCTTGTGCTTTTTCTTTTTTAGAGGATTTT
ACTGATTCAATTGCACCTCCCTCACAGCTTGCATTTCGATGCATCCACCTT
CCTCCTCTCCTTTTCAGTCGACCGCTCCTTCTGGAACAACCGATTCTGTAA
GAAAGGCGAATCTATCTAAAGAAAAGAAAGGGAGCAAGAAAAGGGATGTT
TATGATTGGTTTACATCGAAAAACCAGGATTTGTCCAATCAAACACGGG
AACAAAGAGT CGAATCACGGGAGTTTACTTGTCCGTCAACCTTTTTTATA
TTATAGGAAAAAACACTGAATTCTTAGACCTTTCCGTTTCAAAGTAAAG
AGTATAGCATAGGATCCTGATCTCTGTTTCTCACTGGAGACTATTGCAAT
GGTGTAAAGACCAAAGATCTACTAACGTCTTTTTTAGTGGCCTTACTCCCTC
TCCGGTGTAGCTGCATCCCCGGAACCTTGCCCTAATCTGCAGATCTCGAT
CCCTGGAGTACTCTTATCTTTCCGCTGATGGAAAGATGCTTGGTTCAGTC
GTTTCTATGCCCTTTCTCCAGAGGGAGGGCCGAATGGCTGACTTACCGA
GCCTGCAGGGCCTATGAACACTCTTACACAGGAGATTGCACTTGGACATG
TGCTTACCCCTCTTCTTCCCAACAGAAATCGATTTCTTTTTCGGCTTTTC
CGGACCCAATTGAAATCTTTTTATTTCAATTTCTATTTTTAGCTCAGGGAA
GCTGCTAGCTACCTTAAACCAAGCTTTTCGGCCATTGAACGAGGATTATGG
GCCTTAGCTCGGGCTCTATCTCTTAAAGGCGAACTAGCTGACATTCTAAA
TGAGTCTTCTTTTCAATTCGTCTTCTGGGCATGGAAGAACAAGAGGGGAGG
TAAAGAACACAATCTTGATGATTGGTCTAAGTAGACAAGCCATAAAGAAA
AATATGGTTTTATCCAAAAGTGGTGAGAGATGAAAGGTTTTGTAGAAGAA
ATCCATAGAGGGGGAGAGCCATAGAAGGGCCTTAGCCCAGGTTCCGGGCAT
TACAAAGGCAAGCATCTCCTACCTTGTACGTATGAGGGGAAGATGAAATG
CAGCTATAGAAAGAGCTGGTCTTATCGAACCGGAAGAGTGTGGCATGGT
AAGGTTTTGGCCCTGGTGTATAAACCGAAGCGGAACCAAGCTACTCTTTT
TGTGCTACCCACAGATTCAAGTTTACTGGCTGATTTCGCTTACTGAAGAGA
GAAGGAATGGGACAGGTGTGGACAGAGTAGTTCTCCCAAGTCTGGTCTT
GGCTTTCTTATGGCTGAAGAAGGATCGGGGCTTGACGAGCTTCGGTTCGCT
CTCTATAGTTTTTTTTCGCGAGTCATCTGTGCACTCAATAGGTAGAGCAAG
AGGAATGGGTTTCGGGTGAGCAATGAATCTACTCGCGCTTACTTACTCTAG
TTGGTAGTTCAAGCTCGCCTCTAGGTACCCCTTACTGCTACTGCTTGAGT
AAGCTCCTCTCTCCGAGACTTTTTTTTTTGACAGCCGACAAACGTAGGCT
TTGAATTGCATTTATACTGGCTACAAAATGAGGAAATTTCACTCTCATTGG
CATCTTTCTTTGTTTCCGTACCGTGATCTGCGCCCTTATAAGAAAGCCCT
TACGTGGCCTTTTTGTA CTAGCTTACCGCCTGAACTAGAGCTAGAAGCCGA
ACTGCTTACCTACAGTTCATTTTTCCAGTTTTCTAACCGAAAGAGGATAG
GAAGAGGTTTAGGGAATGGGACCAGGATCGGACATTCAGTTCAAGGTGGA
GAACCGGTTTCATCACAGCAA ACTACTTGTCTTTGGGGTTACCTTCCATTC
ATTA AACAGATT CAGATACGATTGGAGTCACTTGACAGAGGCATCTCTA
TTGGATCCCCGGGTTGGCACTAAAGAAGGAGGAAAGTGAGAGACTTATAA
TGAATTTTCTACGATAGGGGCAGGTGCAAAACGCATAGGAGAGAGGTGCA

TTCCATCCTGCTCTCACCAGCCTATGCTGGGAGTACGGTTTCTTAGGTAC
CATTTTTTGTACCATAGTAGGAAAGCTTGTCTTTACAGAGCTCGATCCGT
TGAGAAGGCTTGTTTCAGTCACTCTCGCTTACTTGCCTGCTGGCTAATGGC
TTTCCTTATTGACTTTTCGCTTTCTTGCTCTTGTCTTAGGCTAGCT

>13_14 (1)

TTCGATACTATAGGGCACGCGTGCGGAAAGGCAACGGAAACGGCCAGATT
TGGCACCAAAAACCGTTTTGATCAAAAGTTTGGCTGGGAATGTCGGATCA
AAGTGGGTGAGACACCGCTTTCGAAGCTATGAGGAAGGGCTACCATTCTCA
TGAAGACACCTTAATCTAGATCTGAATGGAAGCAGGTGCAAATTATGGAA
AACAGTACCAGAAATTTACGTGTTTCGGGGTGACAAACAGGGTTTGTTCG
TGGACCATAACTCACAGCTCACAAATCCAAATCAAGAAATTCCAAAGGCG
TTGGAAAGCTAGGACATAAGGCTATAACTTTTCAGTTTTGGATCAAAAGCT
GAATCAATACAGAGCATGGAGAAAAATGGGTCCAAACATTCCTGTCAGAA
CTGTCCAAATTCGAAGGCAGTTCTGACAACCGATCTTGTTCCTGTCACAA
CTGGAGCTACGGGACTCGGATTTGGATGAAATTTATAACCGTTTTCGAAGCT
GAAATCAAGATCTATATTTCTTATGAAGGGGTCAACACCCATATCGTACG
TTATCAAAACAGACAAAAACAGGGCAGAAGCTAAATGCAGAACGTACGTAA
ATTCCAGGGTACAAAAACAGGTGCGAGTGTTCCTGGCTATAACTCGGGTTAC
CTCAGTCCAAATCAAGTAATTCGAAAACCATATGAAAGCTAAGAAACAGG
GATACATTTTCATCAGAAGGACCAGCCCGGGCCGTCGACCACGCGTGCCCT
ATAGT

>13_14 (2)

ACTATAGGGCACGCGTGGTTACGGAAATAACACATCCGAGGCTACGCTTA
TCGGATTGAGGCGCAACTTATGCCGTTTTCGAAGCTAAGACACAGGGCTAC
AATGTTTCATGAAGATCACTTAGTCCAGTTTCCAATGAAACCTAGTCAAAT
CCTCAATTTACAGAACCAAAATCCAAGTTCGCGTATCTAACCGCACTG
CACTGGAATGGTCATATCTCCGATTACCACGGTCCATTTAGGGTGTTCCT
GTAGGCGTTGGAAAGATTAACACAGAGTACTAAACCTTTCATGTTTTGGGA
AAAAGCTAAATCAGCATGGATCCTAGTGAACAAACATGATAAACTGGATG
AACTGACGAAAACGGAACTGGAAATTTCTTAAATAGTGAGGGTATTT
TGGTCTTTTCACAGGTTACGTTGCTCCGATTGAGCTGAACATTTTTAGCC
ACCTATAAAATACCATTATATACAACTTTCATGTTTTAACCTAAGGCCAA
TTAGGACCAGCCCC

>15_16 (1)

TACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGTCCTCCAACCTCTCG
AATCCTAACTCCCCTGGCCTCAGAAGGTAGCCTGAAGGCGCTCTATCTCTG
AGTGGCACCTACGATTGGCGCTACCCAATCGTCGCCGCTCGTCGTCCACG
GCAAGCACTACCCGATCGGGGTAGGAGTAGGTCTTCCAGCAGTCGCAGCG
TCGAATCTTGCACGCTGGGGACCACCGCTGCACTGGCCCACCGGGGCTCT
CCTGATACGTGATCACACGGCTAACAGGCCCTCTAGGTACGGCTCGTCA
ATAGGAGCGTCAGTAGGCGCGTCAGTCGGTAAGCCAGTCAGCACAGGCTG
GGACGACCCCGCACTCCCAGAAGCGTCAGCGTCTGCCATCACCTAAGTTT
GCAAATAACATTGCAAAAGTAAGTACGCAACACGTAGAAAACAAGGCTAA
AGGCTAAGCTCAAGGATAAAAYCCTAGCCAATCGTATCAAGTACCCAATC
TACCTAGATCAATTCACAACCTAGGCTCTGATAACACCTGTGACGACCCC
ACCTCCCCCTAAGGCGTACCAGAGGGTTCGGCGGACCGCCTGCCCAACAC
TCGCCAGGACTCACTCACTCGAATCACGTGCACACAACCATGAACCATAA

ATAACATTCCCAATTCAAGCTTATAATTTATGGATAGGAAATCAAGGTAC
AAAATCTCGATATACCCAACTAGTTCAAAGTGTATACAGTCCAAGAACA
AAACATTCCATTCAAGGAATAGCGCGAGTACTAGTCAAAAAGTCAAA

>15_16(2)

TACTATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGTCCTTCTGATGAAA
TG TAGCCCTGTTTTCTTAGATTTT CAGTAGGCTTTGGAATTTATGGATTTGG
ACTTGGAGAGCCTGAGTTATGATGTTTCCGCTAGAATGCGTTCAACTTAG
TCCCAATACCTCTTGCATCTTTTGCCAGAACCCTCGAAACAAATCTCGGA
TCCCTGTCAGACACGATACTTACAGGTATTCCATGCAACCTGATGATCTC
ATCCAAATACTGTGACGACCCACCTCTCCCTAAGGCGTACCAAAGGGCT
CGGCGGACCACCTGCCAGCTCTCGCCAGGACTCACTCACTAACTCACGC
GAATCACGAACATACACATCACCCATGAACCATAAATAATATCCGAAATT
CAAGCTTATAATTTACATTGATAGAAATCAAGGTACAAAGTCTCGAAATA
CTTAAACTAGTTCAAAGGTATACAATCCAAGTACAAAATGTTCCATTTCG
AGGAATAGCGCGAGTACAAAACCAAATTCAAAACAAAGTCTAAAGTAAC
TAGACTACGCTAGCCTTTACACTTCTCGCACTTCACTCGTACCCCTGTAA
GGAAAACAAAATAATAGGGTGAGCCAAAGCTCAGTGAAGTTCCAAATAT
CAAATTGGCCAACACAGTAAAGAATAACATAGTAATAGTGAAATAGCGAG
CAAACAAATCAAATCAGGTAAATAGTACTTCAACTAGCCAAGTAATATCA
GGTTGGCATTTCATATACAAGGATACGGTATTTCATATCTCGGCTCTATTCC
AACTTGATCAATGAGTAGTTGACTCTCCGTCAACTTTCAAGTAATAACAA
ATCCAAAATAAAACTTCACTACACGCCAATCCCCGTCCACCGATCAACTC
CCTTTTTTCGGGCCCGCACGCCACACGAAACACGGGTGGTAATACTCGAGT
ATACCGGATTGCGAGGAGATAACACTCCACTCGACTTAACTAGTAACCCA
GGGTTTCGTTATCTAATCGACCAGACCCTTGCCGGCTCGACTCGATTAAC
AGCCACAGGGTTTCTGAAATTCAGACAAGATACAATTCATATGCATGTA
TATCAATTCATTTGAAATCGATGAACAAGAACAAGTTACATTAGGGCAAG
TGCGATAAAGTACACTCTTGCCCTATCAATCCACTTATATAACATGTAAT
CACATTGGTTCACATATTAACACAAGTATCAAGTTCAATTTGGTATTTGA
AAACGCTCACCAAAAGATGTCATGCCTTTACAAGTACGTTTCGGGTATCA
CTCCGGGTTTGGAGTCCAAATCTGCGATAAAAACATTGTTTAAAGAGCTTTC
AAAAGTAACTAAGTTTCGAAACTTAAACGTTTTCGTTTAAACGAGAATCAAG
TAATTGAAACTCATTAGAGAGTATTCGTAAAACTTATACTCGCTCTTCA
AACTTTGGGACTTTGAAGCAATTATACTTTGAAATACCATTTGAGTCGTA
GAAATGGAGAAAAATATTTCTATTAGTCATAAATTTTCAATTTTTTCAAGG
GTACAAGTTTCGGCCAAACGCTAACTTACAGACCTCTATGAAACAAGACT
TGAATACCCTACGATTCTAGTAAGATTTCGTTCCCGAATTCGTA CTCAAGT
CGCGAGTACCTCTACCTAACCTCGAGTGTAATTTGGGCAGTACGCCCT
TTGTGTTTACCTATTTTTTCAGCCATTTATGGCTTCATTATTTTTCTGAAT
TCAGTCTCAAAACACATACAGATAATCAATCTCATCACAATAGCCGTTCA
ATAGGCTCAAAATCATCCAAGTACAACACAAGTAT

>17_18

CGGGCTGGTATCGATAGCCCAAGGCAACCCAAAAAAGGGGATAAAAAGCC
AGGCAGGCAAGAGGCACCAGAATCTTCTAGACTCTGGATTTTTTCGGTCGA
GACGCTGCTGCTTCGGCTACTGCAATTCAGTCGGAGTTATATATAGTAGA
AGTAAACCCTATATAGGGTTTTAGTAGCATATAATCACCGTCATAACCCCT
TGCCCCCTCCGTGCCGGGGGGCAAAGGACAATAGGTAGCCTTTCTCTTC

CAATATAGTTTTGGTTTAGATGGGAGCTCTGGAGAGGTGAGATTTTTGGTT
TTGCACAAGCCATCCAACCCATCATATATGCTAGTATAAAGATTCTGTTA
GCTACTCTCCGGTGGTGTGGGTGGCTTGTGCAAAATCCACAATCTTTTC
CTCTTTCTCACTTTATTTTTTTTTTAAATTGTCCAACGCGGCAAATCCAGT
GATTGTGAAAAAGGTAAAGCTGTTTCAGTTTTTTTTTAAAAAAATTTTTT
CTGATTAATGTGTGTCCAGGTGAGTTGTGCGGGCTTGCAGGTTTGAAGGAA
GGAGGATGATTTTGACGGCATAGACGGTCCATTGATTTGTGGCCTTTATT
CTATATGTACTGATAAATTTGGACTCCGGCGGTGTTCTGTTGTCTGGTCA
CATCTTGCCTTCTCCCCATGGCTTCAATTGAAGGAATTCTCTGCTTGTAT
GACAGGATGTACTTTTTCATAGTCCCTTCCTATCTCTGTTAGTGGTGATT
ATATTTAGAAATTTGTAAAGCAATAATCGAATGCATTTTGAGAGTTCGAGT
ACTCAATTCAGAAACATTTTGATATAAATTCAGTCAATCTTCTTTCTTCT
GATCTACTATTTGAACCATATGTTAACCGACAAGGTAACAAATTTGTGTGT
TTTGTAAACCTCATCATTTCAGATCTGCTAGCCCATCTGGTTCCCTTGCT
GCAGATCTTTTTTCTAGAAAATTACGACGAAGAAAGATCCGGGTTTAAAT
GCCTTGAACCGCAGACTACAATTGACAGTCAGATCTGGCCCAGGAGATTC
AAATTTGCATAGGACGGCTCCGGTTTTTTTTTTGGGGAGACTCTTATATG
ATAAATCAAGAAATTTATTTGTATGGTGCAGTTCGCAACAGGCACCGGCCCA
AATCCGACGAAGAGGGCTAAACTTTTCTATAGAACATATTTGTTCCGCACT
ATACACGCATTTCAACGATGAGATTTACGTATGTCAAGATTCACAGTAAC
ATCTTTCAAGAACAAAACAGCTGCAAATAACTCTTCCAAAAAACGAAAA
AGTAGGCAGCTGCAACCGGACAACGTTTGCATTTTAAAGGAAAAGGTCTCT
ACGGTTTTCCGGGAATACGACTAATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TTTGGCCTGCTGCAACTAATTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTGCAACTAACAGAACCTTTCCAATAAAGCCTGTGTGAAGTCCAACAGCC
ACTGCCGCTCCACCGATAGCTACCCACCTCCAATCAATTCACCGTCATT
CTTGTGGCACTGGATGTCCCTTCTGTTAGCTTGTCTTCTTCTTCTTCTTCT
TTGGCTCTAATAAGGCGTAAGCGCCCTCATCAGAAGAAATTTCTTGTGGTG
ATCCTTGCCATCAGAGCACACCTGGATGGTGATTCTTCTGACCTCCTCGC
GATCTGGTATGCTCTTAAGCCAGCATGCAATTTCTTAACAGTTCCCCACA
TCCCATGACGTACACCAAGTTTAGCCACGTCCCTGGGGATCCCCATATCT
TCATAGTGGACTAGCATCACCTCACATGCAGACAACCTGGCCATCCCCTTT
AAGTGATTGCACTACACCCATATCATGAAGATAAAAAATTAGTAGACGCG
GTCAATGAATCTCACTGATGTATGAGTTACCCGGCAGTACTTACCAGGCT
TAATAATCCAGCTGGAAAAGTATAAATCAACACGCCTAGGTCTGTCTCTT
CTAGGCACAGCCGGATGCGGTACTCCCTGGTGTGATGCAGCGAACAGAAGTG
TCATGAAGAAGTACCAATATTTGCAACATGGAGCTAAATTTATGAGAAAA
ATAAGTCAGCAGTTCATAGTGTGTCGCAACAGCATGAAGTTGCAAATAAG
AATTCCCAATAATATGCAAATTCATACCTTGGTTACACAATAGTATGTT
CCCCAGCTTCCCATATCCTTCTTCCAATAATATATTCTCTGTCACTGCA
AAAAAAGGGAAACTGCATACCAGAACCACAGAAGAATCCCATCAGTTTGTAG
AACTATTTGACCAGATGAGAACTTATGATAATTATTGCAGCAAACTGA
TATGGGGCTTATCATCAACAAACCTTTTTAGTCCAGCGTACTATCATGGT
CCCATTAAGGGGGCACTCCTCCAAGATTTTCGACAGACAAAATCATGGGAT
CCCATTTAAGACGGAACTCATCATCCAGAAGAAATCTCTGACTAAATCA
GGAGTTGCATCTTCAA

>19_20(1)
TACTATAGGGCACGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGTATCTAAATATCAC
ATCTGAATACTAAATTAATAAATATTAATAATCGCAAACTATTTTCAAAG

AGGATACAGACCTTTTCGGCTTGATGCTTGAGGTAAACATTAGGAGTCCAA
TCTCTTAATTACTTGGGCCAAAATTGGACTTTAAATGATTTTAATTTTTC
CTTCTACTTTTTTCTTGTCTTCCGCTCCAATACAAAAGCCCAACATCCCT
TTAATTTTGGGAATCGTTCCTTTACCTTTCTCAATTCAGATTAGCAGCCG
TCCCATTCCCTTCTTTCTTTTCACTTTCCCTTTCTTTTTTTTTTCTCCTT
CCCTCTCTGCAAATCGATCCTCCTTCCCTCTCTGCAAATCGATGTTTCTG
CAAACCGATGAAGAAATTGAAGATGCTCCCTCTCTGCAAACCTCCTTTTCG
TTCTTTGTCTGCGCTTTCCCTTAGGTTCTTTTTTCTCTTCCCTCTCTGCA
AAATCGATGTTCCCTCTTTGCAAACCTTCTCTCTTTGTAAACCGATGAAGT
GTGAAGAAATTGAAGATGTTCCCTCTCTGCAAACCAATGAAAATTGATGG
TATGTTTCTCTAAATAATGATCCTGTCTTCGGGTGTGTTTCTCCAAATAA
TGAATGATTCTATGCTCTGCTTCTACACCTTCTCTAAGTAATTGATTATT
TGTGGCTGAAAAAGAAAAAGAAAGCATGAGAGGAAGGACGGCTTTTGTCT
AGGGCAAGGATTTGTATTTGTATGACAATAATTGAGTTGTTGCAGGCTTT
TGTGTAGC

>19_20(2)

TACTAGAGGAGGTGAAGCACATGTCTAGTTATGTGATAATTCAAATTTCC
CTTGACCGTAGGAAAGGCATTGCTTTAGTTCACTCTTGGGAATGCAAGCAG
TTTGTGTTGTTTTTTTTTTTTTATTCTCTGGTGTCCCCTCAATCACAATTTGT
GCAGCTAATGACTTTTGGCCAAATTTTTTTATGTTTAATAAAGATTTATG
AACGTAAAGAGTGCAAGGGGAAACACATTCCAACCTGGTGCATTTTTTTG
GATTTGCTTATGCTGAAGAGTACACGGGGAAATTTTATTACGTTGGCAAA
ACAAACATACATATTGTGATGAGCTCAAAGCTGGAATGAGAGATAATATG
CTTGCTGTAGACTATTTTTAAGTTTATAATCCCTATGAATTTCTGGGTAC
TTTTTTCATGAGAACAGACCACCTTTGAACAGTTGCACCGCCTCACAAGCA
GGGTTTCGCCAACTCGGCCGAGTCCGGTACGACTCGGCCGAGTCATAACCG
GAACGCCGGGACCGGTACGATACTGATCCTCGAATCGCCGGTATGACCAT
ACCAGATGTGAATCGTGCAGACTCGGACGTTATTGGCTGAGTCAAAACGG
TGTAAGAAGTTGTCGGCCAAATCCTCGGATACGACTCGGAGTCGAGTCGG
CAACTCGTGAACAGAATTGAGCAGAGGAAATTGAACCAAAAATTGAACAG
AGGAATTTTCACTGCTTACACCTAATAATCGAACAGAGGAAAACCTAATA
AATGAATACCAAATAATTCCTGCTTCTATTTTACTTTTACCCAAAAAA
TGAACCAAAAAGGGCAAACCAACATTGAACAGGAAATCACAAG