

UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO



“Identificación, selección y evaluación de la resistencia a
oídio (*E. necator*) en plantas de vid (*Vitis vinifera*)
portadoras de *RUN1* y *REN1*”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Ignacio Esteban Solano Carrera

Director del Seminario de Título: Patricio Arce Johnson

Co-Directora: Grace Armijo Godoy

Patrocinante: Claudia Stange Klein

Junio 2017



Santiago - Chile

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr(ta) Ignacio Esteban Solano Carrera**.

“Identificación, selección y evaluación de la resistencia a oídio (*E. necator*) en plantas de vid (*Vitis vinifera*) portadoras de *RUN1* y *REN1*”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dr. Patricio Arce J.

Director Seminario de Título:

Dra. Grace Armijo G.

Co-Director Seminario de Título:

Dra. Claudia Stange K.

Director Seminario de Título:

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

Evaluador:

Biografía



Nací un día Martes 8 de Marzo, mis primeras memorias las tengo junto a mi familia, padres, hermanos, abuelos, tias y primos. Recuerdo el primer triciclo, la prima bicicleta, paseos al campo, la emoción del escuchar por primera vez el imponente sonido de las olas al golpear contra las rocas del litoral central, memorias de todos aquellos animales que me han acompañado en el camino. Disfrutando de los preciados momentos junto a nuestros seres queridos, los que viajaron a lo desconocido y los que aun están aquí. Todo iba tan bien hasta la llegada de mis hermanos Daniel y Pablo, recuerdo la emoción de verlos por primera vez, agradezco tenerlos junto a mi hasta el día de hoy. Además de todos los amigos que conocí en el camino, en los colegios y universidades, que tanto me enseñaron y me mostraron la existencia de muchas realidades, como todos somos tan diferentes y similares a la vez. Nunca me cansaré de agradecer todas las puertas que se abrieron en mi cabeza gracias a esto, finalmente aquí termina e inicia una nueva etapa llena de emociones, misterios y desafíos.

*Dedicado a mis seres queridos
que emprendieron su viaje.*

Agradecimientos

Agradezco a todos los que fueron parte de este largo proceso, a la Universidad de Chile y sus profesores quienes me exigieron tiempo, dedicación y compromiso sin lo cual no habría podido lograr todo esto. A la Dra. Claudia Stange por sus, consejos, perseverancia y ayuda, por permitirme trabajar en el laboratorio de Genética Molecular y Microbiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile junto al Dr. Patricio Arce, a quien también agradezco enormemente por el recibimiento, consejos y ayuda brindada. Gracias a ambos por despertar en mi la pasión por el estudio de la fisiología vegetal.

Agradezco de sobremanera a la Dra. Grace Armijo quien me aconsejo y ayudo en todos los ambitos posibles, no solo en lo académico, siempre con alegría y buena disposición de darse el tiempo para escuchar, por la paciencia que tuvo conmigo, por ser una de las mejores personas que me ha tocado conocer, tanto en lo académico como en lo personal, agradezco infinito tenerla como tutora, mis más sinceros buenos deseos para ella y su familia, así como también para todas las personas con las que compartí tanto tiempo en el laboratorio. Al Dr. Mario Agurto por compartir de su tiempo, trabajo y a todos aquellos quienes me ayudaron en el camino de una u otra forma a Magdalena, Carlos, Francisca, Katia, Brenda, Marta, Daniela, Alejandra, Valeria, Claudia, Litsy, Carmen, Evelyn, Yiyin, Natalia y el resto del laboratorio, en el cual siempre fue grato y agradable trabajar, conversar y compartir.

Agradezco a todos mis amigos que la vida me hizo llegar, amigos del colegio y de universidad, en especial a Claudio, Camila y Francisca por aguantar a Glebo por tantas horas y semanas completas, recuerdos de esos veranos que ahora se extrañan tanto. A mi familia por estar siempre ahí en cada momento dando lo mejor de si, en especial a mis hermanos y primos quienes me sacan siempre de la rutina y malos momentos. Por último y espero no se mal interprete, agradezco a mi yo del pasado por la perseverancia, fuerza y valor, por no rendirse jamás y seguir adelante aun cuando todo iba mal, por hacerme una persona tan fuerte y capaz de lograr lo que se proponga.

Índice de contenidos

Biografía	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Índice de contenidos	vi
Índice de Tablas.....	viii
Índice de Figuras.....	ix
Abreviaturas	x
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción.....	5
1.1. Importancia de la vid	5
1.2. Patógenos de la Vid	5
1.3. Ciclo de vida y estrategias de infección de los fitopatógenos.....	6
1.4. La enfermedad del Oídio de la Vid	7
1.5. Sistema inmune y control hormonal en plantas	8
1.6. Genes involucrados en la resistencia a patógenos biotróficos	12
1.7. La vid y Erysiphe necator.....	14
1.8. <i>Loci RUN1</i> y <i>REN1</i> relacionados a la resistencia del oídio	15
1.9. Pirimidación de <i>loci</i> <i>RUN1</i> y <i>REN1</i>	16
1.10. Fundamento del trabajo	17
Objetivo General.....	17
Objetivos específicos.....	17
2. Materiales y Métodos.....	18
2.1. Materiales	18
2.2. Mantenimiento del material vegetal.	24
2.3. Propagación del material vegetal.	24
2.4. Obtención y propagación de Erysiphe necator	25
2.5. Genotipificación de plantas.....	26
2.5.1 Extracción DNA en plantas de Vid fenotípicamente resistentes	26
2.5.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	27
2.5.3 Determinación de la presencia del locus <i>RUN1</i> en plantas de Vid:.....	28

2.5.4. Determinación de la presencia del locus <i>REN1</i> mediante microsatélites.....	29
2.6. Ensayos histológicos.....	30
2.6.1. Inoculación del hongo en tejido vegetal.....	30
2.6.2. Análisis Cortes finos	31
2.7. Perfil Hormonal.....	31
2.8. Análisis de expresión génica de <i>MLO7</i> y <i>PEN1</i>	32
2.8.1. Extracción RNA:	32
2.8.2 Síntesis de cDNAs:.....	33
2.8.4. PCR en tiempo real.	34
3. Resultados	36
3.1. Extracción y análisis de <i>RUN1</i> , en plantas de vid resistentes al oídio.	36
3.2. Identificación plantas portadoras de <i>REN1</i>	38
3.3. Análisis histológicos	40
3.4. Análisis cortes finos.....	44
3.5. Perfil Hormonal.....	46
3.5. Análisis de inducción para los genes <i>MLO7</i> y <i>PEN1</i> en plantas de vid inoculadas con <i>E. necator</i>	49
4. Discusión.....	52
4.1. Mejoramiento genético mediante retrocruzamiento en plantas de vid	52
4.2. Genotipificación en plantas de vides portadoras de <i>RUN1</i> y <i>REN1</i>	53
4.3. Cinética de infección, desarrollo del hongo sobre variedades resistentes.	57
4.4. Análisis cortes finos en plantas infectadas.....	59
4.5. Análisis hormonal, modulación frente estrés biótico.	60
4.6. PCR cuantitativo de los genes <i>PEN1</i> y <i>MLO7</i> involucrados en el proceso de defensa	64
4.7. Resumen y análisis global	66
5. Proyecciones.....	66
6. Conclusiones.....	68
7. Publicaciones y presentaciones a congreso.	69
8. Referencias	70

Índice de Tablas

Tabla 1. Tabla de los cruzamientos realizados entre parentales resistentes y susceptibles, e identificación de plantas resistentes al oídio.	20
Tabla 2. Partidores utilizados en las distintas técnicas moleculares utilizadas en esta investigación	23
Tabla 3. Tiempo y temperaturas de las reacciones de PCR	27
Tabla 4. Partidores utilizados para las diferentes reacciones de qRT-PCR, e	35
Tabla 5. Genotipificación de plantas resistentes al oídio.	40
Tabla 6. Concentración inicial promedio de las hormonas estudiadas (0 hpi).....	47
Tabla 7. Promedio de la expresión de VvMLO7 y VvPEN1 relativo a Vv60SRP a las 0 hpi.	50

Índice de Figuras

Figura 1 Esquema simplificado del sistema inmune en plantas	10
Figura 2 Modelos de reconocimiento propuestos en la respuesta tipo ETI.....	13
Figura 3 Parentales de <i>Vitis vinifera</i> portadores de los loci RUN1 y REN1.....	19
Figura 4 Ejemplo de Identificación de RUN1 en plantas provenientes del cruzamiento dirigido.....	37
Figura 5 Análisis PeakScanner para identificar líneas portadoras de REN1.	39
Figura 6 Material utilizado para la inoculación del hongo sobre las plantas seleccionadas.	41
Figura 7 Cinética de infección de <i>Erysiphe necator</i> inoculado sobre plantas de <i>V. vinifera</i> provenientes del cruce P09-105-34 x 'Crimson Seedless'.....	43
Figura 8 Cortes finos para de los diferentes genotipos estudiados.....	45
Figura 9 Inducción a partir de 0 hpi de ABA, JA-Ile, SA en plantas infectadas con <i>Erysiphe necator</i>	48
Figura 10 Curva de calibración y eficiencia de las condiciones y partidores utilizados para estudiar la inducción de los genes <i>MLO7</i> y <i>PEN1</i>	49
Figura 11 Perfil de expresión génica de <i>VvMLO7</i> y <i>VvPEN1</i> en plantas de vid inoculadas con <i>Erysiphe necator</i>	50

Símbolos y abreviaturas

°C	Grados Celsius
μM	Micromolar
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
DAB	3,3'-Diaminobencidina
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario
DNAsa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Desoxirribonucleótido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
ETI	<i>Effector-triggered Immunity</i>
ETS	effector triggered susceptibility
hpi	Horas post-inoculación
HR	Respuesta hipersensible
JA	Ácido jasmónico
Kb/pb	Kilobases/pares de bases
M/mM	Molar/Milimolar
MAMP	<i>Microbe-associated molecular patterns</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
<i>MLO7</i>	<i>MLO-like protein 7</i>
MTI	<i>MAMP-triggered Immunity</i>
NPR1	<i>Non-pathogenesis related protein 1</i>
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
<i>PEN1</i>	<i>PENETRATION 1</i>
pH	Concentración protones (-log ₁₀ [H ⁺])
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
qPCR	PCR cuantitativo en tiempo real
<i>REN1</i>	Resistencia a <i>Erysiphe necator</i> 1
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RPV1	Resistencia a <i>Plasmopara viticola</i> 1
RT-qPCR	qPCR con transcriptasa reversa
<i>RUN1</i>	Resistencia a <i>Unicula necator</i> 1
Ta	Temperatura de alineamiento
Vv	<i>Vitis vinifera</i>

Resumen

La vid (*Vitis vinífera*) es uno de los cultivos más importantes dentro de las plantas frutícolas. En los viñedos estas se encuentran sometidas constantemente a patógenos que pueden afectar en la producción y calidad final del fruto destacando el hongo filamentosos *Erysiphe necator* agente causal del oídio de la vid. Actualmente la mayor parte de las variedades que se comercializan para la producción de uva de mesa y vino son afectadas por este patógeno. *RUN1* y *REN1* son dos *loci* de carácter dominante estudiados en variedades no comerciales de vid, que por si solos confieren resistencia contra esta enfermedad, ambos traducirían para proteínas capaces de reconocer en alguna etapa las alteraciones que produce el patógeno sobre la planta, generando una respuesta de defensa efectiva contra la infección del hongo, por lo que la piramidación de ambos *loci* en una variedad de interés podría mejorar su defensa, haciéndola más efectiva y duradera en el tiempo. Esto permitiría en los viñedos disminuir la cantidad de químicos necesarios que se utilizan actualmente para combatir este hongo. En este trabajo se identificaron y estudiaron variedades portadoras de *RUN1* y *REN1* provenientes de iterativos retrocruzamientos entre diversas variedades comerciales y parentales resistentes que portaban uno de estos *loci*. Para conocer la respuesta que se generó a partir de la piramidación, se evaluó y caracterizó la defensa frente a la infección de oídio bajo condiciones de invernadero. Para identificar las líneas positivas para *RUN1* se utilizaron dos parejas de partidores dirigidos al gen *MrRUN1* presente dentro del locus, mientras que para identificar aquellas vides portadoras de *REN1* se usaron marcadores moleculares tipo microsatélites dirigidas a dos regiones que segregan junto con la resistencia. Se analizaron los resultados, obteniendo plantas portadoras de ningún, uno o ambos *loci*. Mediante análisis de tinciones histológicas y microcortes

transversales de plantas infectadas, se logró observar una fuerte producción de especies reactivas de oxígeno y muerte celular en aquellas plantas portadoras de por lo menos algún *loci*, teniendo un efecto mayor en aquellas líneas que poseían ambos. Para determinar si la presencia de estos *loci* provocaba un cambio en la inducción de hormonas relacionadas a procesos de defensa, se midieron las concentraciones de ácido salicílico (SA), ácido jasmónico (JA) y ácido abscísico (ABA) a través de HPLC, observando diferentes cambios según el genotipo infectado. Para saber si existía algún efecto provocado por estos *loci* en la inducción de genes que participan en el proceso se realizó qPCR de algunos genes relacionados con el proceso infectivo o la defensa, así para todos los genotipos se vio un aumento en la inducción de *MLO7* (MLO-like protein 7), gen involucrado en la susceptibilidad de la enfermedad, mientras que para *PEN1* (PENETRATION 1), gen involucrado en procesos de resistencia, se observó un aumento mayor en aquellas líneas resistentes. Estos resultados sugieren una respuesta efectiva, robusta y contenida frente a la infección del hongo en aquellas líneas portadoras de ambos *loci*.

Abstract

The vid (*Vitis vinifera*) is one of the most important crops among fruit plants. At the vineyards grapevines are constantly submitted to different pathogenic microorganisms that can affect the production and the final quality of fruit. One of the most important pathogens that affect its growth is the filamentous fungus *Erysiphe necator*, which causes the disease called powdery mildew, taking the nutrients from green tissue and berries. Currently, most of the marketable varieties for table grapes and wine production are affected by this pathogen.

RUN1 and *REN1* are two dominant *loci* studied in non commercial vineyards varieties, which by themselves confer resistance against powdery mildew. It has been suggested that both *loci* codify for proteins capable of recognizing the alterations produced by the pathogen on the plant in certain infection stage, generating an effective defence response against fungal infection. Therefore, the pyramiding of the two *loci* in a variety of commercial interest could improve their defense, making it most effective and lasting over time. This would lead to a decrease the amount of chemicals compounds currently used to combat this fungus in vineyards.

In this work, *RUN1* and *REN1* plant carriers were identified and studied from iterative backcrosses between several commercial and resistant varieties that carried one of these *loci*. In order to analyze the defense response generated from the pyramiding plants, it was characterized against the infection of powdery mildew under greenhouse conditions. To identify the *RUN1* positive lines, two pairs of primers directed to the *MrRUN1* gene (located within the locus) were used; while to identify those vines carrying the *REN1* locus, molecular markers (SSR) were used, identifying two regions that segregate

together with the resistance. We obtained plants carrying none, one or both loci. Through histological staining and transverse microcutting of infected plants, it was possible to observe a strong production of reactive oxygen species (ROS) and cell death in the plants carrying at least one locus, finding a greater effect in those lines that carry both loci. To determine if the presence of these loci changes the profile of hormones related to defense processes, the concentrations of salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA) and abscisic acid (ABA) were measured through HPLC. We found differences according to the infected genotype. To find out if there was any effect caused by these *loci* in the induction of genes involved in the process, qPCR of some genes related to infection or defense was performed. We found increased induction of *MLO7* (MLO-like protein 7) in all genotypes, involved in the susceptibility of the disease, whereas for *PEN1* (PENETRATION 1), a gene involved in resistance processes, a greater induction was observed only in resistant lines. These results suggest an effective, robust and contained response to fungal infection in those lines carrying both *loci*

1. Introducción

1.1. Importancia de la vid

La vid es uno de los cultivos frutícolas más importantes a nivel mundial, siendo Chile uno de los principales exportadores de uva de mesa. Estas poseen variadas propiedades que ayudan a mantener en buen estado a nuestro cuerpo, siempre y cuando su consumo sea moderado (Gehm y col. 1997), son consideradas como una fuente rica de antioxidantes (Jayaprakasha y col. 2001), azúcares (Bao Do y Cormier 1991) y vitaminas (Bagchi y col. 2000) (Yilmaz y Toledo 2004), así como también por poseer propiedades antibacterianas (Jayaprakasha y col. 2003). Además, debido a sus características de aroma y sabor, ésta se ha utilizado en diversas áreas, generando una variedad de productos para su uso y consumo (vinos, pasas, cosméticos, aceites, entre otros). En Chile, la mayor parte del suelo utilizado en el cultivo de vides se concentra entre la III hasta la VI región (Muñoz y col 2005). Muchas de las uvas y sus subproductos son exportados y comercializados hacia gran parte del mundo, siendo EEUU, Países Bajos y Alemania los principales importadores (ODEPA, 2013). Debido a la gran diversidad genética que la vid posee, se han obtenido variados cultivares especializados para cada producción, diferenciando entre variedades completas orientadas al cultivo de uva de mesa y vino.

1.2. Patógenos de la Vid

La mayor parte de los cultivares comerciales de vides utilizados para la producción y comercialización de productos relacionados a la uva, son susceptibles a patógenos proveniente de diversos reinos. Entre estos cabe mencionar bacterias, protistas, hongos, animales, integrando también a los virus. Estos producen diversas alteraciones, algunas de ellas visibles en el fenotipo final de la planta, afectando el desarrollo y estructura de

raíces, tejido aéreo, órganos reproductivos, lo que altera la formación y calidad del fruto (Armijo y col. 2016). Perteneciente al reino fungi, dentro de la división Ascomycota se encuentran los hongos filamentosos capaces de descomponer materia orgánica como hojas, tejido muerto, frutos, entre otros. A pesar de su contribución al ecosistema cumpliendo el rol de microorganismos descomponedores, algunos de ellos producen grandes pérdidas en la industria agrícola, favorecidos por condiciones climáticas adversas (generalmente relacionados a altos cambios de humedad y bajas temperatura) generan la enfermedad en la vid, provocando gran impacto en la calidad final de la uva. Dentro de las enfermedades causadas por hongos filamentosos que deben ser controladas en cada temporada para el cuidado del viñedo, destacan la pudrición gris, producida por *Botrytis cinerea* (Williamson y col. 2007) y el oídio, provocado por el hongo *Erysiphe necator*. (Gadoury y col. 2012).

1.3. Ciclo de vida y estrategias de infección de los fitopatógenos

Los fitopatógenos poseen diversas estrategias de infección y reproducción para completar con su ciclo, continuar su dispersión y descomponer la materia orgánica. Generalmente estos patógenos reconocen específicamente a su hospedero adhiriéndose mediante macromoléculas presentes en la superficie dependiente de la forma y regularidad asociada a la célula de cada planta hospedera (Lo Presti y col. 2015). Así, por ejemplo, en el caso de los hongos luego del reconocimiento del hospedero y adhesión de la espora, esta dará inicio a la formación del tubo germinativo, el cual formará posteriormente el apresorio, principal estructura de invasión y daño mecánico del tejido vegetal. De acuerdo con su ciclo infectivo, los fitopatógenos se han clasificado en tres grandes grupos: biotróficos, necrotróficos y hemibiotróficos (Glazebrook 2005). En el caso de los microorganismos biotróficos, estos desarrollan estrategias para invadir

la planta sin causar su muerte. En el caso de los hongos biotróficos, estos comienzan el desarrollo de una estructura especializada llamada haustorio la cual invagina la membrana plasmática permitiéndole absorber parte de los nutrientes presentes sin causar la destrucción o descomposición total de la célula (Glazebrook 2005). Los patógenos necrotróficos por otro lado, se alimentan de los nutrientes producidos por la muerte y degradación del tejido infectado. Luego de entrar o generar alguna herida estos inducen progresivamente la muerte de la célula mediante la secreción de enzimas líticas capaces de degradar estructuras celulares, causando finalmente la descomposición de la célula infectada (Pieterse y col. 2009). Finalmente, el grupo de los hemibiotróficos combinan ambas estrategias separadas por una escala temporal, es decir, comienzan con una etapa biotrófica infectando tejido vegetal sin causar la muerte de la célula hospedera, para luego terminar con una etapa necrotófica causando la muerte del tejido para finalizar su ciclo (Münch y col. 2008).

1.4. La enfermedad del Oídio de la Vid

De los patógenos más habituales que afectan la producción de uva de mesa y vino, el hongo biotrófico *Erysiphe necator* causante del oídio de la vid, produce altísimas pérdidas en la industria vitícola, según el cuidado y condiciones climáticas de la temporada, este puede llegar a producir daño total de la cosecha, afectando los costos asociados a la mantención del cultivo (1 millón de pesos por hectárea) y pérdidas asociadas a la venta de la uva (alrededor de 2 millones de pesos por hectárea) (ODEPA, 2013) . Este hongo filamentoso afecta la mayoría de las especies del género *Vitis*, nutriéndose principalmente de tejido verde fotosintético y frutos, produciendo lo que visualmente se asimila a un polvo blanco-grisáceo en la superficie de la zona infectada (Fung y col. 2008). Esto afecta directamente el rendimiento y calidad de la fruta,

provocando un efecto negativo al disminuir el contenido de azúcar y nutrientes, aumentando la acidez y disminuyendo el peso neto de las bayas infectadas (Gadoury y col. 2001). Al ser un hongo biotrófico obligado, este solo puede nutrirse de células metabólicamente activas y así lograr su propagación. Para ello este hongo cuenta con estructuras especializadas que logran penetrar la pared y adquirir los nutrientes desde su hospedero. Una vez que las conidias (esporas asexuales) del hongo se adhieren sobre el tejido a infectar y lo reconocen como un hospedero, estas forman un tubo germinativo el cual es diferenciado a una estructura llamada apresorio, encargada de generar mediante presión mecánica la ruptura de la pared celular. Esto permite al hongo invadir el espacio intracelular invaginando la membrana celular y así dar lugar al desarrollo del haustorio, estructura encargada de la absorción de nutrientes para la posterior formación de hifas secundarias, las cuales infectaran tejido cercano para adquirir una mayor cantidad de nutrientes y generar finalmente las estructuras reproductivas (conidióforos con sus conidias), con lo cual continuará el ciclo dando lugar a posteriores infecciones (Qiu y col. 2015).

1.5. Sistema inmune y control hormonal en plantas

A pesar de no poseer un sistema inmune capaz de circular células especializadas encargadas de reconocer y eliminar moléculas exógenas, las plantas pueden percibir cambios en su entorno y desencadenar cascadas de señalización que permitan regular los niveles de expresión de ciertos factores y biosíntesis hormonal, generando así una defensa contra diversos tipos de estrés bióticos y abióticos (Pieterse y col. 2009). Para esto las plantas cuentan con sistemas de reconocimiento y mecanismos de defensa celular, para sensar moléculas extrañas y poder responder frente a los cambios que se generen (Dodds y Rathjen 2010). Algunas moléculas y microorganismos pueden ser

directamente reconocidos por la célula vegetal mediante proteínas receptoras llamadas *Pattern recognition receptors* (PRRs) las cuales identifican patrones moleculares redundantes en diversos tipos de microorganismos, tales como flagelina, quitina, entre otras (Wu y col. 2014) llamados *microbe-associated molecular patterns* (MAMPs) Figura 1. Algunos de estos receptores son capaces además de reconocer moléculas asociadas a daño provocado por patógenos que descomponen estructuras celulares, llamadas *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) (Pieterse y col. 2009), correspondientes a moléculas de la misma planta liberadas tras la infección de patógenos principalmente necrotróficos. La estimulación de estas PRRs genera la activación de la defensa primaria por parte de la planta, denominada *MAMP-triggered immunity* (MTI) (Figura 1a), generando una respuesta de defensa basal e inespecífica contra patógenos, activando rutas de MAP quinasas (MAPK) que generan cambio en niveles de expresión de factores asociados a cambios oxidativos, activando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), aumento de ácido salicílico (SA), síntesis de metabolitos secundarios que restringen el crecimiento del patógeno, entre otras (Wu y col. 2014). Por otro lado, patógenos especializados en atacar a un determinado hospedero han desarrollado estrategias para evadir la activación de esta vía, mediante la secreción de efectores capaces de suprimir la activación de respuesta tipo MTI, provocando así la enfermedad o ETS (*Effector triggered susceptibility*. Figura 1b) en el tejido infectado (Pieterse y cols 2009). Sin embargo, algunas plantas han evolucionado bajo la presión del patógeno y han sido capaces de sobrellevar este tipo de infección debido a estrategias que le otorgan resistencia contra este tipo de ataques mediante la traducción de proteínas de resistencia R, las cuales por mecanismos directos o indirectos, son capaces de reconocer estos efectores patogénicos, activando

la segunda vía de defensa llamada *Effector-Triggered Immunity* (ETI. Figura 1c) (Pieterse y col. 2009).

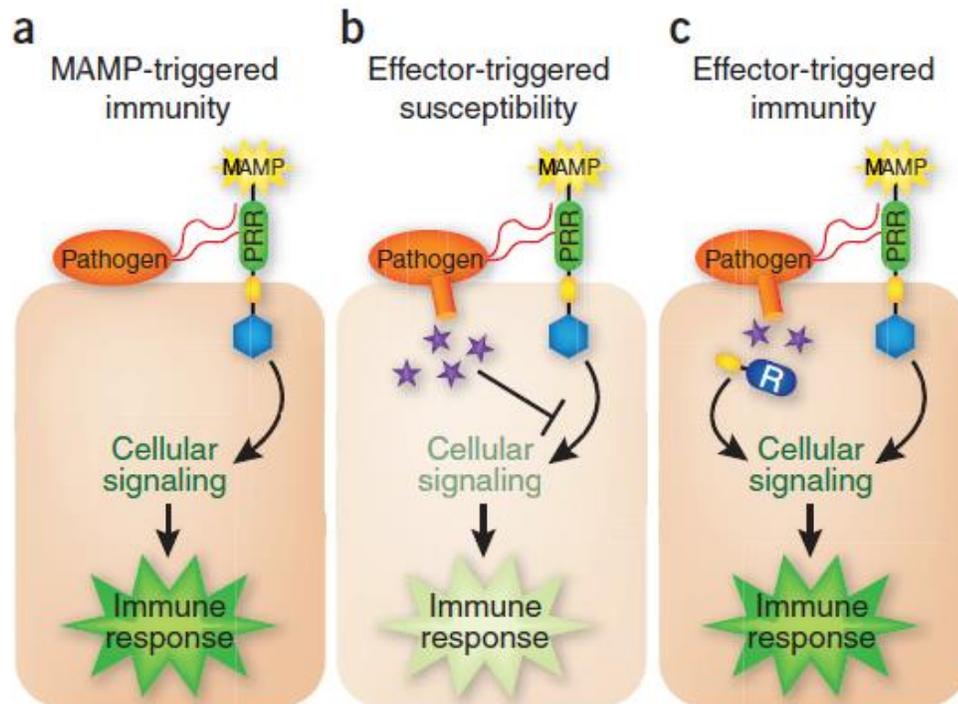


Figura 1. Esquema simplificado del sistema inmune en plantas. En (a) el patógeno es identificado por las PRR, la cual reconoce los patrones asociados a este (MAMPs), produciendo respuesta inmune tipo MTI. En (b) se observa la infección efectiva del patógeno (ETS) debido a la secreción de efectores (representados en forma de estrellas) que bloquean la activación de la respuesta tipo MTI. En (c) se muestra el reconocimiento específico del proceso infeccioso por parte de la planta mediante proteínas R (marcada como "R" en azul), lo que activa la respuesta inmune tipo ETI (adaptado de Pieterse y cols. 2009).

La activación de esta vía de defensa en comparación a MTI, es mucho más específica y robusta, activando mecanismos similares a la defensa basal, pero con una intensidad mayor, donde es característico de la respuesta tipo ETI la muerte localizada de las células infectadas en un proceso llamado *hypersensitive response* (HR) para privar al patógeno de los nutrientes presentes en la célula. Este proceso se produce mediante la

generación de un segundo estallido oxidativo producto de la alta concentración de ROS provenientes de la mitocondria, cloroplastos, peroxisomas, entre otros, que a diferencia de la respuesta tipo MTI, esta tiene características de mayor intensidad (Grant y Loake 2000). La activación de ETI también modula la generación de proteínas relacionadas a la defensa, por ejemplo proteínas PRs (pathogenesis related) inducidas por un aumento en la biosíntesis de SA. Esta hormona induce la activación de factores de transcripción (tales como la proteína Nonexpressor Of Pathogenesis-Related Proteins1 o NPR1) que modulan la transcripción de genes de defensa. El aumento de SA produce además una respuesta llamada *systemic acquired resistance* (SAR), lo que envía señales de alerta al resto de la planta para estar preparada a futuras infecciones (Gao et al. 2015). Además, se han estudiado respuesta involucradas en la generación de depósitos de callosa y la activación de diversos factores de transcripción y proteínas involucrados en procesos de defensa (Yu y col. 2016).

En el caso del reconocimiento y defensa contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos, esta se relaciona con un aumento en la biosíntesis de la hormona SA, lo que modula factores para inducir la defensa contra patógenos biotróficos, generación de respuesta hipersensible (HR), SAR y proteínas PRs. Mientras que para patógenos necrotróficos, la defensa se encuentra mediada principalmente por Ácido Jasmónico (JA) teniendo un efecto sinérgico con la hormona Etileno (ET) (Robert-Seilaniantz y col. 2007). Estas hormonas participan en la activación de genes involucrados en la síntesis de compuestos tóxicos para los microorganismos y herbívoros donde algunos modelos, reportan que las vías de SA y JA serían antagonistas entre si (Pieterse y col. 2009). Sin embargo, también se ha observado que dependiendo de la concentración en que estas hormonas se encuentren (en especial a bajas concentraciones), estas podrían producir una

sobreactivación de la defensa contra las infecciones patogénicas (Peter y cols 2010). Por otro lado, también existe una modulación en la defensa por parte de la hormona ácido abscísico (ABA), el cual participa en procesos de respuesta a estrés abiótico, donde también activaría ciertos factores comunes a la ruta de JA. Así, estas tres hormonas (SA, JA, ABA) se encuentran participando en diversos procesos de defensa contra el estrés producido, regulando la homeostasis de la planta, existiendo una compleja modulación de las rutas, así como también una retroalimentación entre estas dependiendo en la situación de estrés a la que se encuentre expuesta la planta (Pieterse y col. 2009).

1.6. Genes involucrados en la resistencia a patógenos biotróficos

Como se mencionó anteriormente, existen proteínas capaces de reconocer efectores que reprimen la inmunidad basal en la planta. Hasta la fecha se han postulado principalmente tres modelos de reconocimiento por parte de estos genes R (resistencia), codificantes para proteínas R, las cuales son capaces de identificar y generar una respuesta contra el patógeno (Dodds y Rathjen 2010). El primero de estos tres modelos se caracteriza por un reconocimiento directo del efector por parte de la proteína R, activando así mediante transducción de señales, las respuestas de defensas relacionadas a ETI anteriormente descritas (Dangl y Jones 2001) Figura 2a, El segundo se conoce por el modelo de guarda, en donde la modificación de una proteína target o cebo por parte del efector, sería reconocida por la proteína R, Figura 2b (van der Hoorn y Kamoun 2008), mientras que el tercer modelo propuesto implica la interacción del efector con alguna proteína target, en donde la alteración de este complejo estaría siendo reconocido por la proteína R, Figura 2c (Collier y Moffett 2009). Así, si la interacción de la proteína R en cualquiera de los tres casos es compatible, se activará

una cascada de señalización la cual inducirá la respuesta de tipo ETI, para producir una defensa específica contra el patógeno siendo este último considerado avirulento (Dodds y Rathjen 2010). Estas proteínas R, se caracterizan por poseer dominios generalmente conservados, por un lado, la parte de reconocimiento hacia el C-terminal, está compuesta por proteínas con dominio de unión a nucleótidos *nucleotide-binding* (NB) y un dominio rico en repeticiones de leucinas *leucine-rich repeat* (LRR), mientras que hacia el N-terminal, donde ocurre la transducción de la señal, está compuesta por un dominio conservado el cual puede variar entre *Toll/interleukin-1 receptor* (TIR) o *coiled-coil* (CC) (Coll y col 2011).

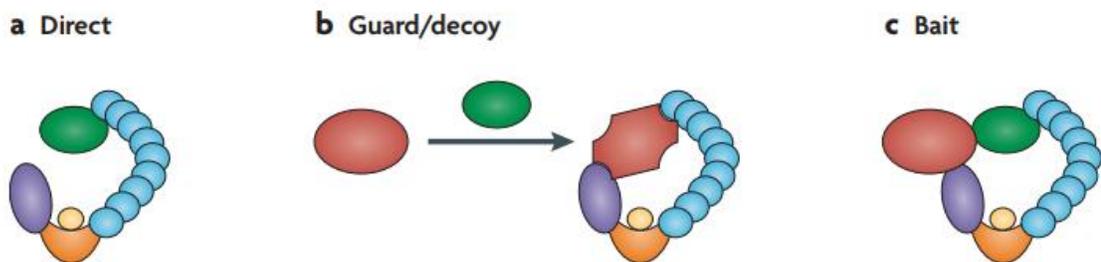


Figura 2. Modelos de reconocimiento propuestos en la respuesta tipo ETI, En (a) se propone el mecanismo directo, donde la proteína R reconoce al efector (en verde) a través de una interacción física directa. En (b) se observa el esquema del modelo de la guarda, donde la alteración de alguna proteína target del efector es reconocida por la proteína R. En (c) se observa el esquema tipo cebo, donde la proteína R reconocería al complejo proteína-efector. En los tres casos de ser compatible la interacción se producirá la transducción de la señal. (Adaptado de Peter y cols. 2010)

1.7. La vid y *Erysiphe necator*

E. necator al ser un patógeno biotrófico obligado, no posee gran número de genes involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios, ya que estos son proporcionados principalmente por el huésped (Jones y col. 2014), lo que lleva a la necesidad de transcripción de genes principalmente involucrados en el transporte, adquisición y absorción de estos metabolitos, además de los genes necesarios para la infección (efectores y proteínas relacionadas a esto). Por otro lado, en la vid existen genes expresados para modular diversos procesos fisiológicos, ya sea de crecimiento, defensa, diferenciación de tejidos, entre otros; sin embargo, algunos de estos estarían siendo utilizados en beneficio del patógeno ayudándolo en el reconocimiento y eficaz infección, disminuyendo así la defensa basal contra el hongo (Lo Presti y col. 2015). Un ejemplo de esto son los genes pertenecientes a la familia de proteínas transmembrana *MLO* (Mildew Locus O), los cuales estarían permitiendo el reconocimiento e invasión del hongo hacia la planta, ya que se ha estudiado que la inactivación de estos genes mejora el grado de resistencia contra el patógeno (Consonni y col 2006). Existen también genes propios de la planta, relacionados a procesos de control contra organismos externos, los llamados genes *PEN* (penetration-resistance genes) están implicados en el mecanismo contra la penetración del hongo, lo que estaría ayudando a generar una respuesta de defensa primaria mediante mecanismos que probablemente involucren eventos de fusión de membrana y biosíntesis de compuestos antimicrobianos (Qiu y col. 2015). Es así como algunos cultivares son más susceptibles o resistentes que otros debido principalmente a la variabilidad genética que estos posean.

1.8. Loci *RUN1* y *REN1* relacionados a la resistencia del óidio

En los últimos años, se han reportado la existencia de algunos cultivares del género *Vitis* resistentes al hongo, asociados a la presencia de ciertos *loci* que segregan genéticamente con dicha resistencia (Feechan A. y col. 2013), sin embargo, estos cultivares resistentes al óidio no poseen interés comercial, debido a las características poco apetecibles de sus uvas. Hasta la fecha se han reconocido y caracterizado varios de estos *loci* involucrados en la resistencia contra el patógeno, uno de ellos es *RUN1* el cual se ha caracterizado desde *Muscadinia rotundifolia* (Barker y col. 2005). Este locus posee un gen en particular *MrRUN1*, el cual codificaría para un receptor del tipo TIR-NB-LRR. Ante una infección, las plantas portadoras de este gen sufren una rápida muerte celular programada *programmed cell death* (PCD), relacionada con una alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que la producción de PCD prevendría el crecimiento de hifas secundarias y posterior esporulación (Feechan y col. 2015). Por otro lado, se ha reportado el locus *REN1* identificado desde el cultivar *Vitis vinifera* 'Kishmish vatkana' (Hoffmann, S y col. 2008). Este locus posee varios genes que codifican para motivos NB-LRR, los cuales estarían confiriendo una resistencia parcial frente al hongo, ya que estaría participando en una etapa más tardía, post penetración del hongo a la célula (Hoffmann y col. 2008).

A medida que *E. necator* penetra e invade el tejido de la vid secreta efectores que impiden la modulación y activación de la primera barrera de defensa tipo MTI bloqueando la transducción de señal de las PRR, logrando así una eficaz infección y produciendo la enfermedad. Sin embargo, plantas portadoras de estos *loci RUN1* y *REN1* estarían traduciendo para proteínas tipo R, capaces de reconocer efectores secretados por el hongo y así activar la segunda vía de respuesta inmune tipo ETI (Hoffmann y col. 2008;

Feechan y col. 2015). Por un lado, esto activaría la respuesta HR y con ello la muerte programada en las células infectadas, mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros mecanismos independientes de ROS (Coll y col. 2011). En paralelo, se estarían activando factores relacionados con la biosíntesis de SA, induciendo también una respuesta de tipo SAR en la planta, y con ello, al igual que en el tejido local pero en menor proporción, activación de factores de transcripción, como NPR1 e inducción de proteínas PRs y mediadores que conferirían resistencia frente al posterior ataque e infección de patógenos (Pieterse y col. 2009).

1.9. Pirimidación de *loci* RUN1 y REN1

En trabajos previos del laboratorio se han generado cruzamientos dirigidos entre variedades susceptibles (comerciales) y variedades resistentes (no comerciales) del género *Vitis*, portadoras de los dos *loci* de resistencia *RUN1* y *REN1* (Schlechter R. 2014, Agurto M, 2016). Estos *loci* de resistencia estarían otorgando mecanismos de defensa que le permitirían a la planta evitar la infección y diseminación del hongo dentro de su sistema (Hoffmann S. y col 2008), donde la respuesta de defensa estaría siendo gatillada específicamente por el reconocimiento de el o los efectores del hongo (Qiu, W y col. 2015), lo cual le permite a la planta reaccionar rápidamente contra el patógeno, generando respuestas de tipo HR, mediante generación de ROS, formación de callosa, biosíntesis de moléculas antifúngicas, entre otras. Se ha descrito en trabajos de pirimidación para algunos *loci*, que estos podrían tener un efecto tanto sinérgico como neutro en la magnitud de la defensa (Tabien y col. 2000; Tan y col. 2010), dependiendo de la interacción y sinergismo que exista entre los *loci* pirimidados.

1.10. Fundamento del trabajo

Por todo lo descrito anteriormente, se requiere profundizar en los mecanismos que estarían asociados a aquellas plantas portadoras de ambos *loci*. Para ello se deben identificar plantas portadoras de ambos *loci* *RUN1* y *REN1*, y evaluar mediante métodos histológicos y moleculares las estrategias de defensas que se inducen frente a la infección del hongo. Donde se espera que las líneas *RUN1REN1* presenten una activación de la respuesta tipo ETI, siendo esta respuesta de defensa igual o más eficaz que aquellas plantas portadoras de al menos un *loci*.

Objetivo General

Identificar y caracterizar la respuesta de defensa mediada en plantas de *Vitis vinifera* portadoras de los loci *RUN1* y *REN1* al ser infectadas con *Erysiphe necator*

Objetivos específicos

1. Identificar plantas portadoras de ambos *loci* de resistencia *RUN1* y *REN1*.
2. Caracterizar cambios histológicos y moleculares mediados por la presencia de estos *loci* ante la infección del hongo.

2. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

Material Vegetal

Las líneas de *V. vinifera* utilizadas en este trabajo fueron obtenidas previamente a partir de siete retro-cruzamientos, llevados a cabo en las tesis de Schlechter Rudolf (2014) y Agurto Mario (2016), entre variedades comerciales susceptibles a oídio (Figura 3, progenies en celeste) y plantas resistentes a *E. necator*: *M.rotundifolia* portadora de *RUN1* (Barker y col 2005) y *V. vinífera* 'Dzhanzhal Kara' portadora de *REN1* (Coleman y col. 2009) (Figura 3, progenies en amarillo para *RUN1* y verde para *REN1*).

Las plantas analizadas en este trabajo provienen específicamente de los cruzamientos dirigidos entre las progenies resistentes portadoras de los *loci* *RUN1* y *REN1* P09-106-40, P09-106-7, P09-106-09, P09-105-34 y las variedades comerciales Red Globe y Crimson Seedless (Tabla 1).

Todo el material vegetal se encontraba en la parcela experimental del laboratorio del Dr. Patricio Arce Johnson en Curacaví (Parcela 46A, Miraflores Km 44, Curacaví, Región Metropolitana, Chile), desde donde también se obtuvo la muestra de hongo a propagar descrita a continuación en la sección métodos.

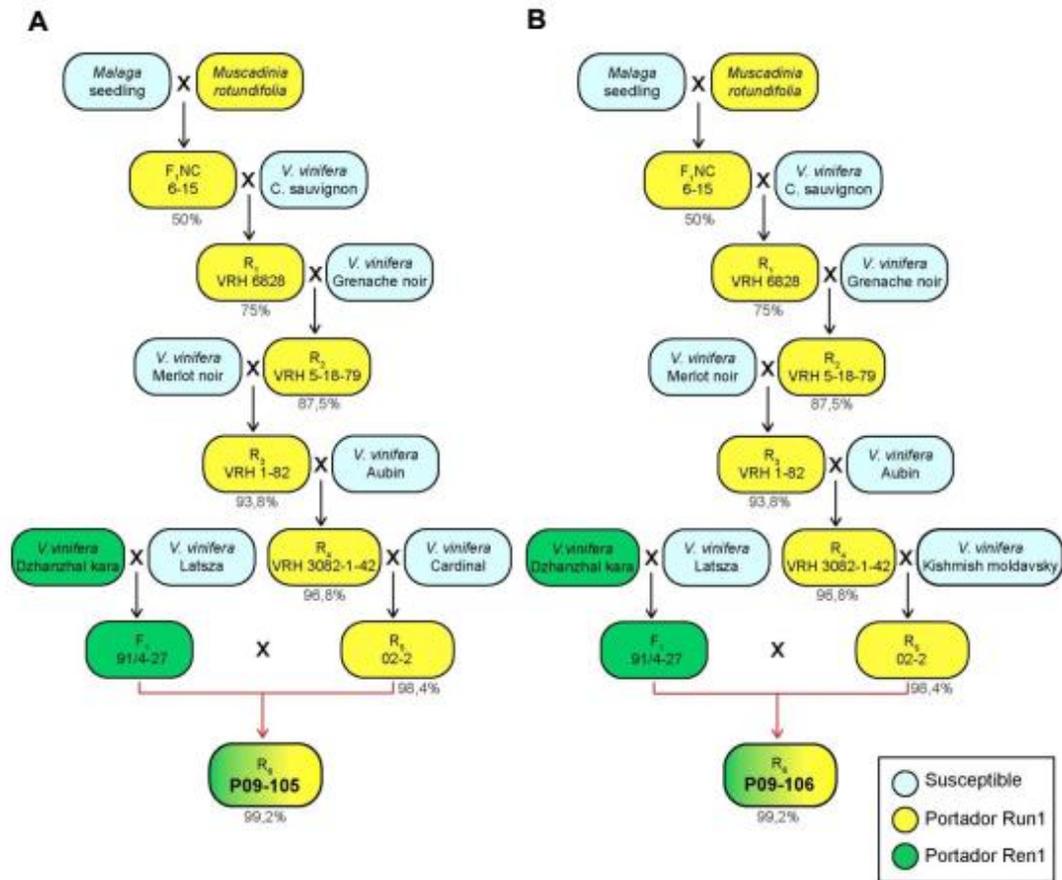


Figura 3. Parentales de *Vitis vinifera* portadores de los loci *RUN1* y *REN1*, P09-105 y P09-106. (material vegetal previo al trabajo de investigación) Esquema de cruzamientos realizados hasta la obtención de las poblaciones P09-105 (A) y P09-106 (B). En celeste se indican las variedades de *Vitis vinifera* de alto interés comercial susceptibles a oídio; en amarillo se indican aquellas variedades portadoras de *RUN1* y en verde aquellas portadoras de *REN1*, ambas fueron utilizadas como parentales resistentes a oídio. Los valores porcentuales indican el grado teórico de *Vitis vinifera* que posee la variedad. (Adaptado de Schelster Rudolf 2014).

Tabla 1. Tabla de los cruzamientos realizados entre parentales resistentes y susceptibles, e identificación de plantas resistentes al oídio. Cruzamientos controlados entre parentales portadores de *RUN1* y *REN1* (P09-106-40, P09-106-7, P09-106-09, P09-105-34) y variedades comerciales (Red Globe, Crimson Seedless), las cuales fueron sometidas a un primer screening fenotípico para identificar resistencia. Se destaca en naranja la progenie utilizada en el desarrollo de este trabajo (Adaptado de Agurto Mario 2016).

Cruzamientos Controlados		Identificación de Segregantes resistentes			
Madre	Padre	N° Plantas inoculadas	N° Plantas Susceptibles	Plantas Resistentes	
				N°	%
P09-106-40	Red Globe	6	2	4	66,7
P09-106-7	Red Globe	85	43	42	49,4
P09-106-7	Crimson Seedless	157	45	112	71,3
P09-106-9	Crimson Seedless	117	47	70	59,8
P09-105-34	Crimson Seedless	224	58	166	74,1
Red Globe	P09-106-40	13	5	8	61,5
Totales		602	200	402	66,8

Enzimas:

La enzima *Taq* polimerasa utilizada para las reacciones de PCR y la enzima transcriptasa reversa SuperScript II® Reverse transcriptase para la síntesis de DNAc, se obtuvieron de Invitrogen™ Co., Carlsbad, California, Estados Unidos. La enzima RQ1 RNase-Free DNase utilizada para el tratamiento de RNA, se obtuvo de Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos.

Kits utilizados:

Para la extracción de DNA genómico vegetal se utilizó DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen N.V., Hilden, Alemania.

Para las reacciones de RT-qPCR se utilizó el kit SensiMix™ SYBR Hi-ROX Kit de Bioline, Londres, Reino Unido,

Reactivos:

Hidróxido de sodio (NaOH), cloruro de hidrógeno (HCl), sal fosfato monosódica (NaH_2PO_4), bromuro de cetilmetiltriamonio (CTAB), dimetilsulfóxido (DMSO), cloruro de litio (LiCl), alcohol isoamílico (IAA), cloroformo (CHCl_3), β -mercaptoetanol, ácido láctico, azul de tripán, glicerol, fenol saturado básico, etanol, agar-agar e isopropanol, se obtuvieron de Merck, Darmstadt, Alemania.

Dietilpirocarbonato (DEPC), polivinilpolipirrolidona (PVPP), 3,3-diaminobencidina (DAB), azul de anilina y espermidina se obtuvieron de Sigma-Aldrich Chemicals Co., Saint Louis, Estados Unidos,

Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris), acetato de sodio (NaOAc), ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), cloruro de sodio (NaCl) y solución de carga de DNA 6X, se obtuvieron de Winkler Ltda., Santiago, Chile.

Desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, se obtuvieron de Invitrogen™ Co., Carlsbad, California, Estados Unidos.

La agarosa utilizada se obtuvo de Bioline, Londres, Reino Unido.

La solución de tinción de ácidos nucleicos GelRed® se obtuvo de Biotium, Hayward, California, Estados Unidos.

El marcador de masa molecular fue 1kb DNA Ladder™, obtenido de Gibco®, Carlsbad, California, Estados Unidos.

Equipos

Los termocicladores utilizados para las reacciones de PCR fueron: El modelo 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems®, Carlsbad, California, Estados Unidos. Y el modelo T100™ Thermal Cycler, Biorad Hercules, California, Estados Unidos

El espectrofotómetro ocupado para identificar la integridad del DNA fue el modelo NanoDrop 2000 Thermo Scientific™, Carlsbad, California, Estados Unidos

El transiluminador UV utilizado para visualizar geles de agarosa fue obtenido de Vilber Lourmat de Marne-la-Vallée Cedex 1, Francia; y el registro de estos geles fue realizado a través de la cámara digital Canon Power Shot G6 con filtro UV.

Los microscopios utilizados fueron: Microscopio óptico Eclipse 80i, Nikon Instruments Inc. para la evaluación de la proliferación del patógeno y la acumulación de ROS

El equipo utilizado para las reacciones de qPCR fue el modelo Agilent Mx3000P qPCR System, Stratagene, obtenido de Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California, Estados Unidos.

Oligonucleótidos

Los partidores utilizados para las reacciones de PCR y qPCR fueron seleccionados a partir de la literatura y sintetizados por IDT (Integrated DNA Technology, <http://www.idtdna.com/>). La secuencia específica de cada oligonucleótido se indica en la Tabla 2. Para realizar el análisis capilar de los partidores UDV020 y Sc47_20, se marcó el extremo 5' Forward con el fluoróforo VIC®.

Tabla 2. Partidores utilizados en las distintas técnicas moleculares utilizadas en esta investigación En la tabla se detalla la secuencia de estos, con el respectivo tamaño de banda esperado y temperatura de anealing o alineamiento (T_a) utilizada para las condiciones de PCR. En (a) se muestran los partidores usados para PCR convencional, en (b) los partidores para micro satélites y en (c) para qRT-PCR.

Gen/locus	Nombre	Secuencia de partidores	Tamaño banda esperada	T_a (°C)
Actina 1(a)	VvActin 1	F: 5'-ACCAGAATCCAGCACAAATC-3' R: 5'-ATGGCCGATACTGAAGATAT-3'	666 bp	55
RUN1(a)	1.7F - 1.7R	F: 5'-ATAAAGCTCTTCGTATAAAT-3' R: 5'-CGATATGTGCTGACCCACA-3'	190 bp	57,4
	1.7F - 1.5R	F: 5'-ATAAAGCTCTTCGTATAAAT-3' R: 5'-AGGTGCGAATCCCTCTCCTA-3'	700 bp	57
REN1(b)	UDV020	F: 5'-TGTTGGTGTGTGTTTGTACGTG-3' R: 5'-TGTTGGCCTGATGTTGAGAG-3'	159 bp	55
	Sc47_20	F: 5'-TGGATCAAATTAGTGCCTGGA-3' R: 5'-GCCGCTTCAACTCAAAAATC-3'	205 bp	54
PEN1(c)	VvPen1	F: 5'-CTTCGCAAGAAGCTCAGGGA -3' R: 5'-TGCTCTTGGATCGCCTTCTG -3'	191 bp	57,3
MLO3(c)	VvMLO3	F: 5'-TGCCAGTTTCTCAGAGCTTTC -3' R: 5'-TGGGTCATCCGCATATCAATG -3'	148 bp	52,1
MLO7(c)	VvMLO7	F: 5'-CTTTCTTCGCATGGAGCACG -3' R: 5'-GAGCCCATCTGTGTCACCAA -3'	157 bp	57
Proteína ribosomal 60S(c)	Vv60SRP	F: 5'-ATCTACCTCAAGCTCCTAGTC-3' R: 5'-CAATCTTGTCTCCTTTTCCT-3'	166pb	55

Métodos

2.2. Mantenimiento del material vegetal: Como fue descrito anteriormente las plantas analizadas en este trabajo, provienen de cruzamientos dirigidos entre las progenies resistentes portadoras de los *loci* *RUN1* y *REN1* P09-106-40, P09-106-7, P09-106-09, P09-105-34 y las variedades comerciales Red Globe y Crimson Seedless. Para el desarrollo de este trabajo de investigación fueron tomadas aquellas plantas fenotípicamente resistentes, observando el desarrollo del hongo sobre la superficie de las hojas en condiciones de invernadero, para analizar e identificar en este trabajo aquellas plantas de interés (plantas portadoras de los *loci* *RUN1* y *REN1*). Los cultivos se realizaron en condiciones de invernadero, como se describe a continuación.

2.3. Propagación del material vegetal: Para contar con suficiente tejido vegetal, y realizar los análisis necesarios para los experimentos descritos a continuación, se realizó una propagación clonal en plantas de vid de alrededor de 3 meses, provenientes de la progenie P09-105-34xCrimson Seedless, mediante el corte de estacas (10 a 15 cm), a las cuales se les indujo la generación de raíces mediante la inmersión en ácido indol-3-butírico (AIB) 100mg/L durante 15 minutos, para posteriormente ser plantado en una mezcla de turba y vermiculita manteniéndolos en condiciones de alta humedad y un fotoperiodo de 16/8 horas luz/oscuridad a una temperatura de 24 ± 2 °C, en condiciones de invernadero.

2.4. Obtención y propagación de Erysiphe necator: Para la obtención del hongo se tomaron muestras en terreno de hojas infectadas naturalmente desde la parcela experimental del laboratorio del Dr. Patricio Arce Johnson, las cuales fueron analizadas bajo lupa para corroborar la presencia del hongo. Esto fue utilizado para inocular y propagar el hongo in vitro en hojas de cultivar susceptible V. vinífera 'Thompson Seedless' provenientes del laboratorio, donde bajo campana y en condiciones de esterilidad, estas hojas fueron lavadas en una solución de hipoclorito de sodio 1% v/v durante 5 minutos, realizando 3 lavados consecutivos con agua destilada estéril para posteriormente ser secadas en papel absorbente autoclavado, finalmente se frotaron gentilmente las superficies adaxiales de las hojas infectadas con las hojas susceptibles, a estas últimas se les cortó el peciolo y se mantuvieron en placas Petri agar-agar 1% sellándolas con Parafilm®, donde se mantuvieron a una temperatura de 24 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16/8 h. Luego de 2 semanas se logró obtener cultivo suficiente para los experimentos posteriores.

2.5. Genotipificación de plantas

2.5.1 Extracción DNA en plantas de Vid fenotípicamente resistentes: Para la extracción del DNA a ser utilizado en los análisis de identificación genotípica, se tomaron muestras al azar de 93 plantas fenotípicamente resistentes al oídio provenientes de los diferentes cruzamientos detallados en la Tabla 1, estas se genotipificaron y fueron utilizadas para construir las categorías detalladas en la Tabla 5. Para el análisis, se molieron las hojas frescas de las plantas crecidas en condiciones de invernadero, se extrajo el DNA mediante el kit de extracción DNeasy® Plant Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante, donde posteriormente se midió la concentración y pureza de los nucleótidos por medio de espectrofotometría NanoDrop 2000, utilizando el programa de 260/280 A para cada extracción.

Para comprobar la integridad del DNA extraído se amplificó mediante la técnica de PCR, un fragmento del gen de actina (*VvActin1*). Utilizando el kit de PCR Invitrogen™, Por cada 1 µl de DNA se utilizaron 2,5 µl de buffer amortiguador 10X (libre de MgCl₂), 0,5 µl de MgCl₂ (50mM), 0,7 µl de dNTPs (10mM), 1 µl de DMSO, 0,7 µl de cada partidor 10 mM (*Actin-F* y *Actin-R*, Tabla 2), 0,15 µl de *Taq* Polimerasa Invitrogen™ y 17,75 µl de H₂O libre de nucleasas, donde se siguieron las condiciones de los tiempos y temperaturas detallados en la Tabla 3 utilizando el termociclador 2720 Thermal Cycler, para posteriormente revelar las bandas mediante gel de carga 6X, en un gel de agarosa (sección 2.5.2).

2.5.2. Electroforesis en gel de agarosa: Para visualizar los fragmentos obtenidos por la técnica de PCR, se utilizó el amortiguador TAE 1X (Tris-HCl 40 mM, EDTA 2 mM, acetato de sodio 20 mM ajustado a pH 8,0) donde se realizaron electroforesis en geles de agarosa 2% para los partidores que poseían fluoróforos (UDV020 y Sc47_20) y 1% para el resto de los partidores. Para visualizar las bandas de DNA se tiñeron con GelRed[®] y fueron visualizadas bajo luz UV en un equipo transiluminador VilberLourmat, utilizando la cámara Canon *Power Shot* G6 con filtro UV.

Tabla 3. Tiempo y temperaturas de las reacciones de PCR. Los asteriscos (*) en la etapa de programación marcan el ciclo de repetición, el cual fue iterado 37 veces por cada pareja de partidores.

Etapas del programa	Actina		1.7F-1.7R		1.7F-1.5R		UDV020		Sc47_20	
	T (°C)	Tiempo	T (°C)	Tiempo	T (°C)	Tiempo	T (°C)	Tiempo	T (°C)	Tiempo
Inicio	95	5 min	94	5 min	94	5 min	95	5 min	95	5 min
Desnaturalización*	95	35 seg	94	30 seg	94	30 seg	95	1 min	95	1 min
Alineamiento*	55	35 seg	57,4	30 seg	50,7	30 seg	55	30 seg	54	30 seg
Extensión*	72	1 min	72	12 seg	72	42 seg	72	50 seg	72	50 seg
Elongación final	72	10 min	72	10 min	72	10 min	72	7 min	72	7 min

2.5.3 Determinación de la presencia del locus *RUN1* en Plantas de Vid: Para identificar aquellas plantas portadoras del locus *RUN1*, se realizó un PCR convencional, utilizando una pareja de partidores 1.7F - 1.7R (Tabla 2) la cual amplifica para un tamaño de 190 pares de bases (pb), para corroborar la presencia del locus se utilizó una segunda pareja de partidores 1.7F - 1.5R la cual amplificaba para un tamaño de 700 pb, ambas parejas de partidores amplificaban para una región del gen *MrRUN1*, el cual presenta el mayor aporte a la resistencia contra el oídio dentro del locus. Por cada 1 μ L de DNA vegetal se utilizó un volumen de 2,5 μ L de amortiguador 10X, 1 μ l de $MgCl_2$ (50mM), 0,5 μ l de dNTPs (10mM), 0,5 μ l de cada partidor (10 mM) de acuerdo a la pareja utilizada, 0,2 μ l de *Taq* Polimerasa y 18,8 μ l de H_2O libre de nucleasas siguiendo las condiciones detalladas de en la Tabla 3.

2.5.4. Determinación de la presencia del locus *REN1* mediante microsatélites: Para saber que plantas eran portadoras de *REN1* se ocupó una estrategia diferente a la anterior, ya que aún no se conoce cuál sería la región específica (o gen) del locus que otorgaría la resistencia contra el hongo. Se utilizaron regiones de microsatélites exclusivos para *REN1*, los cuales segregan con dicho locus. Primero se amplificaron la región de los microsatélites mediante PCR convencional, corroborando mediante dos parejas de partidores. Los partidores forward de Sc47_20 y UDV020 (Tabla 2), amplificaban para un tamaño de 205 y 159 pares de bases respectivamente, para ambas parejas de partidores por cada 1 μ L de DNA vegetal se utilizó un volumen de 2,5 μ L de amortiguador 10X, 1 μ l de $MgCl_2$ (50mM), 0,7 μ l de dNTPs (10mM), 0,75 μ l de cada partidador (10 mM) según la pareja de partidores utilizada, 0,2 μ l de *Taq* Polimerasa y 18,1 μ l de H_2O libre de nucleasas siguiendo las condiciones detalladas de en la Tabla 3. Luego de confirmar la presencia de la banda, las muestras fueron analizadas para conocer el tamaño exacto de esta mediante el servicio de análisis de fragmentos de la Unidad de Diversidad Molecular del Departamento de Ecología ubicado en la Pontificia Universidad Católica. Mediante la detección por electroforesis capilar, la cual ordena los fragmentos de DNA según la relación carga-tamaño que estas posean, y con la ayuda del fluoróforo marcado en el extremo 5' es posible detectar la ubicación y conocer el tamaño exacto del fragmento amplificado. Los archivos entregados en formato ".seq" fueron analizados mediante el programa PeakScanner™ Software v1.0 (ThermoFisher, Applied Biosystem®, Carlsbad, California, Estados Unidos), donde se analizaron la presencia o ausencia de los fragmentos a 205 y 159 pb.

2.6. Ensayos histológicos

2.6.1. Inoculación del hongo en tejido vegetal: Se inocularon plantas de al menos 4 meses crecidas en invernadero con el hongo (*Erysiphe necator*), seleccionando aquellas hojas jóvenes las cuales presentaban al menos 3 lóbulos definidos (Figura 6), tomando tres réplicas por genotipo de las líneas obtenidas a partir del cruzamiento P09-105-34xCrimson Seedless, Tabla 5 (*RUN1*, *REN1*, *RUN1REN1* y Susceptible 'Thompson Seedless', seleccionada debido al alto grado de susceptibilidad que estas tienen). Se inoculó el hongo mediante el contacto directo de las superficies adaxiales con hojas infectadas por dos semanas, obtenidas de la propagación del hongo descrita anteriormente. Se recolectaron muestras de hojas a las 24, 48 y 96 horas post-inoculación del hongo (hpi), donde una parte fue utilizada inmediatamente para tomar discos de hojas y realizar las tinciones, mientras que el resto de la hoja fue rotulada y guardada en tubos a -80°C para el resto de los análisis.

Para observar la proliferación del hongo se utilizó la tinción azul de tripán descrita por Vogel y Somerville (2000), se cortaron discos de 1 cm de diámetro desde las hojas recolectadas, se clarificaron con etanol (80%) para remover el exceso de pigmentos y luego ser teñidos con azul de tripán, en una solución precalentada a 60°C de agua, ácido láctico y glicerol 85% (1:1:1) durante 30 min, se retiró el exceso de azul de tripán con la misma solución agitando suavemente durante toda la noche. Para observar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), en los discos previamente tratados con azul de tripán, se infiltraron con 3,3-Diaminobencidina (DAB)-HCl ajustado a pH 3,8 como se describe en Thordal-Christensen y col (1997).

Finalmente, los discos obtenidos de ambas tinciones se cubrieron en una solución con glicerol 50%, para ser montados y fijados en portaobjetos. Las observaciones al

microscopio se realizaron a campo claro, tomando imágenes mediante el dispositivo Nikon Eclipse 80i (Nikon Instruments Inc., Tokyo Japan).

2.6.2. Análisis Cortes finos: Para observar la microscopía transversal de las hojas infectadas, se utilizó el servicio de la unidad de Microscopía de la Pontificia Universidad Católica, donde se tomaron discos a 96 hpi para los diferentes genotipos, realizando cortes semifinos (1 micra) los cuales fueron obtenidos en el ultramicrotomo Leica Ultracut R y dispuestos sobre una gota de agua destilada en un portaobjetos ubicado sobre una platina termoregulada a 90°C. Una vez secos los cortes, se cubrieron con 0,5 ml de una solución de azul de toluidina al 1% en borax 2% y se dejó teñir por 1 min. Luego se lavó con agua destilada y se dejaron secar en la misma platina. Se cubrieron con Entellan®. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio Nikon Optiphot II con cámara QImaging MicroPublisher 3.3 RTV.

2.7. Perfil Hormonal: Para la extracción y cuantificación de las hormonas vegetales SA JA-Ile y ABA, se utilizó el servicio del laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de Santiago de Chile, utilizando el protocolo de extracción y análisis descrito en (Pan y col., 2010). Brevemente, se masaron aproximadamente 100 mg para hojas de las diferentes líneas y genotipos, donde fueron congeladas en nitrógeno líquido para posteriormente homogeneizarlas mediante un mortero en una solución 30% v/v de isopropanol 15 mM HCl. La mezcla fue agitada a 4°C y centrifugada a 14000 rpm para recuperar el sobrenadante. El sobrenadante fue concentrado y las hormonas fueron detectadas y cuantificadas utilizando un sistema de HPLC–ESI–MS/MS (Agilent 1200 series, MS/MS 5420). Las muestras fueron recolectadas a las 0, 48 and 96 hpi, utilizando 3 réplicas biológicas por cada genotipo.

2.8. Análisis de expresión génica de *MLO7* y *PEN1*

2.8.1. Extracción RNA: Se extrajo el RNA total de cada muestra mediante buffer de extracción para ello se tomaron 100 mg de tejido vegetal y se molieron en tubos con perlas de extracción, mediante la máquina Precellys®24 (Bertin Corp.), se añadieron 600 µl del buffer de extracción (CTAB 2% (bromuro de cetilmetiltriamonio), PVPP 2% (polivinilpolipirrolidona), Tris-HCl 300 mM (tris(hidroximetil)-aminometano), EDTA 25 mM (ácido etilendiamino tetraacético), NaCl 2M, Spermidina 0,05%, H₂O DEPC (dietilpirocarbonato), β-mercaptoetanol 2%) previamente calentado a 65°C, repartidos en dos volúmenes iguales, agitando vigorosamente al agregar cada volumen.

Se dejó calentando durante 10 min a 65°C vortexeando las muestras cada 2 min. Se añadió un volumen de CHCl₃:IAA (24:1) se vortexeó y se centrifugó a una temperatura de 4°C a 7400 rpm durante 15 min, la fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo repitiendo con ella el paso anterior. La nueva fase acuosa obtenida se centrifugó a una temperatura de 4°C durante 20 min a 14000 rpm. Se transfirió nuevamente la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf agregando 0,1 volumen de Acetato de sodio 3M (NaOAc) y 0,6 volumen de isopropanol, donde se guardó a -80°C por un tiempo mayor o igual a 30 min para ayudar en la precipitación del RNA. Luego se centrifugó a 4°C durante 30 min a 12000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 500 µl de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1 mM) pH 7,5. Se agregó 0,3 volumen de cloruro de litio (LiCl) 8M, se mezcló y se dejó almacenado durante una noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugó a 4°C durante 30 min a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 500 µl de etanol 70% frío, se centrifugaron durante 10 min a máxima velocidad, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se dejó secando durante 5 min,

para luego ser resuspendido en 25 μl de H_2O DEPC donde fueron almacenadas a -20°C hasta el siguiente tratamiento.

2.8.2 Síntesis de cDNAs: Para la síntesis de cDNA, se utilizó 1 μl del RNA extraído anteriormente, al cual se le agregó 1 μl de DNAsa RQ1 (*RNase-free DNase* Promega Corp. Madison, Wisconsin U.S.A.) y 1 μl de Buffer DNAsa 10X completando con H_2O DEPC hasta un volumen total de 10 μl . Se incubó durante 1 h 30 min a 37°C , donde posteriormente se agregó a cada muestra 1 μl de la solución STOP, se incubó durante 10 min a 65°C , posteriormente se agregó 1 μl de primers random (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y 1 μl de dNTPs 10 mM, se calentó a 65°C durante 5 min y se enfrió en hielo durante 10 min.

Se agregó 4 μl de FS buffer 5X, 3 μl de DTT 0,1 M y se completó con agua DEPC hasta 20 μl . Se agitó y se incubó a 25°C durante 2 min, se mezcló mediante pipeteo con 0,25 μl de SuperScript II RT (Invitrogen™) donde luego se incubó a 25°C por 10 min, 42°C por 50 min, 70°C por 15 min para luego almacenar a -20°C .

2.8.3. Estandarización de partidores: Para realizar el posterior análisis de qRT-PCR, se estandarizaron los partidores para los genes *MLO7*, *PEN1* y el gen housekeeping 60SRP. Para ello se realizaron PCRs con las muestras de cDNA obtenidas en la sección anterior. Para fijar la temperatura de annealing (T_a), se utilizaron gradientes desde los 50°C hasta los 60°C , mediante el termociclador T100™ (Thermal Cycler, BioRad) utilizando el programa descrito en la sección Materiales y métodos 2.7.4 repitiendo 40 veces el ciclo para así determinar la temperatura de annealing más eficiente (Tabla 4), seleccionando aquella muestra donde el producto de PCR fuera el más limpio y claro. Con esto se generó la curva de calibración mediante qRT-PCR mediante la máquina *AgilentMx 3000P qPCR System*, Stratagene (Agilent Technologies Inc.), utilizando las muestras diluidas a una concentración de 5 $\text{pg}/\mu\text{l}$, realizando seis diluciones seriadas de 1/10 obteniendo un total

de 6 muestras, con ello se determinó la eficiencia obtenida de la pendiente para la gráfica generada C_T vs diluciones con sus respectivas réplicas y controles negativos para cada pareja de partidor de la Tabla 4 donde $E = 10^{-1/m-1}$.

2.8.4. PCR en tiempo real: Para realizar las reacciones de qRT-PCR se utilizó el cDNA diluido, extraído de las hojas infectadas (0,24,48 y 96 hpi). Los análisis de cuantificación se hicieron mediante el kit *SensiMixTM* (SYBR Hi-ROX Kit de Bioline, Londres, Reino Unido), el cual posee los fluorosforos SYBR Green I y ROX de referencia, se trabajó con un replicado por cada muestra y los controles negativos completados con agua DEPC. Para cada muestra se utilizaron 5 μ L SYBR Green Master Mix 2X, 1 μ L de cDNA, un volumen para cada partidor F y R, especificados en la Tabla 4, y H₂O DEPC hasta completar un volumen de 10 μ L.

Para la medición de la fluorescencia se utilizó el equipo Stratagene MxPro3000P QPCR System y el programa MxPro3000O (Stratagene, Agilent Technologies Inc.) El programa para la reacción fue un inicio de 10 min a 95°C, para luego repetir 40 veces el ciclo de: Desnaturalización a 95° por 30 s, un tiempo de alineamiento de 35 s utilizando las temperaturas especificadas en la Tabla 4, y un tiempo de extensión de 30 s a 72 °C. Finalmente se realizó un ciclo de 95°C por 30 s, 65° por 30 s y 95°C por 30 s para determinar la curva de disociación.

Para calcular la expresión relativa de cada gen se utilizó el gen housekeeping *Vv60SRP* como referencia, el cual no tiene una variación durante los ensayos de infección (Gamm y col., 2011), el método para calcular la expresión relativa fue $\Delta\Delta CT$ donde $\text{Expresión} = 2^{-[\Delta Ct, \text{muestra} - \Delta Ct, \text{control}]}$, $\Delta C_T = C_T \text{muestra} - C_T \text{housekeeping}$, (C_T : Ciclo umbral). Para calcular las veces de inducción del gen se utilizó la expresión basal al tiempo 0 hpi.

Tabla 4. Partidores utilizados para las diferentes reacciones de qRT-PCR, en la tabla se especifica su concentración final en el mix, la Temperatura de annealing (Ta) utilizada y la eficiencia obtenida de acuerdo a la ecuación $E = 10^{-1/m} - 1$, donde m es la pendiente de la recta al construir el gráfico de calibración para cada gen.

Gen	Volumen Partidor F y R (μ l)	Concentración final partidor (nm)	Ta ($^{\circ}$ C)	Eficiencia (%)
<i>VvMLO7</i>	0,25	6,25	57	97,1
<i>VvPEN1</i>	0,30	7,5	57	96,6
<i>Vv60SRP</i>	0,30	7,5	55	94,5

3. Resultados

Objetivo específico 1: Identificar plantas portadoras de ambos loci de resistencia RUN1 y REN1.

3.1. Extracción y análisis de *RUN1*, en plantas de vid resistentes al oídio.

En este trabajo, se analizaron 93 plantas provenientes de los cruzamientos tabulados en la Tabla 5, correspondientes a progenies cruzadas entre parentales de un alto valor comercial, detallando los cruzamientos en la Tabla 1 (Agurto M. 2016), las cuales presentaron un fenotipo resistente a *E.necator* (Evaluación del crecimiento del hongo, observando presencia o ausencia del polvo blanco característico de la enfermedad sobre las hojas). Se realizaron extracciones del DNA de las hojas en las diferentes progenies, donde se confirmó la integridad mediante partidores que amplificaban para una región del gen de Actina (*VvActin1*). A modo de ejemplo se observa un ensayo de integridad el cual fue repetido para el resto de las muestras (Figura 4A). Así, para identificar y comprobar la presencia del gen *MrRUN1*, el cual se encuentra presente dentro del locus *RUN1*, se utilizaron dos parejas de partidores dirigidos a regiones de este gen. A modo de ejemplo se observan muestras analizadas con los partidores 1.7F - 1.7R y 1.7F - 1.5R las cuales amplificaban una banda del tamaño de 190 pb (Figura 4B) y otra 700 pb (Figura 4C) respectivamente. Se consideraron las muestras positivas para *RUN1*, aquellas plantas portadoras del gen *MrRUN1* que amplificaron positivamente para ambas parejas de partidores. Se repitieron estos ensayos para todas las muestras analizadas obteniendo los datos tabulados en la Tabla 5.

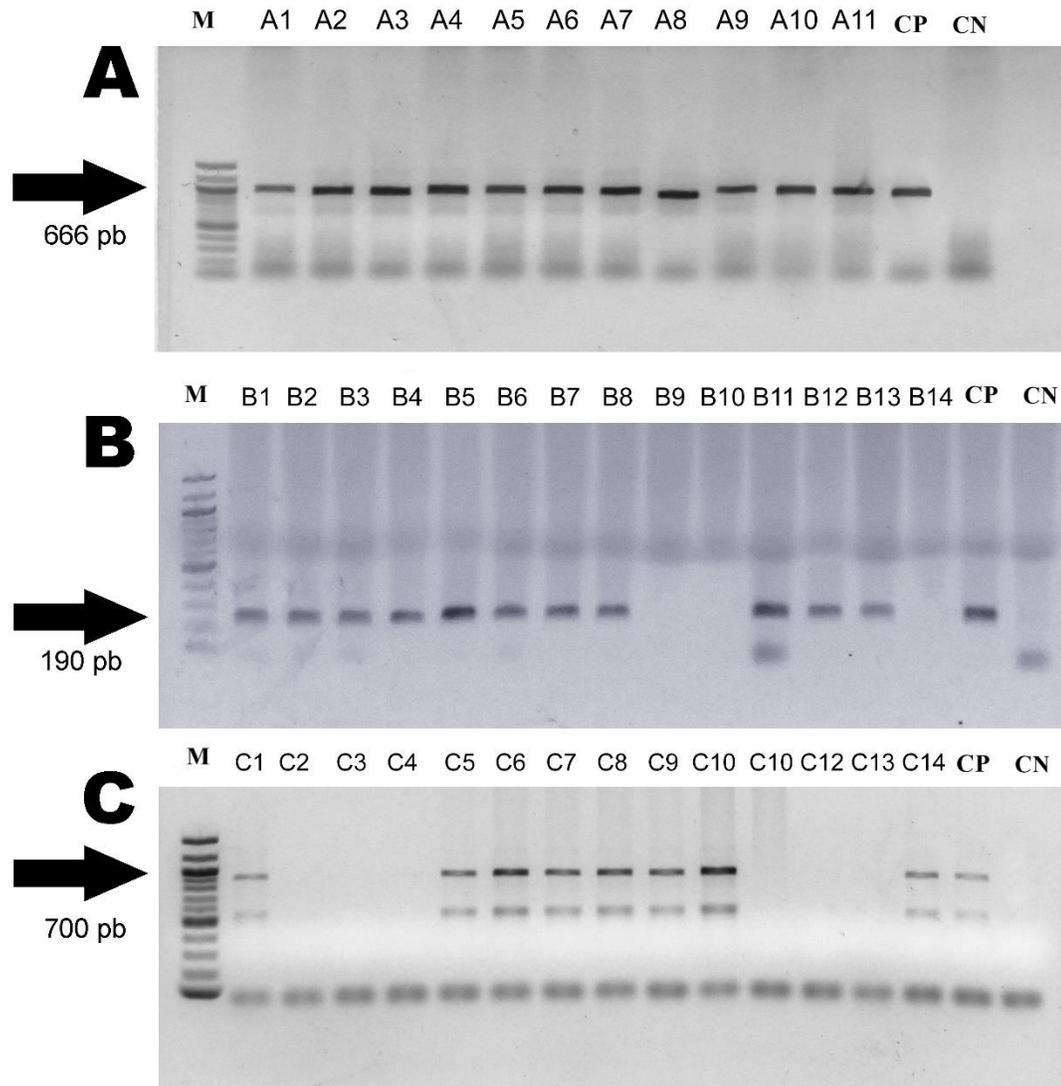


Figura 4. Ejemplo de identificación para *RUN1* en plantas provenientes del cruzamiento dirigido. A: PCR de actina para comprobar la integridad del DNA extraído, carriles A1-A11 muestras DNA integro. B y C: genotipificación del locus *RUN1* mediante la amplificación de dos regiones diferentes del gen *MrRUN1*. B: PCR utilizando partidores 1.7 F y 1.7 R amplifican una banda esperada de 190pb, muestras B1-B8 y B11-B13 fueron consideradas positivas para los partidores. C: PCR utilizando partidores 1.7F y 1.5R amplificando una banda esperada de 700 pb, muestras C1, C5-C10 Y 14 consideradas positivas para los partidores.

M: Carril de pesos estándar 1kb DNA Ladder CP: Control positivo (DNA de planta secuenciada *RUN1* positiva) CN: Control negativo (DNA planta de Melissa)

3.2. Identificación plantas portadoras de *REN1*

La segunda estrategia utilizada para identificar la presencia del locus *REN1*, fue utilizar marcadores moleculares del tipo microsatélite (SSR), ya que como se mencionó anteriormente se desconoce la región específica que otorgaría la resistencia contra el hongo. Por ello, se amplificó para regiones que cosegregan junto con el locus (Coleman y col. 2009; Hoffmann y col. 2008), esto mediante partidores modificados los cuales poseen una marca fluorescente para facilitar el posterior análisis por electroforesis capilar del tamaño de la región amplificada. Así para comprobar, al igual que en el caso anterior, se amplificó para dos marcadores diferentes mediante los partidores UDV020 (F y R) y Sc47_20 (F y R) cuyo producto amplificado genera un tamaño de banda esperado de alrededor de 200 bp en un gel de agarosa al 2%. Luego de esto se secuenciaron las bandas, mediante el método de electroforesis capilar, estas bandas amplificadas migran en relación a su tamaño/carga y con la ayuda de la marca fluorescente y la intensidad dada por el número de fragmentos que migran en algún punto del capilar, es posible identificar el número exacto de pares de bases de las bandas que fueron amplificadas por la pareja de partidores. Mediante el análisis informático a través del programa PeakScanner™ y la literatura citada anteriormente, se atribuyó la presencia para una banda de 205pb con UDV020 y 159pb para Sc47_20, a modo de ejemplo se muestran los análisis que se repitieron en el resto de las muestras (Figura 5). Así se consideraron positivos para *REN1* aquellas muestras que poseían la señal respectiva con ambas parejas de partidores. Así se obtuvieron las plantas genotipificadas en la Tabla 5, donde se identificaron 46 plantas portadoras de ambos *loci* de un total de 96 plantas fenotípicamente resistentes.

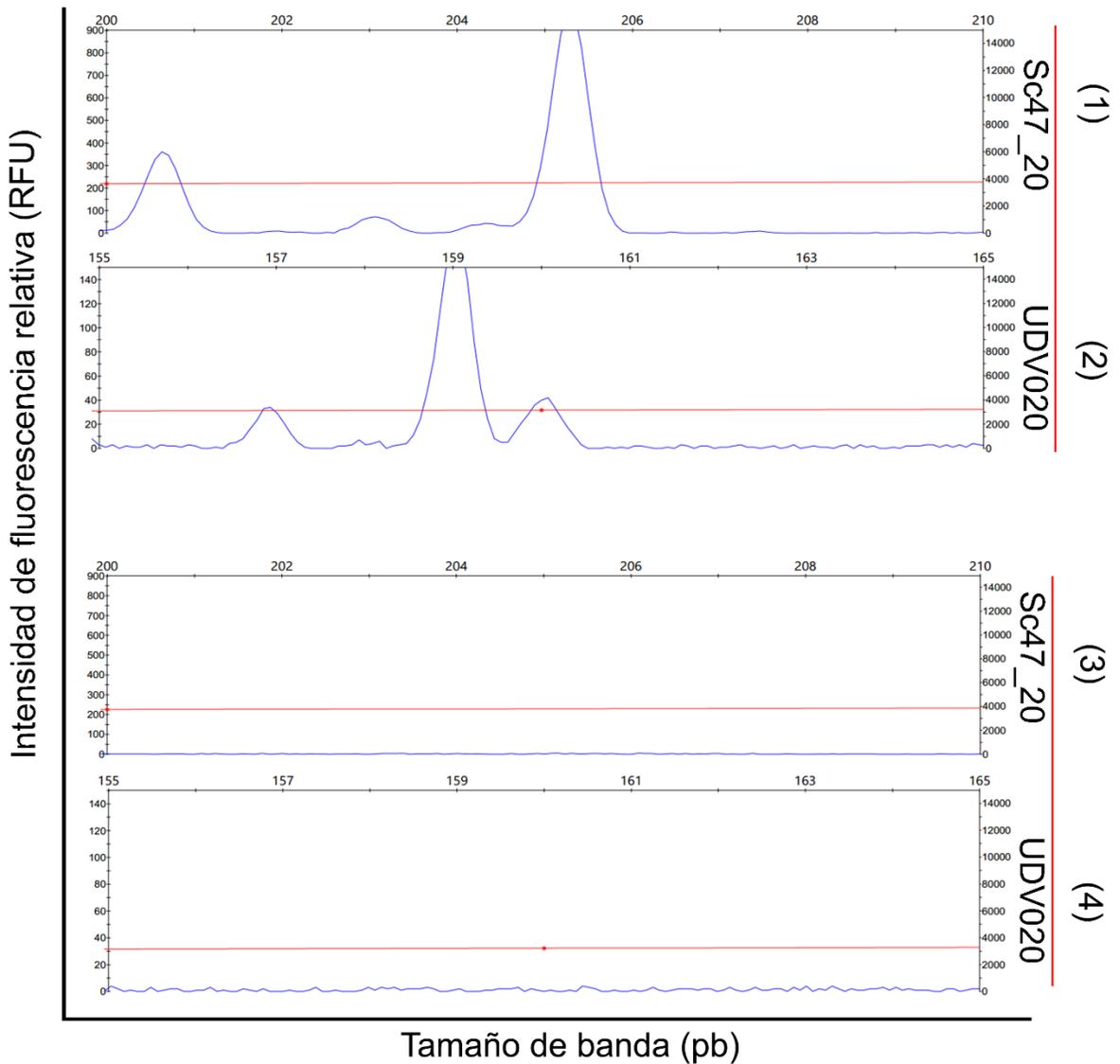


Figura 5. Análisis PeakScanner para identificar líneas portadoras de *REN1*. En la figura se muestra la intensidad de fluorescencia detectada en el capilar dada por el fluoróforo vs el tamaño de la banda en pb. Se detallan los marcadores Sc47_20 y UDV020 utilizados. Las muestras que presentaban los peaks mostrados en (1) a 205pb y (2) a 159 pb se consideraron positivas para *REN1*, mientras que las muestras que no presentaban estos peaks (3) y (4), se consideraron negativas para *REN1*.

Tabla 5. Genotipificación de plantas resistentes al oídio. Para identificar la presencia de las líneas *RUN1*, se consideraron positivas aquellas que portaban el gen *MrRUN1*. Para identificar las líneas *REN1* se amplificó para dos microsatélites tomados de la literatura los cuales cosegregan con dicha resistencia. En la tabla se muestra los genotipos obtenidos *RUN1* (*RUN1ren1*) y *REN1* (*run1REN1*), las cuales portan solo un solo locus de interés y *RUN1REN1* portadora de ambos.

Cruzamientos Controlados		Identificación de Segregantes resistentes			
Madre	Padre	Plantas Analizadas	<i>RUN1</i>	<i>REN1</i>	<i>RUN1REN1</i>
P09-106-40	Red Globe	4	0	0	4
P09-106-7	Red Globe	4	0	0	4
P09-106-7	Crimson Seedless	60	18	6	27
P09-105-34	Crimson Seedless	18	6	6	6
Red Globe	P09-106-40	7	1	0	5
Totales		93	25 (26,9%)	12 (12,9%)	46 (49,4%)

Objetivo específico 2: Caracterizar cambios histológicos y moleculares mediados por la presencia de estos loci ante la infección del hongo

3.3. Análisis histológicos

Para los análisis histológicos se seleccionaron plantas provenientes del cruce P09-105-34 x 'Crimson Seedless', ya que se contaba con el suficiente material de estudio para los genotipos resistentes (*RUN1*, *REN1*, *RUN1REN1*) caracterizadas mediante los partidores y métodos descritos anteriormente. De ellas se seleccionaron 3 líneas para los genotipos: *RUN1*, *REN1*, *RUN1REN1* y susceptible, tomando como modelo la variedad 'Thompson Seedless' para esta última ya que se contaba con suficiente material, además de ser una de las variedades con mayor susceptibilidad al oídio. Utilizando plantas establecidas en invernadero, se marcaron cuatro hojas por cada

planta, para ser utilizadas en los posteriores análisis, estas fueron rotuladas para ser utilizadas a las 0, 24, 48 y 96 hpi. Las diferentes plantas seleccionadas fueron inoculadas de manera no homogénea mediante el contacto directo con hojas de plantas portadoras del hongo (Figura 6A), sobre los tres lóbulos principales de las hojas rotuladas (Figura 6B) (Materiales y métodos 2.6.1)

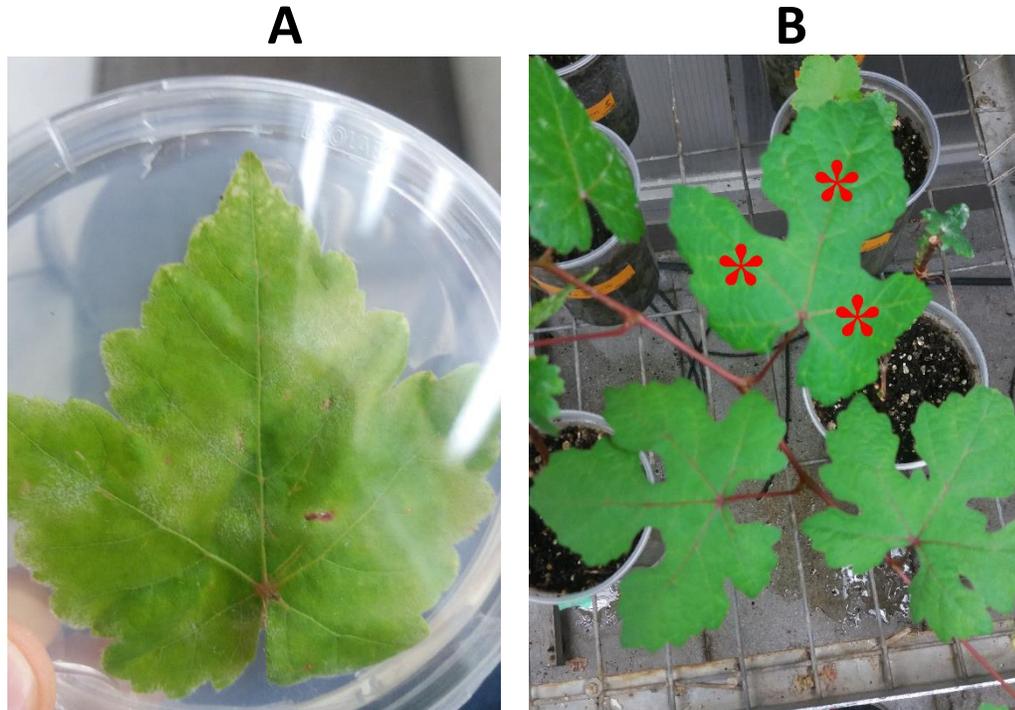


Figura 6. Material utilizado para la inoculación del hongo sobre las plantas seleccionadas. (A) Hoja del cultivar 'Thompson Seedless' infectada con oídio utilizada para la inoculación de esporas sobre las plantas a estudiar. (B) Planta de estudio inoculada con el hongo (0 hpi), las zonas en rojo muestran los 3 lóbulos de las hojas, donde se inoculó por contacto directo con las hojas infectadas en (A).

Para realizar la cinética de infección, se tomaron hojas provenientes de los tiempos 24, 48 y 96 horas post-infección (hpi) del hongo. En estas hojas se cortaron discos de 1 cm de diámetro y el resto de la hoja fue utilizada para análisis posteriores. Los discos fueron decolorados con Etanol 80%, teñidos con DAB para observar la aparición de ROS y Azul

de tripán, para las estructuras y desarrollo del hongo. Esto fue realizado en los 4 genotipos estudiados (*RUN1*, *REN1*, *RUN1REN1*, susceptible) utilizando tres réplicas de tres líneas diferentes por cada genotipo (Figura 7). De los diferentes discos observados fue posible inferir que, para tiempos tempranos desde las 24 hpi en adelante, es posible observar el comienzo de la aparición de ROS en aquellas líneas resistentes *RUN1* y *RUN1REN1*, mientras que en tiempo más tardíos, hacia las 48 hpi en adelante, para las líneas *REN1*. También fue posible evaluar el desarrollo de hifas secundarias en cada muestra observada, así para las líneas *RUN1REN1* hubo un escaso desarrollo incluso para los tiempos más tardíos, caso similar al de *RUN1* el cual presentaba poco desarrollo de las hifas hasta las 96 hpi. Sin embargo, para las líneas *REN1* se observó un crecimiento similar el de las susceptibles en tiempos tempranos, a pesar de que estas líneas presentaban un mayor crecimiento de hifas secundarias que las líneas resistentes *RUN1* y *RUN1REN1*, en tiempos tardíos la proliferación del hongo fue mucho menor en comparación a las susceptibles. Mientras que las líneas susceptibles presentaban gran cantidad de hifas secundarias y un rápido desarrollo del hongo, en el cual se llega incluso a la formación de conidióforos prematuros (Figura 7 Susceptible 96 hpi). Con esto es posible asociar la aparición de ROS representada por la tinción DAB, a un bajo desarrollo y proliferación del hongo.

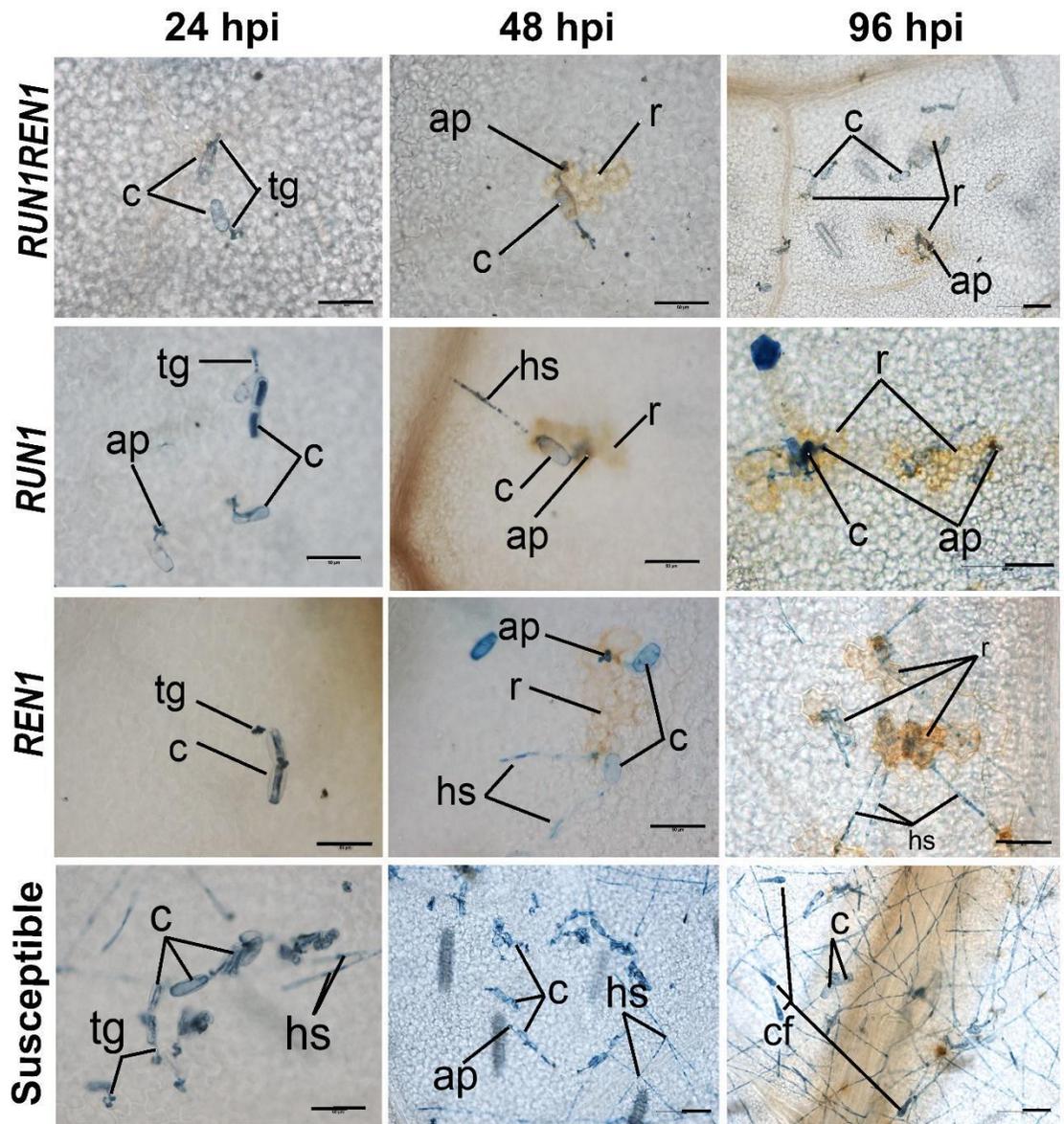


Figura 7. Cinética de infección de *Erysiphe necator* inoculado sobre plantas de *V. vinifera* provenientes del cruce P09-105-34 x 'Crimson Seedless'. En la figura se muestran las hojas inoculadas con el hongo luego de 24, 48 y 96 hpi. Se puede observar la tinción mixta, en marrón la tinción de DAB para observar ROS indicada con la letra r y azul de tripán para diferenciar las estructuras del hongo. c: conidia, ap: apresorio, hs: hifa secundaria, tg: tubo germinativo y cf: conidióforo. Barra referencia = 50µm.

3.4. Análisis cortes finos

Para los cortes finos realizados por la unidad de Microscopía de la Pontificia Universidad Católica, se analizaron los diferentes genotipos a las 96 hpi, donde se seleccionaron las imágenes más representativas detalladas en la Figura 6. Es posible observar en los cortes de hojas de líneas resistentes, muerte celular en el parénquima empalizada (flechas rojas), la que podría ser asociada a una respuesta HR clásico de una respuesta tipo ETI, donde a pesar de la muerte inducida, el resto de las células incluyendo el parénquima esponjoso mantiene su integridad. Por otro lado, en el corte de tejido susceptible es posible observar la deformación de las células tanto en las células del parénquima empalizada como en el esponjoso, perdiendo integridad y turgencia en las células que posiblemente se ven infectadas. Esto se puede explicar a causa del efecto y el proceso de infección que el hongo ejerce sobre la planta, ya que al avanzar en su desarrollo, este genera hifas secundarias y nuevos puntos de infección lo cual podría provocar la morfología observada en la Figura 8.

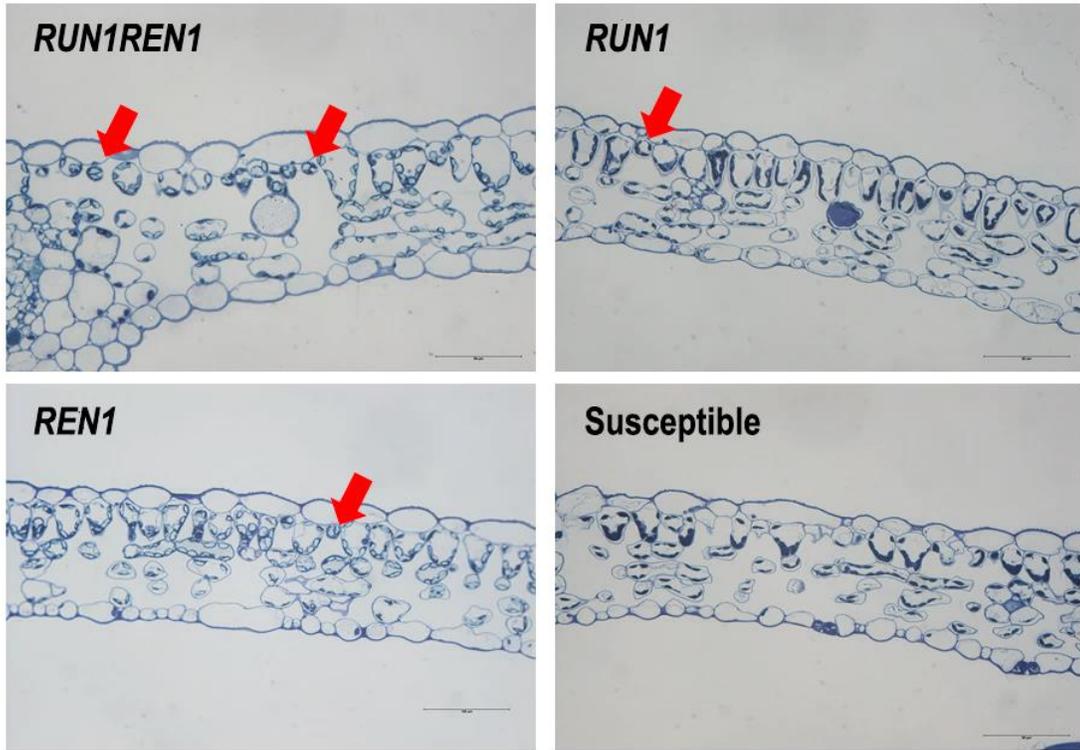


Figura 8. Cortes finos para de los diferentes genotipos estudiados En la figura se muestran los cortes de las hojas a las 96 hpi para las líneas *RUN1*, *REN1*, *RUN1REN1* y *Susceptible*. Las flechas en rojo indican la muerte celular, donde se observa el parénquima de empalizada en la parte superior y el parénquima esponjoso en el centro de cada fotografía. Barra de referencia = 50µm.

3.5. Perfil Hormonal

Para conocer si existía una relación entre el cambio en los niveles hormonales y el genotipo, se estudiaron principalmente las hormonas SA, la cual tiene relevancia frente al ataque de patógenos biotróficos (estrés biótico), JA-Ile la cual es la forma activa que regula procesos de defensa frente a patógenos necrotróficos y herbívoros, y ABA el cual tiene estrecha relación con la modulación y respuesta frente a un estrés abiótico producido sobre la planta. En el caso de SA este tiene estrecha relación con los procesos de defensa frente a la infección de oídio, mientras que JA-Ile puede promover la síntesis de compuestos antimicrobianos, por otro lado, ABA puede actuar de forma antagónica o tipo “señuelo” frente a un ataque del hongo, levantando defensas en la planta con procesos relacionados al estrés abiótico. Se midieron las concentraciones de estas tres hormonas para los diferentes tiempos estudiados (0, 48, 96 hpi) mediante el servicio del laboratorio de Fisiología vegetal de la Universidad de Santiago, de esta forma se estudió el cambio que presentaban los niveles hormonales para los diferentes genotipos. Para la medición se utilizó una columna de HPLC–ESI–MS/MS, donde se midieron las concentraciones en cada planta utilizando 3 réplicas por cada genotipo. Una vez obtenidas las concentraciones se normalizaron los niveles respecto al tiempo 0 (Tabla 6), para observar los cambios en la concentración de cada hormona (Figura 9). En los gráficos de ABA, se observa una menor inducción de esta hormona para los genotipos *REN1* y *RUN1REN1* en comparación a la susceptible (‘Thompson Seedless’) para las 48 y 96 hpi. Para JA-Ile (forma activa de la hormona dentro de la célula) existe una disminución hacia las 96 hpi para los genotipos *RUN1* y *RUN1REN* versus genotipo susceptible. Finalmente, para la hormona SA, se observa un aumento en la inducción para los genotipos *RUN1* a las 48 hpi y en *REN1* para las 48 y 96 hpi en comparación

a RUN1REN1 y las líneas susceptibles las cuales no presentaron mayores cambios en el tiempo.

Tabla 6. Concentración inicial promedio de las hormonas estudiadas (0 hpi). En la tabla se observan las concentraciones de ABA, Ja-Ile y SA en ng por g de muestra, obtenida del promedio de las tres réplicas analizadas por cada genotipo.

Concentración promedio de las hormonas a 0 hpi			
Genotipo	ABA (ng/g)	Ja-Ile (ng/g)	SA (ng/g)
<i>RUN1</i>	2,80	1,26	19,34
<i>REN1</i>	13,66	1,23	9,84
<i>RUN1REN1</i>	22,77	1,56	33,78
Susceptible	1,53	0,99	15,85

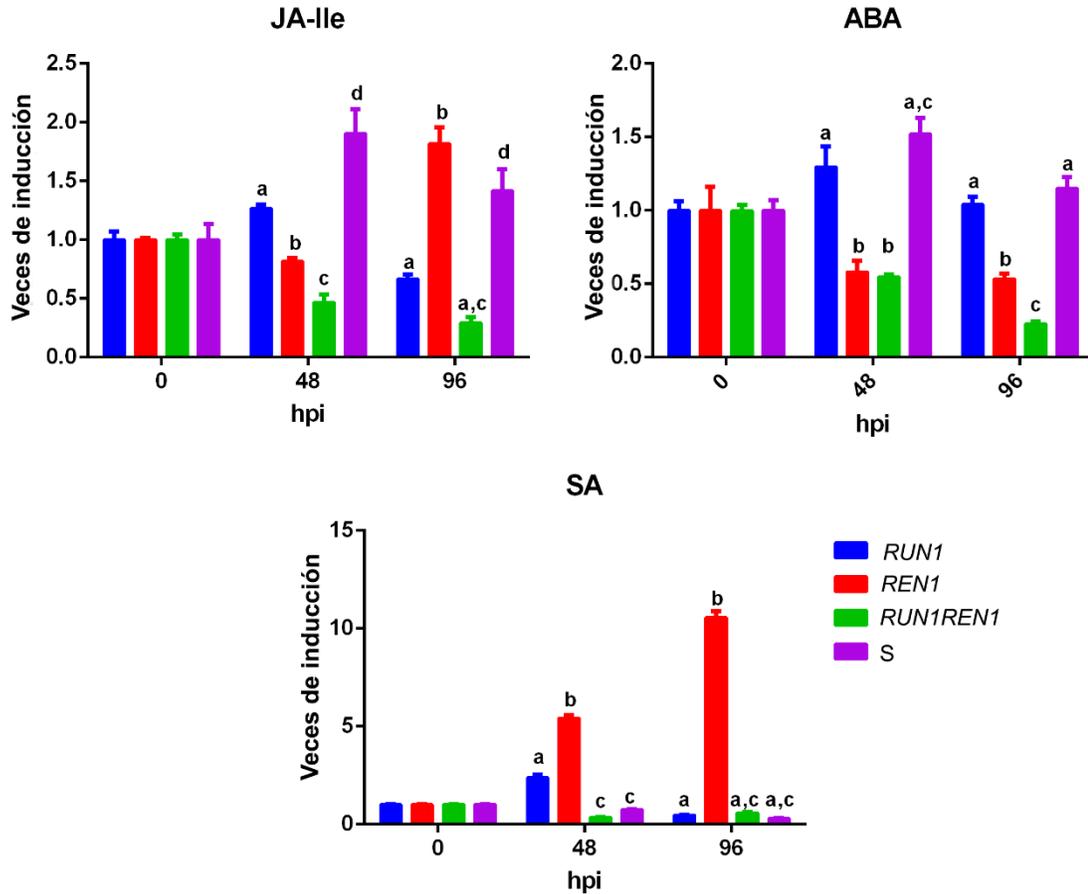


Figura 9. Inducción a partir de 0 hpi de ABA, JA-Ile, SA en plantas infectadas con *Erysiphe necator*. En los ejes se observa las veces de inducción de la hormona relativo al tiempo 0 vs horas post-inoculación del hongo (hpi). El análisis se realizó mediante Two-way RM ANOVA, (GraphPad Prism Software). Las letras indican la diferencia o similitud entre las barras para un mismo tiempo ($P < 0,0001$). Las barras delgadas asociadas a cada genotipo muestran la desviación estándar de las diferentes réplicas ($n=3$, S = 'Thompson Seedless').

3.5. Análisis de inducción para los genes *MLO7* y *PEN1* en plantas de vid inoculadas con *E. necator*

Para el estudio de los genes *MLO7* y *PEN1* involucrados en procesos de susceptibilidad y resistencia respectivamente, se realizó un análisis mediante qRT-PCR, para ello fue necesario realizar una curva de calibración para la estandarización de los partidores utilizados, obteniendo una eficiencia de 97,1% para el gen *VvMLO7* y 96,6% para *VvPEN1* (Figura 10).

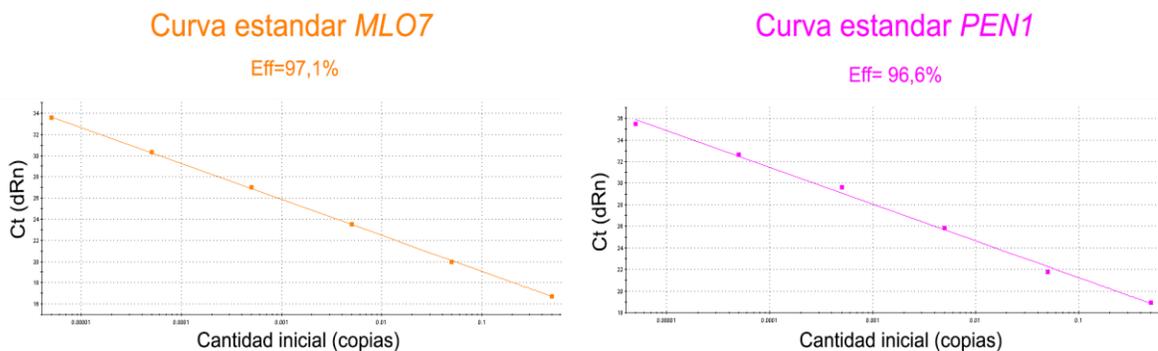


Figura 10. Curva de calibración y eficiencia de las condiciones y partidores utilizados para estudiar la inducción de los genes *MLO7* y *PEN1*. En los ejes se muestran las diluciones realizadas (Cantidad inicial cDNA) vs el Ct registrado a través de la máquina Agilent Mx3000P

Con ello se realizaron los RT-PCR correspondientes para las diferentes muestras donde se extrajo el RNA, para posteriormente sintetizarlo a cDNA. Se normalizó la expresión del gen de interés de acuerdo al gen housekeeping *Vv60SRP*, codificante para una subunidad ribosomal, debido a la poca variación en su expresión al ser sometido a condiciones de estrés biótico. Una vez obtenida la expresión relativa, se normalizaron los genes a estudiar por la expresión relativa al tiempo 0 (Tabla 7) obteniendo la gráfica presentada en la Figura 11.

Tabla 7. Promedio de la expresión de VvMLO7 y VvPEN1 relativo a Vv60SRP a las 0 hpi. En la tabla se muestran la expresión promedio de las tres réplicas utilizadas relativo a la expresión del gen Vv60SRP para cada genotipo a tiempo 0 hpi

Promedio de la expresión relativa a Vv60SRP al tiempo 0 hpi		
Genotipo	VvMLO7	VvPEN1
<i>RUN1</i>	$3,87 * 10^{-2}$	$7,66 * 10^{-3}$
<i>REN1</i>	$8,48 * 10^{-2}$	$1,28 * 10^{-2}$
<i>RUN1REN1</i>	$3,99 * 10^{-1}$	$2,93 * 10^{-2}$
Susceptible	$7,74 * 10^{-1}$	$1,29 * 10^{-1}$

Para *MLO7*, gen relacionado a la susceptibilidad frente al hongo, se ve un comportamiento muy similar en el caso de las líneas *RUN1REN1* comparándolas con las susceptibles, mientras que *RUN1* tiene la mayor inducción a las 96hpi en comparación a los dos genotipos anteriores. En el caso de *PEN1*, *gen* relacionado en procesos de defensa frente a eventos de penetración de las esporas, se ve una diferencia de inducción mucho mayor para *RUN1* y *RUN1REN1* en comparación a la línea susceptible a las 96 hpi.

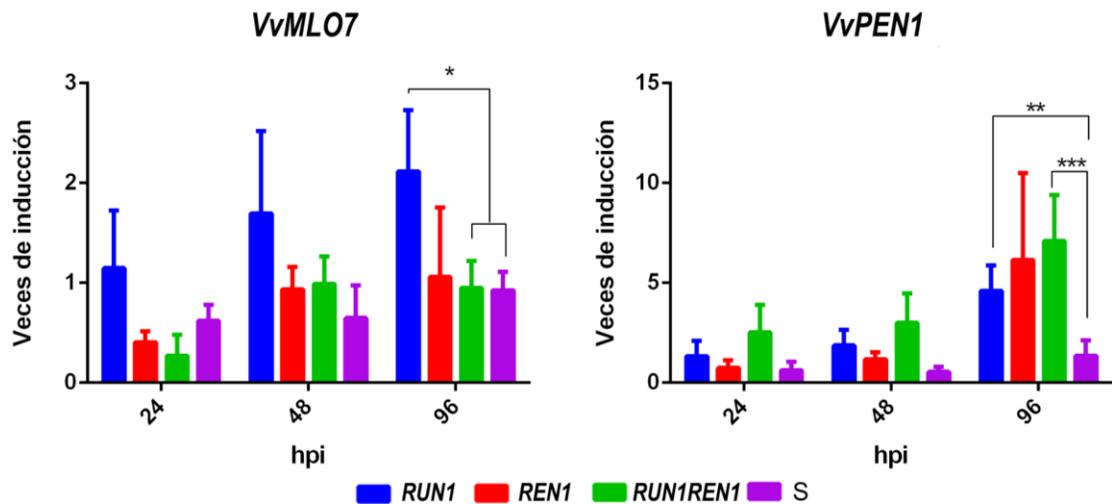


Figura 12. Perfil de expresión génica de VvMLO7 y VvPEN1 en plantas de vid inoculadas con *Erysiphe necator*. Para el análisis se midió la expresión relativa al gen housekeeping *Vv60SRP*, donde posteriormente fueron normalizadas las muestras de tiempos 23, 48 y 96 hpi por la expresión medida en 0 hpi. En la figura se muestra el análisis realizado mediante 2Way ANOVA Tukey's multiple comparisons test $\alpha=0.05$ (GraphPad Prism Software) las barras están dadas por la desviación estándar, y en líneas negras señaladas con asteriscos (*) se indica el nivel de significancia (menor a mayor diferencia entre las líneas). (n=3, S = 'Thompson Seedless').

4. Discusión

4.1. Mejoramiento genético mediante retrocruzamiento en plantas de vid

El objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar la respuesta de aquellas plantas portadoras de los *loci* *RUN1* y *REN1* ante la inoculación con el hongo *E. necator*. Estos *loci* han sido estudiados en investigaciones previas identificados desde plantas no comerciales del género *Vitis* las cuales presentan un alto grado de resistencia frente a la infección del hongo (Barker y col. 2005; Coleman y col. 2009). Mediante cruzamientos dirigidos es posible traspasar esta resistencia desde plantas no comerciales hacia una variedad comercial de interés mediante métodos que no implican la modificación directa del genoma (o producción de transgénicos). A través de la identificación con la ayuda de PCR convencional y el uso de marcadores moleculares, es posible facilitar la selección de aquellas plantas que hayan heredado el carácter deseado desde alguno de sus parentales. Este método presenta ciertas ventajas y desventajas frente a aquellos métodos transgénicos, donde estas últimas plantas debido a su condición de genéticamente modificadas (GMO), dificulta su uso como una variedad comercial de cultivo en algunos países (Jhansi Rani y Usha 2013). Por otro lado, mediante cruzamientos dirigidos es posible ocupar plantas homocigotas de algún locus o gen, como parentales para la herencia de algún carácter dominante que otorgue resistencia contra alguna enfermedad, como lo es *RUN1* contra el oídio. Si esta planta es cruzada con una variedad susceptible, se espera que en la generación F1, por herencia mendeliana 100% de la descendencia presente resistencia contra la enfermedad, mientras que la descendencia de F2 se espera que un 75% sea resistente, pero solo el 25% de las plantas totales sea homocigota para dicho carácter, lo que dificulta la identificación fenotipo-genotipo de aquellas líneas de interés (Pauquet et al. 2001), caso

similar ocurre si se trabaja con dos *loci* a la vez. Esta estrategia es conveniente si se desean obtener plantas con el locus de interés completo, sin embargo, existe un problema de *background* genético, ya que, al cruzar una variedad de baja calidad con una variedad de cultivo comercial, solo un cierto porcentaje (cercano al 50%) del genoma total provendrá de este último. Sin embargo, es posible reducir este *background* de baja calidad, realizando retrocruzamientos dirigidos, es decir la planta obtenida se vuelve a cruzar con alguno de sus parentales o variedad comercial de interés, seleccionando aquellas progenies que presenten la característica de resistencia de una manera iterativa, así mientras más se repita este proceso menor será el *background* aportado en el primer cruzamiento (Katula-Debreceni et al. 2010).

4.2. Genotipificación en plantas de vides portadoras de *RUN1* y *REN1*

Como ya se mencionó anteriormente, utilizando estrategias moleculares es posible minimizar el tiempo requerido para identificar aquellas plantas portadoras de estos *loci* de interés, en este caso *RUN1* y *REN1*. En investigaciones previas (Hoffmann y col., 2008; Coleman y col., 2009;), se logró identificar la presencia de cada *loci* mediante partidores dirigidos hacia una región del locus utilizando marcadores del tipo SSR los cuales cosegregan con la resistencia (Feechan y col 2013). En nuestro caso, para identificar las plantas portadoras de *RUN1*, sabiendo que en dicho locus se encuentra el gen *MrRUN1* que confiere resistencia contra el patógeno, y que las plantas analizadas provenían de parentales portadores de dicho locus, se diseñaron partidores dirigidos para amplificar este gen en particular. Mientras que para identificar la presencia de *REN1*, se utilizaron marcadores moleculares, ya que se desconoce aún cual sería la región específica que otorgaría la resistencia.

La pirimidación de genes ha sido demostrada por ser una buena estrategia para mejorar la duración y eficacia de la resistencia que pueden conferir estos genes R (Djian-Caporalino y col. 2014). Esta estrategia ha sido propuesta debido a la baja durabilidad de la resistencia conferido por un solo gen o locus que presentaban los sistemas de cultivo al estar sometidos bajo la presión de la enfermedad, ya que dependiendo de la tasa de mutación y población del patógeno, este es capaz de evolucionar y encontrar mecanismos alternativos que le permitan evadir la respuesta de defensa conferida por solo un locus (McDonald y Linde 2002), dejando así los cultivos expuestos a la nueva cepa mutada. Al utilizar dos o más *loci* que aporten genes relacionados con el proceso de resistencia, la probabilidad de que alguna cepa logre sobrellevar ambos se hace mucho menor, por lo que esta resistencia contra la enfermedad sería mucho más duradera en el tiempo (Gill-Langarica 2008). Así por ejemplo, se han realizado pirimidaciones para genes R utilizando como modelo plantas de papas (*Solanum berthaultii*), donde se utilizaron dos genes de resistencia diferentes para combatir el mildiu de la papa causado por el oomycete *Phytophthora infestans*. Se concluyó que aquellas plantas transformadas con ambos genes R poseían un efecto aditivo en comparación con aquellas que solo poseían uno de estos (Tan y col. 2010). También se han realizado trabajos de pirimidación en plantas de arroz, combinando un total de 4 genes de resistencia para combatir el tizón del arroz provocado por el hongo *Magnaporthe grisea* (Tabien y col. 2000), aunque en este caso los genes utilizados no tuvieron un efecto aditivo en combatir la enfermedad. A pesar de esto, la pirimidación sigue siendo una estrategia efectiva para mantener la durabilidad de la resistencia en el tiempo. En vides, se han realizado pirimidación de genes mediante la cruce de variedades resistentes a ciertos patógenos, utilizando la variedad 'Regent' (Fischer y col.

2004) portadora de los genes *MrRUN1* y *RPV1*, donde este último gen otorga resistencia contra ciertos tipos de mildiú de la vid causado por el oomicete *Plasmopara viticola*. Así con el uso de marcadores moleculares les fue posible genotipificar la progenie entre el cruce de 'Regent' x 'VHR 3082-1-42', donde esta última variedad proviene de cruces entre variedades comerciales de *V.vinifera*, obteniéndose un 48% de plantas con un genotipo resistente al oídio y mildiú de la vid (Eibach y col. 2009).

Las plantas utilizadas en este trabajo provienen de cruzamientos dirigidos, utilizando como parentales a *M. rotundifolia* y *V.vinifera* cv. 'Dhanzhal kara', las cuales portan los *loci* de resistencia *RUN1* y *REN1* respectivamente. En trabajos anteriores (Agurto M. 2016; Schelter R. 2014) se realizaron 7 retrocruzamientos para la piramidación de estos genes utilizando variedades de *Vitis* comerciales, donde se generaron las plantas presentadas en la Tabla 1.

Para genotipificar aquellas plantas portadoras de ambos *loci* se utilizaron las estrategias expuestas previamente en Resultados 3.1 y 3.2. Para identificar la resistencia conferida por el locus *RUN1* proveniente de *M. rotundifolia*, se utilizaron primers que amplifican para un gen en específico dentro de este, *MrRUN1*, ya que este gen ha sido caracterizado en plantas transgénicas por dar el mayor aporte a la resistencia frente a la infección del hongo respecto a otros sitios ORFs (Feechan y col 2013). *REN1* ha probado ser un gran aporte frente al ataque de oídio en aislados provenientes de Norte América Australia y Francia, sin embargo, se identificó un aislado nativo de Norte América, desde donde proviene *M.rotundifolia*, el cual fue capaz de evadir la resistencia conferida por este locus (Feechan y col. 2013b). Para disminuir el nivel de ocurrencia en que un aislado logre romper con la resistencia, es conveniente utilizar la piramidación de genes ya que

como se mencionó anteriormente, por probabilidad, es más complejo evadir dos *loci* de resistencia a la vez, que uno solo. De este mismo trabajo, se comparó la resistencia conferida por el locus completo versus el gen *MrRUN1*, donde las plantas que portaban el locus completo poseían una mayor resistencia frente al hongo, esto debido a que en el locus existen otros ORFs que codificarían para diversas proteínas de resistencia, las cuales estarían aportando mediante otras rutas o procesos, ya sea identificando otro efector o proteína comprometida en los procesos de infección, lo cual contribuye al rápido reconocimiento del patógeno para producir una respuesta temprana. Con el diseño de dos parejas de partidores que amplifican en dos regiones distintas del gen *MrRUN1* (Figura 4) fue posible identificar las plantas portadoras de este, las cuales se consideraron como *RUN1* positivas ya que las muestras analizadas provenían de cruzamientos de plantas portadoras de este locus, por lo que es posible asociar la presencia del locus (o parte de este) a aquellas que porten el gen. Este locus ha sido descrito desde *Muscadinia rotundifolia* (Barker, C. L. et al. 2005) por conferir una resistencia temprana en la infección del hongo, esto concuerda con los resultados obtenidos en aquellas líneas positivas para *RUN1*, ya sea para las líneas *RUN1* o *RUN1REN1*. Estas presentaron una rápida generación de ROS (visto mediante tinción con DAB) asociada a una posible respuesta tipo ETI, provocando HR en las células infectadas a tiempos tempranos (Figuras 7 y 8).

Para identificar el locus *REN1* se utilizó una estrategia diferente, ya que a pesar de la existencia de varias regiones codificantes dentro de este locus, se desconoce aún cuál de estos es exactamente el gen responsable del reconocimiento y gatillamiento de la defensa contra el patógeno, por lo que se utilizaron marcadores del tipo microsatélite (SSR) (Coleman y col. 2009; Hoffmann y col. 2008). La ventaja que ellos tienen es que

difieren en el número de repeticiones con respecto a las cepas susceptibles, por lo que se puede conocer la presencia del locus, identificando exactamente el tamaño de la banda amplificada mediante electroforesis capilar. Este locus proveniente de la variedad 'Kishmish Vatkana' ha sido descrito por mediar una resistencia retardada en comparación con *RUN1*, ya que en tiempos tempranos la cinética de infección es muy similar a la de un cultivar susceptible, sin embargo es capaz de limitar el posterior crecimiento de hifas secundarias, proliferación y formación de conidióforos por parte del hongo (Hoffmann y col. 2008), otorgando de esta forma un fenotipo resistente frente a una infección.

Como solo se analizó una población al azar de plantas (Tabla 5) dentro de una subprogenie (Tabla 1), donde esta última fue sometida previamente a procesos de selección por su resistencia contra el oídio quedando solo aquellas plantas fenotípicamente resistentes, no es posible esperar una proporción aproximada de plantas con genotipos *RUN1*, *REN1* y *RUN1REN1*.

4.3. Cinética de infección, desarrollo del hongo sobre variedades resistentes.

Para estudiar la proliferación del hongo en los diferentes genotipos identificados, se utilizaron las plantas provenientes del cruce P09-105-34 x Crimson Seedless, ya que se contaba con suficiente material para estudiar los tres genotipos resistentes. Se tomó un aislado del hongo propagado en hojas 'Thompson Seedless' para inocular en los experimentos. Este aislado provenía desde los cultivares de vid susceptibles ubicados en la parcela de Curacaví, Chile, donde el grupo genético B de *Erysiphe necator* es el

más predominante (98%), de acuerdo a 105 aislados analizados en 23 viñedos a lo largo de Chile realizado en el trabajo de Araya y col. 2015.

Para en análisis histológico, se utilizó la tinción DAB y así identificar la aparición de ROS, ya que este compuesto reacciona con el peróxido de hidrógeno presente en la célula (H_2O_2), lo que a su vez reacciona con la enzima peroxidasa dando como producto final un precipitado color marrón. El azul de tripán fue utilizado para identificar estructuras fúngicas, ya que este adhiere a estructuras tales como hifas y conidios tiñéndolas de color azul. Con esta doble tinción es posible observar en una misma muestra la aparición de ROS y las células infectadas por el hongo, donde en tiempos tempranos a 24 hpi se vio producción de ROS en los genotipos *RUN1* y *RUN1REN1* en aquellas células infectadas. Para las líneas *REN1* en la mayoría de los discos estudiados ROS aparece luego de las 48hpi, debido a este desfase es posible observar una mayor cantidad de hifas secundarias para este genotipo, ya que por lo observado, el mecanismo de resistencia involucra la aparición de ROS, donde el locus *REN1* en particular induciría la respuesta de defensa en una etapa tardía post-infectiva del hongo (Hoffmann y col. 2008). Mientras que en las líneas susceptibles es posible observar una gran proliferación continua del hongo, llegando incluso a la formación de conidióforos a las 96 hpi, Figura 7. Para las líneas *RUN1REN1* se observó una alta generación de ROS desde tiempos tempranos, además de un bajo número de esporas germinadas e hifas secundarias, lo que sugiere una resistencia adicional en comparación a las líneas resistentes con un solo *loci*, esto será discutido más adelante, sin embargo cabe mencionar que es similar al caso de estudios previos realizados en la pirimidación de *loci* de resistencia conferidos por *RUN1REN2* (Feechan y col. 2015) y el caso del mildiu de la papa anteriormente mencionado (Tan y col. 2010). Así, los resultados muestran que una alta

aparición de ROS producida en aquellos cultivares resistentes portadores de *RUN1* y/o *REN1* en comparación a las líneas susceptibles, induciría la resistencia contra el hongo, estos fuertes cambios oxidativos que ocurren dentro de la célula podrían asociarse a procesos de HR, clásicos de la respuesta tipo ETI, como mecanismo de defensa frente a infección del hongo para impedir así la propagación del hongo, impidiendo a este último tomar los nutrientes desde la célula muerta (Grant y Loake 2000).

4.4. Análisis cortes finos en plantas infectadas

Para los análisis de cortes finos, se utilizaron cortes transversales de hojas a las 96 hpi, en las líneas resistentes, es posible observar muerte programada de algunas células en el espacio del parénquima en empalizada (Figura 8). Por un lado, las líneas *RUN1REN1* y *RUN1* presentaban un parénquima esponjoso bastante íntegro a diferencia de las líneas *REN1* y susceptibles. Una posible hipótesis es que el desarrollo de hifas secundarias que tiene el hongo en las primeras etapas de infección podría alterar la estructura del parénquima. Para el caso de las líneas portadoras solo de *REN1* comparado con las demás líneas resistentes, estas fueron las más afectadas tanto en la cinética de infección como en el análisis de cortes finos, lo que apoya nuevamente los estudios que indican que los mecanismos asociados a *REN1* actuarían en una etapa tardía a la infección del hongo (Hoffmann y col. 2008). A pesar de esto último, estas líneas siguen presentando una clara resistencia contra el patógeno en comparación a aquellas líneas susceptibles, ya que si bien las líneas *REN1* presentan poca integridad del parénquima esponjoso, estas no presentaron grandes deformaciones en el parénquima de empalizada, como sí lo hicieron las líneas susceptibles, las cuales al no poseer genes de resistencia que permitan la activación de la respuesta tipo ETI, no presentan PCD. Esto último se puede asociar a la morfología característica de las células

que reducen su tamaño, indicado por las flechas en rojo presentados en la Figura 8, debido a la presencia de alguno de los *loci* de resistencia los que permiten la activación de la respuesta tipo ETI. Así, con la generación de PCD, el hongo se ve imposibilitado de seguir nutriéndose de la célula infectada, impidiendo su posterior propagación. Esto también es avalado en los experimentos realizado con la tinción DAB, ya que como se mencionó anteriormente la aparición de ROS podría asociarse a una respuesta de tipo HR, proceso que lleva a la muerte celular, impidiendo así que el hongo siga nutriéndose y proliferando. Una posible causa para la deformación del parénquima observada mayormente en las líneas susceptibles puede ser debido a la estrategia de infección que utiliza *E. necator* para infectar el tejido celular, donde mediante el haustorio, estructura especializada encargada de la absorción de nutrientes, es capaz de adquirir los componentes de la célula hospedera, logrando así reducir su tamaño y causando la deformación observada en la Figura 8 (Gadoury y col. 2012).

4.5. Análisis hormonal, modulación frente estrés biótico.

Se realizaron análisis midiendo los niveles de tres hormonas debido a que estas participan y regulan diversos procesos fisiológicos involucrados al estrés, ya sea abiótico en el caso de ABA o biótico en el caso de JA y SA. En conjunto con otras hormonas (tales como giberelinas, auxinas, citoquininas ente otras), regulan la comunicación mediante la represión o activación de una compleja red de metabolitos, genes y factores de transcripción, los cuales participan en los procesos de defensa y adaptación según sea la situación requerida (Pieterse y col. 2009). Para las distintas líneas se observaron diversos cambios según el genotipo estudiado. Si bien las concentraciones iniciales más

altas de ABA y SA están presentes en las líneas *RUN1REN1*, mientras que para Ja-Ile es similar en todas las líneas, no sería correcto realizar comparaciones tan categóricas entre las concentraciones iniciales, ya que a pesar de que las muestras fueron tomadas a un mismo tiempo, estas pudieron sufrir variaciones en su concentración debido a alteraciones extrínsecas a la metodología (estado de la hoja, humedad, luz, etc) a pesar de que estas se trataron de reducir lo más posible, por lo que se optó por estudiar la inducción de estas hormonas relativas al tiempo 0 hpi. Así por ejemplo para ABA, la cual es una hormona conocida por dar tolerancia en un medio de estrés abiótico, podría cumplir otras funciones en respuesta a una infección patogénica. Así se ha estudiado el rol que esta hormona cumple en la planta de remolacha (*Beta vulgaris*) al momento de la infección del hongo *Cercospora beticolacon*, donde este último es capaz de activar las rutas para señalización de ABA, el cual actuaría en este caso como un regulador negativo para la respuesta de defensa contra el hongo permitiéndole infectar el tejido (Schmidt y col. 2008). De manera similar, se vio un aumento de ABA en aquellas líneas *RUN1* y susceptibles para tiempos tempranos, el cual disminuye con el tiempo. Esto podría ser una estrategia infectiva de *E.necator* para disminuir la respuesta de defensa contra estrés biótico en la planta, teniendo un efecto antagónico en los niveles de SA y JA (Anderson y col. 2004), los cuales han mostrado tener un rol clave contra la defensa de infecciones biotróficas y necrotróficas respectivamente (Forcat y col. 2008), así como también la disminución en los niveles de inducción de esta hormona pueden dar cuenta del tipo de estrés que percibe la planta. De manera similar se observó una disminución en el tiempo para los niveles que presentaba esta hormona en las líneas *REN1* y *RUN1REN1*, lo que sugiere una disminución en los niveles de expresión de factores que estarían relacionadas a estrés abiótico, para dar paso a respuestas relacionadas con el

proceso de estrés biótico y generar una defensa para combatir la infección del patógeno, aunque se deberían realizar mayores análisis como el bloqueo o sobreactivación de ABA para comprobar esta hipótesis.

Estudiando los niveles de JA-Ile (forma activa de la hormona dentro de la célula), la cual participa mayormente en procesos de defensa contra patógenos necrotróficos activando genes tales como *PDF1.2*, que inducen la producción de compuestos antimicrobianos (Penninckx y col. 1998), encontramos un aumento en la concentración de las líneas *REN1* y *susceptibles*. Como ya se mencionó anteriormente, en *Arabidopsis* esta hormona juega un rol en respuesta al ataque de un patógeno necrotrófico (Glazebrook 2005), aumentando los niveles de síntesis de esta hormona activando genes de defensa contra el hongo (*PDF1.2*). Por otro lado rutas activadas por SA, activan respuestas tipo HR y la generación de una defensa sistémica, ya que es una hormona que participa en las respuestas de defensa contra los patógenos biotróficos (Thomma y col. 2001). Si bien esta última en ciertas condiciones, puede actuar como antagonista de la señalización de JA mediante un proceso modulado en el citosol por la proteína de defensa NPR1 (Spoel y col. 2003). También se ha reportado aumento en los niveles de ambas hormonas en respuesta de defensa contra patógenos como *E. necator*, modulando mecanismos tales como, SAR, HR y acumulación de compuestos antimicrobianos tales como fitoalexinas (Weng et al. 2014). Por lo que el aumento de la hormona JA-Ile detectado en estas líneas podría causar un efecto antagónico o sinérgico contra hongos biotróficos como *E.necator*, dependiendo de las concentraciones, mecanismos y modulación que se presenten dentro de la planta. De acuerdo a los resultados obtenidos se observa en las líneas resistentes *REN1* un aumento en la inducción de ambas hormonas (Figura 9), por lo que en este caso se podrían estar

actuando sinérgicamente. Sin embargo, en líneas susceptibles, se observa que un aumento de JA-Ile no se correlaciona con un aumento de SA, lo que sugiere que dependiendo del genotipo infectado, la ruta de activación de estas hormonas podría variar.

Por último, los niveles de SA se ven inducidos en las líneas resistentes *RUN1* y *REN1* a las 48 hpi y en *RUN1* disminuye las 96 hpi. SA ha sido estudiado por activar respuestas de defensa contra patógenos biotróficos activando diversos factores de respuesta (Thomma y col. 2001). Un ejemplo de esto es el rol que cumple como intermediario en la activación de la respuesta sistémica adquirida (SAR) y respuesta de tipo HR llevada a cabo por el aumento de ROS. Donde también participan la activación de un grupo de genes *PR*, algunos de los cuales codifican para proteínas con actividad antimicrobiana, mediante generación de peróxidos de hidrógenos, quitinasas, entre otras (Durrant y Dong 2004; Van Loon y col. 2006). Esto produce, por un lado, una inducción sistemática y duradera en la planta, acondicionándola para futuras infecciones llevada a cabo por la respuesta de tipo SAR y otra local contenida llevada a cabo por la respuesta tipo HR lo que lleva a la muerte de la célula infectada para impedir con la propagación del hongo. Los niveles de SA en las líneas *RUN1REN1* no se vieron drásticamente afectados. Una posible explicación para esto, relacionándolo con la baja en los niveles de SA de las 48 a 96 hpi para las líneas *RUN1*, es que estas líneas al presentar un mecanismo al parecer más eficaz que las líneas *REN1*, no tienen la necesidad de activar una maquinaria tan grande de defensa contra el patógeno, velando por el uso eficaz de recursos mínimos y suficientes para combatir la infección dentro de la planta, lo que sugiere que las defensas basales generadas en la planta son suficientes para controlar la infección del patógeno. Siguiendo esta misma lógica *RUN1REN1* por lo tanto tendría un mecanismo más eficaz

que *RUN1*, lo que sería suficiente para combatir la infección localmente mediante respuesta del tipo HR, y por ende no sería necesario elevar mayormente los niveles de SA para combatir al patógeno, velando por la optimización de los recursos disponibles.

4.6. PCR cuantitativo de los genes *PEN1* y *MLO7* involucrados en el proceso de defensa

En los ensayos de qRT-PCR, se estudió la expresión del gen *VvPEN1*, este gen ha sido caracterizado por tener un rol importante en la resistencia a la penetración del hongo, teniendo actividad en eventos de fusiones de membranas que involucra el tráfico de vesículas dentro de la célula (Feechan y col. 2013a). En *Arabidopsis* (*AtPEN1*) esta proteína forma un complejo ternario con otras proteínas encargadas de facilitar la fusión de vesículas, lo que en conjunto forma una proteína *Soluble NSF Attachment Protein* o *SNARE* (Kwaaitaal y col. 2010), donde mutantes knockout de este gen carecen de resistencia contra la penetración del hongo, permitiendo la infección de especies no adaptadas de oídio, sin embargo *VvPEN1* es capaz de complementar esta mutación, restaurando el fenotipo resistente (Feechan y col. 2013a). Por otro lado, las proteínas de membrana Mildew Resistance Locus O (MLO) son una familia de proteínas las cuales tienen siete dominios de transmembrana. Estas están implicadas en diversos procesos fisiológicos para la formación de tejidos, tales como la morfología de raíces, recepción del tubo polínico, entre otras (Pessina y col. 2016). Tanto en cebada (*Hordeum vulgare*) como en *Arabidopsis*, se ha visto que la mutación de estas proteínas dan una completa resistencia contra una amplia variedad de especies de oídio (Miklis y col. 2007). Para el caso de *V. vinifera*, se han identificado alrededor de 17 genes *VvMLO*, los cuales estarían involucrados en la susceptibilidad a una posible infección (Feechan y col. 2009). En el caso particular de *VvMLO7* se ha visto un aumento de la expresión en las bayas

inmaduras, así como también en los estadios de infección temprana de oídio, donde knockdowns de RNAi para este gen, en conjunto con *VvMLO6*, disminuyen en gran parte la susceptibilidad que se produce a la infección del hongo (Pessina y col. 2016).

Los niveles de expresión inicial más altos para *VvMLO7* se detectaron en las líneas *RUN1REN1* y susceptibles, mientras que para la expresión de *VvPEN1* los niveles iniciales más altos fueron registrados en las líneas *REN1*, *RUN1REN1* y susceptibles, así estos resultados se pueden interpretar estudiando la inducción que estos genes presentaron debido a la infección del hongo sobre la hoja para los diferentes genotipos (Figura 11). Así por ejemplo *VvPEN1* se ve inducido en gran parte para todas las líneas resistentes, inclusive hay una pequeña inducción en las líneas susceptibles a las 96hpi, donde las líneas *RUN1* y *RUN1REN1* tienen la mayor inducción en comparación con las líneas susceptibles. Esto concuerda con lo que se encuentra en la literatura (Feechan y col. 2013a), ya que esta proteína estaría aportando en gran parte a la resistencia del hongo mediante mecanismos aun no dilucidados, los cuales impedirían la penetración del hongo para aquellas líneas resistentes en las que el gen se ve inducido en mayor magnitud.

En el caso de *VvMLO7*, este se ve inducido en la mayoría de los tiempos para todas las líneas, existiendo una inducción significativa en las líneas *RUN1* a las 96 hpi en comparación con las líneas *RUN1REN1* y susceptibles. La inducción de *VvMLO7* como ya se mencionó anteriormente juega un papel importante en la infección del hongo, y por lo tanto este último podría estar induciendo en gran parte la expresión de este gen para lograr una infección efectiva, sin embargo a pesar que en las líneas resistentes se ve una inducción incluso mayor que en las líneas susceptibles, este aumento no es

suficiente para romper la resistencia conferida por otros mecanismos de defensa como lo son la respuesta de tipo ETI, ausente en las líneas susceptibles.

4.7. Resumen y análisis global

De acuerdo a esto, los experimentos y análisis realizados anteriormente, nos encontramos con que las líneas portadoras *RUN1REN1* estarían presentando una resistencia aditiva contra el hongo al portar ambos *loci* de resistencia, en comparación con aquellas líneas resistentes portadoras de uno solo, donde los mecanismos asociados estarían traducándose en un eficaz y rápido reconocimiento del patógeno, generando un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que sugiere una rápida muerte de las células infectadas para impedir de esta forma que el hongo complete su ciclo y se propague, además de un aumento en la defensa basal mediada por *VvPEN1* y otros posibles genes involucrados en la transcripción fitoalexinas y otros metabolitos con actividad antifúngica (Agurto Mario 2016), produciendo así respuesta robusta de defensa contra el patógeno la cual es de carácter contenido y localizado.

5. Proyecciones

Si bien se logró caracterizar en parte la respuesta generada en plantas portadoras de los *loci* *RUN1* y *REN1* contra el oídio de la vid, aún faltan muchos estudios para dilucidar el complejo mecanismo y relación que existe entre el hongo y la planta. Estudiar los efectores del hongo y cuáles serían sus *targets* dentro de la célula a infectar podría abrir un amplio espectro de estrategias posibles para la resistencia frente a la infección, así como también cuales serían los mecanismos de cómo estos *loci*, *RUN1* y *REN1*, estarían

identificando el ataque del patógeno. Hasta la fecha se han postulado tres modelos en cómo estas proteínas R estarían identificando al efector o la actividad que provoca este dentro de la célula, sin embargo aún se desconoce con exactitud a cuál de estos modelos responde cada *loci*. Al ser una resistencia aditiva sugiere que estos estarían reconociendo efectores o rutas de infecciones diferentes, por lo que al abarcar una mayor área de posibles *targets*, la planta puede responder con mayor anticipación y efectividad. Además de este trabajo realizado en hojas de vid, se requieren estudios en las bayas de estas, ya que finalmente, este es el principal foco de interés para la producción de diversos productos. Ya sea, identificando la resistencia que estas tendrían, además de la calidad y características que estas presentarían. Así se seleccionarían las plantas que posean las características más deseables para ser utilizadas en campo, donde cabe mencionar la importancia y los estudios constantes que deben estar realizándose cada año para comprobar que ningún aislado (al menos los aislados presentes en cada contexto cercano a las zonas de cultivos) logre romper la resistencia conferida por la piramidación de estos *loci*, ya que podría ser un peligro para todas estas líneas propagadas.

6. Conclusiones

- El uso de estrategias moleculares, del tipo PCR directo o microsatélite (SSR), permitieron una rápida identificación en la presencia del gen *MrRUN1* o el locus *REN1*, respectivamente.
- La pirimidación de los *loci RUN1REN1* generó un efecto aditivo, en la respuesta de defensa la cual pareciera ser más contenida y localizada a diferencia de las líneas portadoras de un solo locus.
- La producción de ROS en aquellas células infectadas para combatir el avance de la infección sugiere estar mediada por los *loci* de resistencia, los cuales estarían gatillando un mecanismo de respuesta tipo ETI.
- Mientras más temprana sea la detección de la infección, por parte de las proteínas R, menor será la pérdida de tejido productivo y morfología de la planta, esto se puede ver reflejado tanto en la cinética de infección como en el análisis de cortes finos.

7. Publicaciones y presentaciones a congreso

***RUN1* and *REN1* Pyramiding in Grapevine (*Vitis vinifera* cv. Crimson Seedless) Displays an Improved Defense Response Leading to Enhanced Resistance to Powdery Mildew (*Erysiphe necator*).** Mario Agurto, Rudolf O. Schlechter, Grace Armijo, Esteban Solano, Carolina Serrano, Rodrigo A. Contreras, Gustavo E. Zúñiga and Patricio Arce-Johnson¹ (2017):- publicada en la revista "Frontiers in Plant Science". DOI: 10.3389/fpls.2017.00758.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Vitis vinifera* RESISTANCE TO FUNGAL PATHOGENS *Botrytis cinerea* AND *Erysiphe necator*, Armijo, Grace., Agurto, Mario., Meyer, Carlos., Nuñez, Constanza., Solano, Ignacio., Schlechter, Rudolf., Arce-Johnson, Patricio., (Reunión de Biología vegetal 2016) <http://www.biologiavegetal.cl>

8. Referencias

Agurto, Mario; Schlechter, Rudolf O.; Armijo, Grace; Solano, Esteban; Serrano, Carolina; Contreras, Rodrigo A. et al. (2017): RUN1 and REN1 Pyramiding in Grapevine (*Vitis vinifera* cv. Crimson Seedless) Displays an Improved Defense Response Leading to Enhanced Resistance to Powdery Mildew (*Erysiphe necator*). En: *Frontiers in plant science* 8, pág. 265. DOI: 10.3389/fpls.2017.00758.

Agurto Morales Mario Eduardo, (Santiago, Chile, November 2016). Identification and characterization of the powdery mildew (*Erysiphe necator*) resistance mechanism associated to pyramiding of *RUN1* and *REN1* resistance loci in table grape (*Vitis vinifera*) genotypes, developed by conventional breeding. Pontificia Universidad Católica de Chile Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Thesis to obtain the degree of Doctor Ciencias de la Agricultura, Thesis presented as part of the requirements for the degree of Doctor en Ciencias de la Agricultura.

Anderson, Jonathan P.; Badruzsafari, Ellet; Schenk, Peer M.; Manners, John M.; Desmond, Olivia J.; Ehlert, Christina et al. (2004): Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. En: *The Plant cell* 16 (12), pág. 3460–3479. DOI: 10.1105/tpc.104.025833.

Araya, C.; Rosales, I. M.; Méndez, M. A.; Delmotte, F. (2015): Identification and geographic distribution of genetic groups of *Erysiphe necator* in Chilean vineyards. En: *VITIS - Journal of Grapevine Research* 53 (3), pág. 163. Disponible en línea en <https://ojs.openagrar.de/index.php/VITIS/article/download/3961/3941>.

Armijo, Grace; Schlechter, Rudolf; Agurto, Mario; Munoz, Daniela; Nunez, Constanza; Arce-Johnson, Patricio (2016): Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios. En: *Frontiers in plant science* 7, pág. 382. DOI: 10.3389/fpls.2016.00382.

Bagchi, Debasis; Bagchi, Manashi; Stohs, Sidney J.; Das, Dipak K.; Ray, Sidhartha D.; Kuszynski, Charles A. et al. (2000): Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract. Importance in human health and disease prevention. En: *Toxicology* 148 (2-3), pág. 187–197. DOI: 10.1016/S0300-483X(00)00210-9.

Bao Do, C.; Cormier, F. (1991): Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. En: *Plant cell reports* 9 (9), pág. 500–504. DOI: 10.1007/BF00232105.

Barker, C. L.; Donald, T.; Pauquet, J.; Ratnaparkhe, M. B.; Bouquet, A.; Adam-Blondon, A-F et al. (2005): Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, Run1, using a bacterial artificial chromosome library. En: *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 111 (2), pág. 370–377. DOI: 10.1007/s00122-005-2030-8.

Coleman, Courtney; Copetti, Dario; Cipriani, Guido; Hoffmann, Sarolta; Kozma, Pal; Kovacs, Laszlo et al. (2009): The powdery mildew resistance gene REN1 co-

segregates with an NBS-LRR gene cluster in two Central Asian grapevines. En: *BMC genetics* 10, pág. 89. DOI: 10.1186/1471-2156-10-89.

Coll, N. S.; Epple, P.; Dangl, J. L. (2011): Programmed cell death in the plant immune system. En: *Cell death and differentiation* 18 (8), pág. 1247–1256. DOI: 10.1038/cdd.2011.37.

Collier, Sarah M.; Moffett, Peter (2009): NB-LRRs work a "bait and switch" on pathogens. En: *Trends in plant science* 14 (10), pág. 521–529. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.08.001.

Consonni, Chiara; Humphry, Matthew E.; Hartmann, H. Andreas; Livaja, Maren; Durner, Jörg; Westphal, Lore et al. (2006): Conserved requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. En: *Nature genetics* 38 (6), pág. 716–720. DOI: 10.1038/ng1806.

Dangl, J. L.; Jones, J. D. (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. En: *Nature* 411 (6839), pág. 826–833. DOI: 10.1038/35081161.

Djian-Caporalino, Caroline; Palloix, Alain; Fazari, Ariane; Marteu, Nathalie; Barbary, Arnaud; Abad, Pierre et al. (2014): Pyramiding, alternating or mixing: comparative performances of deployment strategies of nematode resistance genes to promote plant resistance efficiency and durability. En: *BMC plant biology* 14, pág. 53. DOI: 10.1186/1471-2229-14-53.

Dodds, Peter N.; Rathjen, John P. (2010): Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. En: *Nature reviews. Genetics* 11 (8), pág. 539–548. DOI: 10.1038/nrg2812.

Durrant, W. E.; Dong, X. (2004): Systemic acquired resistance. En: *Annual review of phytopathology* 42, pág. 185–209. DOI: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421.

Eibach, R.; Zyprian, E.; Töpfer, R. (2009): The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding En: *Acta Hort.* (827), pág. 551–558. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.827.96.

Feechan, A.; Jermakow, A. M.; Ivancevic, A.; Godfrey, D.; Pak, H.; Panstruga, R.; Dry, I. B. (2013a): Host cell entry of powdery mildew is correlated with endosomal transport of antagonistically acting *VvPEN1* and *VvMLO* to the papilla. En: *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 26 (10), pág. 1138–1150. DOI: 10.1094/MPMI-04-13-0091-R.

Feechan, Angela; Anderson, Claire; Torregrosa, Laurent; Jermakow, Angelica; Mestre, Pere; Wiedemann-Merdinoglu, Sabine et al. (2013b): Genetic dissection of a TIR-NB-LRR locus from the wild North American grapevine species *Muscadinia rotundifolia* identifies paralogous genes conferring resistance to major fungal and oomycete pathogens in cultivated grapevine. En: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 76 (4), pág. 661–674. DOI: 10.1111/tpj.12327.

Feechan, Angela; Jermakow, Angelica M.; Dry, Ian B. (2009): Grapevine *MLO* candidates required for powdery mildew pathogenicity? En: *Plant Signaling & Behavior* 4 (6), pág. 522–523. DOI: 10.1071/FP08173.

Feechan, Angela; Kocsis, Marianna; Riaz, Summaira; Zhang, Wei; Gadoury, David M.; Walker, M. Andrew et al. (2015): Strategies for *RUN1* Deployment Using *RUN2* and *REN2* to Manage Grapevine Powdery Mildew Informed by Studies of Race Specificity. En: *Phytopathology* 105 (8), pág. 1104–1113. DOI: 10.1094/PHYTO-09-14-0244-R.

Fischer, B. M.; Salakhutdinov, I.; Akkurt, M.; Eibach, R.; Edwards, K. J.; Töpfer, R.; Zyprian, E. M. (2004): Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. En: *Theoretical and Applied Genetics* 108 (3), pág. 501–515. DOI: 10.1007/s00122-003-1445-3.

Forcat, Silvia; Bennett, Mark H.; Mansfield, John W.; Grant, Murray R. (2008): A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. En: *Plant methods* 4, pág. 16. DOI: 10.1186/1746-4811-4-16.

Fung, Raymond W. M.; Gonzalo, Martin; Fekete, Csaba; Kovacs, Laszlo G.; He, Yan; Marsh, Ellen et al. (2008): Powdery mildew induces defense-oriented reprogramming of the transcriptome in a susceptible but not in a resistant grapevine. En: *Plant physiology* 146 (1), pág. 236–249. DOI: 10.1104/pp.107.108712.

Gadoury, David M.; Cadle-Davidson, Lance; Wilcox, Wayne F.; Dry, Ian B.; Seem, Robert C.; Milgroom, Michael G. (2012): Grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*): a fascinating system for the study of the biology, ecology and epidemiology of an obligate biotroph. En: *Molecular plant pathology* 13 (1), pág. 1–16. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2011.00728.x.

Gao, Qing-Ming; Zhu, Shifeng; Kachroo, Pradeep; Kachroo, Aardra (2015): Signal regulators of systemic acquired resistance. En: *Frontiers in plant science* 6. DOI: 10.3389/fpls.2015.00228.

Gill-Langarica, Homar René, & Mayek-Pérez, Netzahualcoyotl. (2008). Los Marcadores Moleculares en el Mejoramiento Genético de la Resistencia a Enfermedades del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Aplicaciones y Perspectivas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(2), 164-176.

Gehm, Barry D.; McAndrews, Joanne M.; Chien, Pei-Yu; Jameson, J. Larry (1997): Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. En: *PNAS* 94 (25), pág. 14138–14143. Disponible en línea en <http://www.pnas.org/content/94/25/14138.full>.

Glazebrook, Jane (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. En: *Annual review of phytopathology* 43, pág. 205–227. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.

Grant, J. J.; Loake, G. J. (2000): Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. En: *Plant physiology* 124 (1), pág. 21–29.

Hoffmann, Sarolta; Di Gaspero, Gabriele; Kovacs, Laszlo; Howard, Susanne; Kiss, Erzsebet; Galbacs, Zsuzsanna et al. (2008): Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine 'Kishmish vatkana' is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. En: *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 116 (3), pág. 427–438. DOI: 10.1007/s00122-007-0680-4.

Jayaprakasha, G. K.; Selvi, Tamil; Sakariah, K. K. (2003): Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. En: *Food Research International* 36 (2), pág. 117–122. DOI: 10.1016/S0963-9969(02)00116-3.

Jayaprakasha, G. K.; Singh, R. P.; Sakariah, K. K. (2001): Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. En: *Food Chemistry* 73 (3), pág. 285–290. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00298-3.

Jhansi Rani, S.; Usha, R. (2013): Transgenic plants. Types, benefits, public concerns and future. En: *Journal of Pharmacy Research* 6 (8), pág. 879–883. DOI: 10.1016/j.jopr.2013.08.008.

Jones, Laura; Riaz, Summaira; Morales-Cruz, Abraham; Amrine, Katherine C. H.; McGuire, Brianna; Gubler, W. Douglas et al. (2014): Adaptive genomic structural variation in the grape powdery mildew pathogen, *Erysiphe necator*. En: *BMC genomics* 15, pág. 1081. DOI: 10.1186/1471-2164-15-1081.

Katula-Debreceni, D.; Lencsés, A. K.; Szőke, A.; Veres, A.; Hoffmann, S.; Kozma, P. et al. (2010): Marker-assisted selection for two dominant powdery mildew resistance genes introgressed into a hybrid grape population. En: *Scientia Horticulturae* 126 (4), pág. 448–453. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.08.012.

Kwaaitaal, Mark; Keinath, Nana F.; Pajonk, Simone; Biskup, Christoph; Panstruga, Ralph (2010): Combined Bimolecular Fluorescence Complementation and Förster Resonance Energy Transfer Reveals Ternary SNARE Complex Formation in Living Plant Cells. En: *Plant Physiol.* 152 (3), pág. 1135–1147. DOI: 10.1104/pp.109.151142.

Lo Presti, Libera; Lanver, Daniel; Schweizer, Gabriel; Tanaka, Shigeyuki; Liang, Liang; Tollot, Marie et al. (2015): Fungal effectors and plant susceptibility. En: *Annual review of plant biology* 66, pág. 513–545. DOI: 10.1146/annurev-arplant-043014-114623.

McDonald, Bruce A.; Linde, Celeste (2002). En: *Euphytica* 124 (2), pág. 163–180. DOI: 10.1023/A:1015678432355.

Miklis, Marco; Consonni, Chiara; Bhat, Riyaz A.; Lipka, Volker; Schulze-Lefert, Paul; Panstruga, Ralph (2007): Barley *MLO* Modulates Actin-Dependent and Actin-Independent Antifungal Defense Pathways at the Cell Periphery. En: *Plant Physiol.* 144 (2), pág. 1132–1143. DOI: 10.1104/pp.107.098897.

Münch, Steffen; Lingner, Ulrike; Floss, Daniela S.; Ludwig, Nancy; Sauer, Norbert; Deising, Holger B. (2008): The hemibiotrophic lifestyle of Colletotrichum species. En: Journal of plant physiology 165 (1), pág. 41–51. DOI: 10.1016/j.jplph.2007.06.008.

Muñoz Ivan Honorato, Marisol González Yañez, Gabriel Sellés van Schouwen. (2007). Seminario Internacional, Manejo de riego y suelo en vides para vino y mesa. Centro Regional de Investigación La Platina, Santiago Chile: Instituto de investigaciones agropecuarias.

Oficina de estudios y Políticas agrarias (ODEPA). (2013). Uva de Mesa: Se ratifica liderazgo exportador mundial de Chile. Julio 2013, de ODEPA Sitio web: <http://www.odepa.cl/odepaweb/publicaciones/doc/11258.pdf>

Pauquet, J.; Bouquet, A.; This, P.; ADAM-BLONDON, A.-F. (2001): Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run 1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. En: TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik 103 (8), pág. 1201–1210. DOI: 10.1007/s001220100664.

Penninckx, I. A.; Thomma, B. P.; Buchala, A.; Metraux, J. P.; Broekaert, W. F. (1998): Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. En: The Plant cell 10 (12), pág. 2103–2113.

Pessina, Stefano; Lenzi, Luisa; Perazzolli, Michele; Campa, Manuela; Dalla Costa, Lorenza; Urso, Simona et al. (2016): Knockdown of *MLO* genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevine. En: Horticulture research 3, pág. 16016. DOI: 10.1038/hortres.2016.16.

Pieterse, Corne M. J.; Leon-Reyes, Antonio; van der Ent, Sjoerd; van Wees, Saskia C. M. (2009): Networking by small-molecule hormones in plant immunity. En: Nature chemical biology 5 (5), pág. 308–316. DOI: 10.1038/nchembio.164.

Qiu, Wenping; Feechan, Angela; Dry, Ian (2015): Current understanding of grapevine defense mechanisms against the biotrophic fungus (*Erysiphe necator*), the causal agent of powdery mildew disease. En: Horticulture research 2, pág. 15020. DOI: 10.1038/hortres.2015.20.

Robert-Seilaniantz, Alexandre; Navarro, Lionel; Bari, Rajendra; Jones, Jonathan D. G. (2007): Pathological hormone imbalances. En: Current opinion in plant biology 10 (4), pág. 372–379. DOI: 10.1016/j.pbi.2007.06.003.

Schmidt, Klaus; Pflugmacher, Maike; Klages, Simone; Mäser, Anja; Mock, Anadrea; Stahl, Dietmar J.. (2008): Accumulation of the hormone abscisic acid (ABA) at the infection site of the fungus *Cercospora beticola* supports the role of ABA as a repressor of plant defence in sugar beet. En: Molecular plant pathology 9 (5), pág. 661–673. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2008.00491.x.

Schlechter Rudolf Otto. (2014). Caracterización de la respuesta de defensa conferida por los loci *RUN1* y *REN1* en *Vitis vinifera* ante la infección de *Erysiphe necator*.

Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología Vegetal Departamento de Genética Molecular y Microbiología, Memoria de Investigación entregada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Bioquímico.

Spoel, Steven H.; Koornneef, Annemart; Claessens, Susanne M. C.; Korzelius, Jerome P.; van Pelt, Johan A.; Mueller, Martin J. et al. (2003): NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. En: *The Plant cell* 15 (3), pág. 760–770.

Tabien, R. E.; Li, Z.; Paterson, A. H.; Marchetti, M. A.; Stansel, J. W.; Pinson, S. R. M.; Park, W. D. (2000): Mapping of four major rice blast resistance genes from 'Lemont' and 'Teqing' and evaluation of their combinatorial effect for field resistance. En: *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 101 (8), pág. 1215–1225. DOI: 10.1007/s001220051600.

Tan, M. Y. Adillah; Hutten, Ronald C. B.; Visser, Richard G. F.; van Eck, Herman J. (2010): The effect of pyramiding *Phytophthora infestans* resistance genes R Pi-mcd1 and R Pi-ber in potato. En: *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik* 121 (1), pág. 117–125. DOI: 10.1007/s00122-010-1295-8.

Thomma, B. P.; Penninckx, I. A.; Broekaert, W. F.; Cammue, B. P. (2001): The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. En: *Current opinion in immunology* 13 (1), pág. 63–68.

van der Hoorn, Renier A.L.; Kamoun, Sophien (2008): From Guard to Decoy. A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. En: *The Plant cell* 20 (8), pág. 2009–2017. DOI: 10.1105/tpc.108.060194.

van Loon, L. C.; Rep, M.; Pieterse, C. M. J. (2006): Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. En: *Annual review of phytopathology* 44, pág. 135–162. DOI: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425.

Weng, Kai; Li, Zhi-Qian; Liu, Rui-Qi; Wang, Lan; Wang, Yue-Jin; Xu, Yan (2014): Transcriptome of *Erysiphe necator*-infected *Vitis pseudoreticulata* leaves provides insight into grapevine resistance to powdery mildew. En: *Hortic. Res.* 1, pág. 14049. DOI: 10.1038/hortres.2014.49.

Williamson, Brian; Tudzynski, Bettina; Tudzynski, Paul; van Kan, Jan A. L. (2007): *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. En: *Molecular plant pathology* 8 (5), pág. 561–580. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x.

Wu, Liang; Chen, Huan; Curtis, Chad; Fu, Zheng Qing (2014): Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. Corrected. En: *Virulence* 5 (7), pág. 710–721. DOI: 10.4161/viru.29755.

Yilmaz, Yusuf; Toledo, Romeo T. (2004): Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. En: *Journal of agricultural and food chemistry* 52 (2), pág. 255–260. DOI: 10.1021/jf030117h.

Yu, Ying; Jiao, Li; Fu, Shufang; Yin, Ling; Zhang, Yali; Lu, Jiang (2016): Callose Synthase Family Genes Involved in the Grapevine Defense Response to Downy Mildew Disease. En: *Phytopathology* 106 (1), pág. 56–64. DOI: 10.1094/PHYTO-07-15-0166-R.