



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CANDIDATOS A
GENES DE RESISTENCIA TIPO NBS-LRR EN
COCOTERO**

Tesis que presenta

MANUEL GÓNGORA PAREDES

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Enero 2014



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CANDIDATOS A GENES DE RESISTENCIA TIPO NBS-LRR EN COCOTERO fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, dentro de la opción Biotecnología de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Mérida, Yucatán, México, Enero 2014

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Manuel Góngora Paredes.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), en especial a la Unidad de Biotecnología y al laboratorio de cocotero por las instalaciones, materiales y equipo proporcionado para el desarrollo del presente trabajo de tesis. También al posgrado en Ciencias Biológicas, por permitirme ser parte de su programa de estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca Número 265354 otorgada mensualmente durante los dos años de la maestría.

Al proyecto de ciencia básica del CONACyT CB 129717 por el financiamiento de este trabajo de investigación.

A mi asesor, el **Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell** por su confianza al darme la oportunidad de participar en su equipo de trabajo con este proyecto de investigación y por todo su apoyo, sus consejos y el tiempo dedicado durante estos dos años.

Al Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín por todas las facilidades y el apoyo otorgado para la realización del presente trabajo de investigación, así como por permitirme ser parte del grupo de cocotero.

A los integrantes de mi comité tutorial conformado por el **Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell**, el **Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín** y el **Dr. Antonio Andrade Torres** por todas las observaciones y sus valiosos comentarios que fomentaron el correcto desarrollo del trabajo y de mi formación como maestro en ciencias. Muchas gracias.

A la **Dra. Renata Rivera Madrid** y el **Dr. Iván Alfredo Estrada Mota** por formar parte de mi comité revisor de tesis, por su valioso tiempo dedicado y por todas sus acertadas observaciones y sugerencias que aportaron para mejorar este trabajo.

Al **M. en C. Iván Isidro Córdova Lara** por toda la asesoría y apoyo que me brindó en el trabajo de laboratorio, de entre muchas cosas, en la técnica de PCR y PCR en tiempo real, también por tus comentarios y sugerencias para mejorar el trabajo.

Al **M. en C. Carlos Alberto Puch Hau** y el **Dr. Celso Reyes Martínez** por su valiosa amistad y por todo el apoyo brindado en el trabajo de laboratorio que contribuyó a la realización de este proyecto.

A la **M. en C. María Narváez Cab** por el apoyo técnico y logístico para la preparación y envío de muestras para la secuenciación; a la **IBQ. Ana María Collí Rodríguez** por su apoyo en la clonación de secuencias en el vector pGEM-T y en la preparación de células competentes y al **M. en C. José German Nic Matos** por su apoyo en el laboratorio. A los tres gracias por su amistad.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a todos mis compañeros de generación y a mis compañeros del laboratorio de cocotero. Muchas gracias por su amistad, por todos los momentos y tareas que realizamos juntos, por la confianza que en mí depositaron y por hacer de esta etapa un trayecto de vivencias que nunca olvidaré.

DEDICATORIAS

Esta tesis la dedico con todo mi amor y cariño.

A ti **Dios** que me diste la oportunidad de vivir y regalarme salud, una familia maravillosa y la capacidad de llegar hasta donde estoy ahora, dándome fuerzas para salir adelante y enseñándome a enfrentar los problemas.

A mis padres **Manuel y Celia** que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias papá y mamá por cuidarme, por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, por sus consejos, su comprensión, su ayuda en los momentos difíciles y por su ayuda con los recursos necesarios para estudiar. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos, pero sobre todo, siempre han estado cuando más los necesito apoyándome y brindándome su amor. ¡Los quiero con todo mi corazón!

A mis hermanitas **Fátima y Yuliana** por apoyarme, por su paciencia, por preocuparse por su hermano mayor y por estar siempre presentes cuando se les necesita, me siento muy orgulloso de tenerlas como hermanas y de que formen parte de lo más hermoso que tengo: Mi familia. Gracias por todo su amor y amistad. ¡Las quiero mucho!

A mi novia **Damaris** por todos estos años de conocernos en los cuales hemos compartido tantas cosas, siempre juntos en las buenas y en las malas, muchas gracias bonita por todo tu apoyo, paciencia y ánimos que me brindas día con día para alcanzar nuevas metas, tanto profesionales como personales. Gracias por permitirme formar parte de tu vida y por ser la mujer con los mejores sentimientos que he conocido, gracias por ayudarme y motivarme para terminar este trabajo, por comprenderme y aguantarme, pero sobre todo gracias por tu cariño y por enseñarme a hacer las cosas siempre de la mejor manera. ¡Eres muy importante para mí y te quiero mucho!

“Siempre recordarás algo de lo que leas, bastante de lo que oigas, mucho de lo que veas, y todo lo que hagas”.

Harrison.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPITULO I	9
1.1 ANTECEDENTES GENERALES	9
1.1.1 Descripción del cocotero.....	9
1.1.2 Importancia económica.....	10
1.1.3 Problemática del cocotero.....	11
1.1.4 Ecotipos de cocotero en México.....	12
1.1.5 Amarillamiento Letal (AL).....	13
1.1.6 Mecanismos de defensa en plantas.....	14
1.1.7 Sistema inmune innato.....	15
1.1.8 Respuestas de defensa inducidas en las plantas.....	17
1.1.9 Respuesta hipersensible (HR).....	18
1.1.10 Respuesta sistémica adquirida (SAR).....	19
1.1.11 Ácido Salicílico (AS).....	20
1.1.12 Metabolismo del ácido salicílico.....	20
1.1.13 Compuesto análogos del ácido salicílico.....	22
1.1.14 Genes de resistencia (<i>R</i>).....	23
1.1.15 Proteínas de resistencia (<i>R</i>).....	24
1.1.16 Secuencias candidatas a genes de resistencia (RGCs).....	25
1.1.17 Efecto del AS en la expresión de genes relacionados con SAR y RGCs..	26
1.1.18 Estudios sobre los mecanismos de defensa planta-fitoplasma.....	29
1.1.19 Estudios sobre los mecanismos de defensa en cocotero.....	30
1.1.20 Estudios sobre RGCs en cocotero.....	33
1.2 HIPÓTESIS	37
1.3 OBJETIVOS	37
1.3.1 Objetivo general.....	37
1.3.2 Objetivos específicos.....	37

1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	38
1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
CAPITULO II	
DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO POR PCR EN TIEMPO REAL DE TRES CANDIDATOS A GENES DE RESISTENCIA AISLADOS DE COCOTERO.....	53
2.1 INTRODUCCIÓN.....	53
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
2.2.1 Selección de las secuencias de RGCs aisladas de cocotero.....	55
2.2.2 Alineamiento y diseño de iniciadores.....	55
2.2.3 Optimización de la técnica de PCR en tiempo real.....	56
2.2.4 Amplificación por PCR en tiempo real.....	56
2.2.5 Determinación de la eficiencia y linealidad de la PCR en tiempo real.....	57
2.3 RESULTADOS.....	57
2.3.1 Selección, alineamiento y diseño de iniciadores de los RGCs.....	57
2.3.2 Optimización de las condiciones de amplificación por PCR en tiempo real.....	60
2.3.3 Ensayos de eficiencia y linealidad.....	64
2.4 DISCUSIÓN.....	67
2.5 CONCLUSIONES.....	70
2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
CAPÍTULO III	
ANÁLISIS DEL EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE RESISTENCIA.....	75
3.1 INTRODUCCIÓN.....	75
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
3.2.1 Material vegetal y tratamiento con ácido salicílico.....	77
3.2.2 Extracción de ARN total de hoja, tallo y raíz de cocotero.....	78

3.2.3 Tratamiento con la enzima DNasa I.....	79
3.2.4 Síntesis del ADNc (RT-PCR).....	80
3.2.5 Amplificación por PCR en tiempo real.....	80
3.2.6 Análisis de expresión de los RGCs por PCR en tiempo real.....	81
3.2.7 Clonación y secuenciación de los productos amplificados.....	82
3.2.8 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.....	83
3.3 RESULTADOS.....	83
3.3.1 Extracción del ARN de las plántulas de cocotero.....	83
3.3.2 Síntesis y amplificación del ADNc.....	84
3.3.3 Análisis de expresión de los genes candidatos por PCR en tiempo real.....	85
3.3.3.1 Análisis del gen candidato <i>CnRGC4</i>	86
3.3.3.2 Análisis del gen candidato <i>CnRGC5</i>	88
3.3.3.3 Análisis del gen candidato <i>CnRGC10</i>	90
3.3.3.4 Patrones de expresión de los RGCs en los tejidos analizados.....	92
3.3.4 Clonación y análisis de las secuencias obtenidas.....	93
3.4 DISCUSIÓN.....	94
3.5 CONCLUSIONES.....	96
3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
 CAPITULO IV	
DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	101
4.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	101
4.2 CONCLUSIONES GENERALES.....	104
4.3 PERSPECTIVAS.....	105
4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

LISTADO DE ABREVIATURAS

AA	Alto del Atlántico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AL	Amarillamiento Letal
AP	Alto del Pacífico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AS	Ácido salicílico
ATP	Adenosín trifosfato
<i>Avr</i>	Genes de avirulencia
CC	Dominio de hélice súper enrollada
Ct o CT	Ciclo umbral
EMA	Enano Malayo Amarillo
ERFs	Factores de respuesta a etileno
ETI	Inmunidad disparada por efectores
ETS	Susceptibilidad disparada efectores
HR	Respuesta Hipersensible
LRR	Repetidos ricos en leucina
Myb	Oncogén mieloblastosis
NBS	Sitio de unión a nucleótidos
NCBI	Centro nacional para la información biotecnológica
NLS	Sitio de localización nuclear
NPR1	No expresivo de genes <i>PR-1</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos o microbios
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>PR</i>	Genes relacionados a patogénesis
PR	Proteínas relacionadas a patogénesis
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PTI	Inmunidad disparada por patógenos
QTLs	Locus de un carácter cuantitativo
<i>R</i>	Genes de resistencia
R	Proteínas de resistencia
RGCs	Candidatos a genes de resistencia
RLKs	Receptores tipo cinasas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SAR	Resistencia sistémica adquirida
TIR	Homólogo de TOLL/receptor de interleucina-1
UER	Unidades de expresión relativa

ÍNDICE DE FIGURAS
CAPITULO I

Figura 1.1	Morfología de la palma de cocotero.....	9
Figura 1.2	Subproductos derivados de la palma de cocotero.....	11
Figura 1.3	Mortalidad total acumulada por ecotipo de cocotero debido a la enfermedad del Amarillamiento Letal.....	12
Figura 1.4	Agentes involucrados en la enfermedad del Amarillamiento Letal.....	13
Figura 1.5	Cronología de síntomas del AL en la palma de coco.....	14
Figura 1.6	Representación esquemática simplificada del sistema inmune de la planta.....	16
Figura 1.7	Modelo de “zigzag” del sistema inmune de la planta.....	17
Figura 1.8	Respuesta hipersensible (HR).....	18
Figura 1.9	Sistema inmune innato de las plantas.....	19
Figura 1.10	Esquema simplificado de las vías para la síntesis y metabolismo del ácido salicílico.....	21
Figura 1.11	Representación de las principales clases de proteínas R de las plantas.....	24
Figura 1.12	Árbol filogenético realizado empleado 20 secuencias de NPR1 de diferentes especies de plantas.....	32
Figura 1.13	Análisis filogenético de las secuencias RGCs aisladas en cocotero.....	34
Figura 1.14	Árbol filogenético de los RGCs aislados en cocotero.....	35

CAPITULO II

Figura 2.1	Imagen representativa del alineamiento de las secuencias de nucleótidos para el diseño de los iniciadores.....	59
Figura 2.2	Protocolo establecido para la amplificación por PCR en tiempo real.....	61

Figura 2.3	Resultado del gradiente realizado para determinar la temperatura optima de alineamiento de los iniciadores.....	62
Figura 2.4	Resultados de la amplificación de ADN genómico con los dos juegos de iniciadores CnRGC4.....	63
Figura 2.5	Resultados de la amplificación de ADN genómico con los dos juegos de iniciadores CnRGC5.....	63
Figura 2.6	Resultados de la amplificación de ADN genómico con los dos juegos de iniciadores CnRGC10.....	64
Figura 2.7	Evaluación de la eficiencia y linealidad de los iniciadores CnRGC4.....	66
Figura 2.8	Evaluación de la eficiencia y linealidad de los iniciadores CnRGC5.....	66
Figura 2.9	Evaluación de la eficiencia y linealidad de los iniciadores CnRGC10.....	67

CAPITULO III

Figura 3.1	Representación esquemática del proceso de tratamiento de las plantas con AS y la cosecha de tejidos.....	78
Figura 3.2	Productos de la extracción de ARN de hoja, tallo y raíz de las plantas tratadas con AS y los controles sin tratamiento.....	84
Figura 3.3	Imagen representativa de las gráficas de la amplificación por PCR tiempo real de las muestras de ADNc con el iniciador 18S.....	85
Figura 3.4	Análisis del efecto del AS en la expresión del Candidato a Gen de Resistencia <i>CnRGC4</i> en cocotero.....	87
Figura 3.5	Análisis del efecto del AS en la expresión del Candidato a Gen de Resistencia <i>CnRGC5</i> en cocotero.....	89
Figura 3.6	Análisis del efecto del AS en la expresión del Candidato a Gen de Resistencia <i>CnRGC10</i> en cocotero.....	91
Figura 3.7	Análisis comparativo del efecto del AS en la expresión de los tres RGCs de cocotero.....	92

ÍNDICE DE CUADROS**CAPITULO I**

Cuadro 1.1 Genes de resistencia en plantas.....	23
Cuadro 1.2 Familias reconocidas como proteínas relacionadas con la patogénesis.....	26
Cuadro 1.3 Estudios relacionados con ácido salicílico y resistencia sistémica adquirida (SAR).....	27

CAPITULO II

Cuadro 2.1 Secuencias de nucleótidos de los RGC seleccionados.....	58
Cuadro 2.2 Secuencias RGCs seleccionadas y su homología con genes de resistencia.....	58
Cuadro 2.3 Iniciadores específicos diseñados a partir de secuencias RGC de cocotero.....	60

CAPITULO III

Cuadro 3.1 Condiciones empleadas para el ensayo del tratamiento con AS.....	78
Cuadro 3.2 Juegos de iniciadores seleccionados para la amplificación y análisis de expresión.....	81
Cuadro 3.3 Resultados de la identidad encontrada entre las secuencias RGC de cocotero y las secuencias del Gen Bank usando el programa BlastX.....	93

RESUMEN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) está expuesto al ataque de patógenos que producen diversas enfermedades pero sus mecanismos de defensa son poco conocidos. Las proteínas de resistencia codificadas por genes de resistencia, detectan el ataque de patógenos y activan la respuesta de defensa en la planta. La mayoría de estos genes codifican proteínas del tipo NBS-LRR que poseen dominios conservados que han servido de referencia para obtener en cocotero candidatos a genes de resistencia (RGCs). De igual forma, se ha demostrado que el ácido salicílico desempeña un papel fundamental como molécula de señalización inductora de resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) y expresión de genes de resistencia a enfermedades en plantas. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue analizar por PCR en tiempo real la expresión de tres RGCs de tipo NBS-LRR (*CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10*) en los tejidos de hoja, tallo y raíz en plántulas de cocotero tratadas con ácido salicílico a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72, 96 y 120 h). Los resultados mostraron que estos RGCs se encuentran expresados en bajos niveles de manera constitutiva en los tejidos analizados de las plántulas sin tratamiento y que posterior al tratamiento, el ácido salicílico indujo la expresión incrementando los niveles de transcritos de los RGCs *CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10* en los tejidos analizados, lo que podría sugerir que el cocotero puede ser capaz de activar la SAR, en donde los genes de resistencia pudieran estar jugando un papel fundamental en la percepción de los patógenos en este cultivo vía ácido salicílico. Este es el primer estudio sobre caracterización de la expresión de candidatos a genes de resistencia en la palma de cocotero.

ABSTRACT

The coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is exposed to attack by pathogens that cause various diseases, but its defense mechanisms are poorly understood. Resistance proteins encoded by resistance genes detect the pathogen attack, and activate the defense response in plants. Most of these genes coded to NBS-LRR type and have conserved domains that were used as reference to obtain resistance genes candidates (RGCs) in coconut. On the other hand, it has been demonstrated that salicylic acid (SA) plays an essential role as a signaling molecule inducing systemic acquired resistance (SAR) and expression of disease resistance genes in plants. Therefore, the objective of this study was to analyze through real-time PCR the expression of three RGCs NBS-LRR type (*CnRGC4*, *CnRGC5* and *CnRGC10*) in leaf, stem and root tissues in coconut seedlings treated with salicylic acid at different times (0, 24, 48, 72, 96 and 120 h). The results showed that these RGCs are expressed at low levels in a constitutive manner in the analyzed tissues without treatment and that SA treatment induced the expression of RGCs *CnRGC4*, *CnRGC5* and *CnRGC10* by increasing the levels of their transcripts in the analyzed tissues, which might suggest that coconut may be able to activate SAR, where the resistance genes may be playing a role in the perception of the pathogen in the crop via salicylic acid. This is the first study to characterize the expression of candidate resistance genes in coconut palm.

INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es una palma que predomina en las áreas costeras de México y el mundo; es un cultivo de gran importancia económica y su explotación es integral ya que se aprovechan cada una de sus partes (Oropeza y Zizumbo, 1997). Uno de los subproductos más importantes es el aceite, el cual tiene diversas aplicaciones principalmente en la producción de biodiesel, siendo éste una opción viable para la sustitución de combustible fósil (Lao, 2008). Sin embargo, la palma de coco está expuesta al ataque de diversos agentes que producen diversas enfermedades, incluyendo virus (Rohde *et al.*, 1990), viroides (Hanold y Randles, 1991), protozoos (Parthasarathy *et al.*, 1978), hongos (Joseph *et al.*, 1975), nemátodos (Griffith, 1987) y mollicutas como el fitoplasma causante del Amarillamiento Letal (AL) (Howard y Barrant, 1989; Beakbane *et al.*, 1972; McCoy, 1972). Ante esto surge la necesidad de desarrollar nuevas estrategias para la protección de este cultivo que es de gran interés comercial. Una de estas estrategias contempla la manipulación por ingeniería genética de genes responsables de la resistencia en plantas (García y Lozoya, 2004), lo que nos conduce a explorar los mecanismos moleculares de la resistencia en plantas (Van't Slot y Knogge, 2002). Con el conocimiento de los mecanismos de defensa se podría abordar de otra manera el mejoramiento genético en cocotero (expresión de genes relacionados, utilización de inductores de respuestas de defensa, entre otros). Sin embargo, a pesar de la importancia del cultivo y la diversidad de patógenos que afectan su producción, los mecanismos de defensa del cocotero han sido poco estudiados, en comparación con otras plantas. Los mecanismos de defensa que utilizan las plantas pueden ser de dos tipos: mecanismos de defensa preexistentes o constitutivos (características estructurales de la pared celular y presencia de compuestos químicos) y los mecanismos de defensa inducibles (síntesis de compuestos químicos antimicrobianos) (Staskawicz *et al.*, 1995).

Con los avances de la biología molecular es posible determinar la resistencia genética de una planta a las diversas plagas y enfermedades; a la fecha se han identificado los principales genes involucrados como respuesta de defensa en la interacción planta-patógeno. Estos genes de defensa pueden ser de dos tipos, los denominados genes *PR* que codifican para proteínas relacionadas con patogénesis y los genes *R*, genes de resistencia que dirigen la expresión de proteínas *R* que detectan patógenos y

desencadenan respuesta de defensa. Tanto los genes *PR* como los genes *R* son utilizados en programas de mejoramiento convencional para generar resistencia o tolerancia (Pink, 2002; Innes, 1998). En el caso de las proteínas R, éstas se dividen en cinco clases distintas que van de acuerdo al dominio común que comparten, siendo la clase más abundante la que codifica para proteínas con un dominio de unión a nucleótidos (NBS) y un dominio repetido rico en leucinas (LRR) (Martin *et al.*, 2003). Las proteínas de resistencia del tipo NBS-LRR son las que en su mayoría han sido secuenciadas y es una de las clases más grandes dentro de los genomas de las plantas. Esta clase de proteínas, pueden dividirse en dos subfamilias de acuerdo a la característica estructural del extremo N-terminal en: TIR-NBS-LRR y las CC-NBS-LRR (no TIR) (Young, 2000; Meyers *et al.*, 1999). En base a estos dominios conservados de secuencias NBS-LRR como son los motivos: P-loop o cinasa 1 (motivo de unión a fosfato), el motivo cinasa 2, el motivo GLPL y RNBS-D (Meyers *et al.*, 1999; Traut, 1994; Saraste *et al.*, 1990), se han obtenido por medio del método de PCR candidatos a genes de resistencia (RGCs) en varias especies vegetales de interés comercial (Thirumalaiandi *et al.*, 2008). Los RGCs proveen información valiosa de secuencias para aplicar el enfoque de genes candidatos y clonar genes *R* completos (Pflieger *et al.*, 2001). Esta estrategia ha revelado ser muy útil como primer paso hacia la identificación de genes de resistencia. Muchos de estos RGCs se encuentran agrupados en el genoma de la misma manera que los genes de resistencia y colocalizan con loci de resistencia o con QTLs asociados a la resistencia a diferentes patógenos (López *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta la importancia de los RGCs, en el laboratorio de biotecnología de cocotero del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), se aislaron e identificaron 162 secuencias candidatas a genes de resistencia de tipo NBS-LRR en palmas de cocotero de los ecotipos alto del Pacífico y enano malayo amarillo (ambos resistentes al AL) y alto del Atlántico (susceptible al AL), de las cuales 139 presentaron marco de lectura abierto. Estas secuencias aún no se han caracterizado (Puch-Hau, datos no publicados).

Por otro lado, se ha reportado que el ácido salicílico (AS) es una molécula de señalización involucrada en la resistencia a enfermedades de plantas ante el ataque de patógenos; además, el AS induce la resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) en plantas (Alvarez, 2000; Enyedi *et al.*, 1992) y la expresión de genes relacionados con la patogénesis y resistencia a todos los fitopatógenos, incluyendo bacterias, hongos y virus. (Conrath *et al.*, 1995). En el caso de infección por fitoplasmas, se ha encontrado que plantas tratadas con AS muestran cierto grado de resistencia y retrasan la aparición de síntomas (Wu *et al.*, 2012; Sánchez-Rojo *et al.*, 2011; D'Amelio, 2010). Por otro lado se ha reportado extensamente que el AS induce la expresión de proteínas relacionadas con patogénesis como glucanasas y quitinasas (Witmer *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 1998; Busam *et al.*, 1997), sin embargo hay pocos estudios sobre la inducción de genes *R* o RGCs por AS (Wan *et al.*, 2012; You-Xiong *et al.*, 2009).

Con base en lo descrito anteriormente y con el fin de conocer y entender más acerca de los genes de resistencia en cocotero, en el presente estudio se evaluó si el ácido salicílico (AS) puede inducir la expresión diferencial de candidatos a genes de resistencia de tipo NBS-LRR en cocotero partiendo de tres secuencias RGC (*CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10*) aisladas en estudios anteriores.

CAPITULO I

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Descripción del cocotero

El cocotero es una monocotiledónea perenne leñosa de hasta 30 m de altura pero no es considerado un árbol, ya que carece de corteza; posee un tronco único sin ramificaciones y sin cambium secundario que pueda generar crecimiento secundario (Ohler, 1999). Se clasifica en la familia *Arecaceae*, subfamilia *Arecoideae*, tribu *Cocoideae*, subtribu *Butinae*, género *Cocos*, especie *Cocos nucifera* (Uhl y Drasfield, 1987). Puede ser encontrado a lo largo de la costa de casi todos los países ubicados entre los trópicos de Cáncer y Capricornio (Ohler, 1999). En el ápice presenta un grupo de hojas que protege el único punto de crecimiento o yema terminal, que posee la planta. El crecimiento en altura depende de las condiciones ecológicas, de la edad de la planta y del tipo de cocotero (Fremond *et al.*, 1969). Las hojas son compuestas, pinnadas, de 1.5 a 4 m de longitud (Domínguez *et al.*, 1999) y de 10 a 15 Kg de peso cada una (Fremond *et al.*, 1969). En la figura 1.1 se puede observar la morfología del cocotero.



Figura 1.1 Morfología de la palma de cocotero. A) palma de cocotero, B) inflorescencia y C) fruto (Chan y Elevitch, 2006).

1.1.2 Importancia económica

De la palma de cocotero se puede aprovechar cada una de sus partes para la obtención de diferentes productos. Ha sido de gran utilidad al humano desde hace miles de años, como fuente de diversos satisfactores tales como alimento, bebida, techo, fibra, adorno, azúcar, madera, alcohol, combustible y aceite. Debido a esto se le han aplicado diversos sobrenombres como el “árbol de la vida”, entre otros (Ohler, 1984).

En América y en el Caribe la producción del cocotero contribuye con cerca del 10% a la producción mundial, siendo México y Brasil los países productores más importantes de América. En México, las regiones productoras de cocotero se dividen en dos grandes regiones costeras; la del Golfo y Caribe: en Tabasco, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo y la del Pacífico: en Guerrero, Colima, Oaxaca, Michoacán, Sinaloa, Jalisco y Chiapas. El cocotero es uno de los cultivos de mayor importancia económica, cubre una superficie de 100 mil ha de las cuales dependen aproximadamente 50 mil familias que viven directamente del cultivo (CONACOCO, 2008).

El principal producto exportado es la copra sin procesar, seguido del coco desecado. La diversidad y potencialidad del coco contribuyen de manera considerable al sector económico de los países productores. Uno de los mercados más florecientes es la industrialización del agua de coco, pues se trata de una bebida isotónica con mucha aceptación en Asia, Europa y América, de tal forma que el mercado internacional consume cantidades mayores cada año. (Domínguez *et al.*, 1999). Además, se prevé que el agua de coco podría competir en el mercado de 10,000 millones de dólares de las bebidas deportivas, debido a su alto contenido en carbohidratos, calcio, fósforo, sodio, potasio y magnesio (FAO, 2007).

Los usos más recientes de importancia económica, incluyen productos a base de fibra para la industria automotriz, carbón activado, aceite virgen y aceite para la producción de biodiesel, siendo éste una opción viable para las substitución de combustible fósil (Lao, 2008). En las islas de Papua, Nueva Guinea (Bradley *et al.*, 2006) y en Filipinas está siendo producido comercialmente como aditivo de diesel o gasolina (Lao, 2008). En la figura 1.2 se muestran algunos subproductos obtenidos de la palma de coco.



Figura 1.2 Subproductos derivados de la palma de cocotero. A). Construcción de casas; B). Elaboración de artesanías; C). Aceite virgen; D). Productos envasados; E). Componentes para autos; F). Carbón activado; G). Aceite para elaboración de biodiesel (Lao, 2008; Domínguez *et al.*, 1999).

1.1.3 Problemática del cocotero

La problemática del cocotero en México se puede englobar en la baja productividad de las plantaciones ya existentes y la disminución de la superficie del cultivo. Las principales causas de estos problemas son: escasas prácticas del cultivo, plantaciones viejas, enfermedades y plagas (CONACOCO, 2008).

Entre las enfermedades tenemos las causadas por diversos agentes patógenos, como el virus causante de la decadencia foliar del cocotero (Rohde *et al.*, 1990), viroides causantes de la enfermedad de tinangaja (*Coconut tinangaja viroid*) en la isla de Guam y el causante de la enfermedad de cadang-cadang en Filipinas (Hanold y Randles, 1991), protozoos causantes de la marchitez letal de las palmas (Parthasarathy *et al.*, 1978), hongos (*Phytophthora palmivora*) el cual ocasiona la pudrición del cogollo (Joseph *et al.*, 1975), el nematodo (*Radinaphelenchus cocophilus*) causante de la enfermedad del Anillo Rojo (Griffith, 1987) y mollicutas como los fitoplasmas entre los que se encuentra el causante del Amarillamiento Letal (*Candidatus Phytoplasma palmae*, grupo A), siendo esta enfermedad la más destructiva (Howard y Barrant, 1989).

1.1.4 Ecotipos de cocotero en México

La palma de coco fue introducida a México durante el siglo XVI. Las poblaciones en la costa del Golfo de México tienen características similares al tipo silvestre (*Niu kafa*) y en la costa del Pacífico presentan características similares al tipo doméstico (*Niu vai*) (Zizumbo *et al.*, 2005; Zizumbo y Piñero, 1998; Zizumbo, 1996). En México se han identificado 5 ecotipos de cocotero: alto del Atlántico, alto del Pacífico 1, alto del Pacífico 2, alto del Pacífico 3 y enano malayo amarillo (AA, AP1, AP2, AP3 y EMA respectivamente) (Zizumbo *et al.*, 2008). Estos ecotipos presentan diferente porcentaje de mortalidad ante la enfermedad del Amarillamiento Letal (figura 1.3), siendo el enano malayo amarillo y el alto de Pacífico 2 los que exhiben una alta resistencia al AL y valiosas características morfológicas que los hace útiles como progenitores para programas de hibridación (Zizumbo y Colunga, 2001).

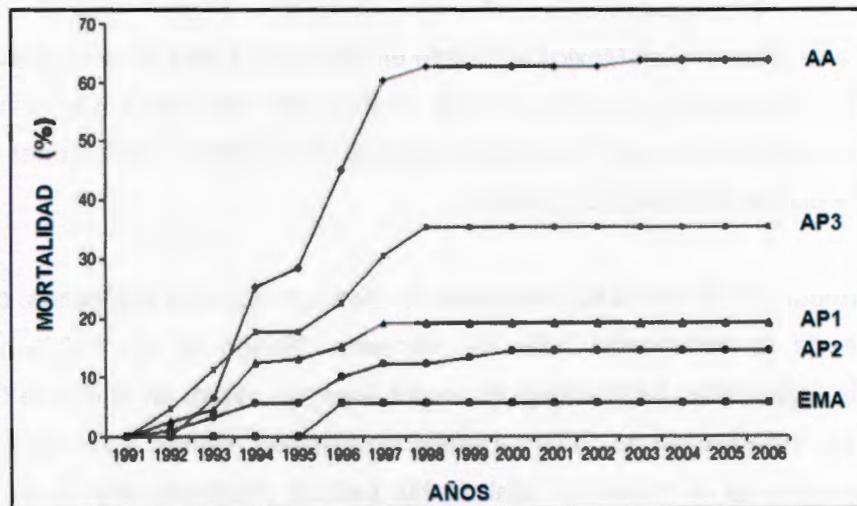


Figura 1.3 Mortalidad total acumulada por ecotipo de cocotero debido a la enfermedad del Amarillamiento Letal. Estudio realizado en San Crisanto, Yucatán, México (Zizumbo *et al.*, 2008).

1.1.5 Amarillamiento Letal (AL)

El AL es una enfermedad epidémica que ataca a unas 30 especies de palmas (Howard, 1990). La enfermedad es causada por un fitoplasma (*Candidatus Phytoplasma palmae*, grupo A) cuyo principal vector es el homóptero *Haplaxius* (antes *Myndus*) *crudus* Van Duzee (Howard *et al.*, 1984; Howard *et al.*, 1983). En la figura 1.4 se muestra al fitoplasma, al vector y una palma enferma del AL.

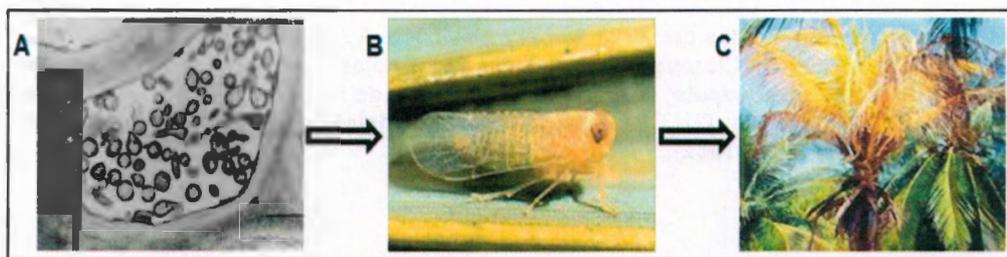


Figura 1.4 Agentes involucrados en la enfermedad del Amarillamiento Letal. A). Fitoplasma del AL (*Candidatus Phytoplasma palmae*); B). Vector del AL (*Haplaxius crudus* Van Duzee); C). Palma con síntomas del AL (Howard *et al.*, 1983; McCoy *et al.*, 1982).

En los últimos años la enfermedad del AL ha destruido millones de palmas en Jamaica, Florida, Belice y Honduras (Harrison y Oropeza, 2008; Harrison *et al.*, 1999). En cuanto a México, el AL ha eliminado virtualmente al cocotero alto del Atlántico en toda la costa de Quintana Roo, Yucatán y Campeche (Domínguez *et al.*, 1999) y se estima que ha devastado aproximadamente unas 13 mil hectáreas de plantaciones de coco (Doyle, 1998) quedando actualmente una superficie cultivada cercana a 100 mil hectáreas (CONACOCO, 2008).

Durante el desarrollo del AL, las palmas exhiben varios síntomas visuales (figura 1.5) tal como la caída prematura de los frutos (estadio 1), inflorescencia necrótica (estadios 2 y 3), clorosis y senescencia de hojas (estadios 4-6), (Matus *et al.*, 2003). Las hojas adquieren después color marrón, se desecan y mueren, permaneciendo colgandas por algunos días y finalmente caen, quedando únicamente el tronco desnudo (McCoy *et al.*, 1982).



Figura 1.5 Cronología de síntomas del AL en la palma de coco. A). Caída prematura de los frutos; B). Inflorescencia necrótica; C). Clorosis y senescencia de las hojas más viejas; D). Clorosis de las hojas jóvenes y necrosis de la espata; E). Amarillamiento total de la palma; F). Estado avanzado, pudrición de la corona de hojas; G). Caída de la corona de hojas quedando el tronco desnudo (poste telefónico) (McCoy *et al.*, 1982).

Aunque los síntomas de la enfermedad en la palma se pueden revertir temporalmente por medio de la aplicación de antibióticos de la familia de las tetraciclinas, el costo, los efectos ecológicos y de salud colaterales por el uso de antibióticos limitan su aplicación en plantaciones comerciales (Harrison, 2007; McCoy, 1974; McCoy, 1973). Hasta el momento la única forma más eficaz para enfrentar el AL es el uso de germoplasma resistente (Been, 1981).

1.1.6 Mecanismos de defensa en plantas

El ataque de patógenos es una condición desfavorable para las plantas, que generalmente activan una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección (García y Lozoya, 2004). Generalmente los mecanismos de defensa que utilizan las plantas se pueden dividir en dos tipos diferentes:

- A. Mecanismos de defensa preexistentes o constitutivos, formados por las características estructurales de la pared celular y la presencia de compuestos químicos depositados en el tejido epidérmico como las fitoanticipinas (Staskawicz *et al.*, 1995).

- B. Mecanismos de defensa inducibles, formados por la síntesis de *novο* de compuestos químicos antimicrobianos como las fitoalexinas, glucanasas y quitinasas, cuya síntesis se activa después de un intento de invasión al tejido vegetal por un patógeno (Staskawicz *et al.*, 1995). Este tipo de mecanismo es posible porque las plantas poseen un sistema inmune innato que eficientemente es capaz de reconocer a un patógeno, y por lo tanto de activar las respuestas de defensa apropiadas.

1.1.7 Sistema inmune innato

La literatura reciente aborda diversos conceptos de defensa en las plantas, tales como resistencia, susceptibilidad, enfermedad, etc. Este nuevo lenguaje se caracteriza por el uso de términos como inmunidad innata, patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), receptores de reconocimiento del patrón molecular, efectores, entre otros (Castro y García, 2009; Chisholm *et al.*, 2006). Las respuestas inmunes inducidas por los PAMPs son importantes para la inmunidad a la infección microbiana en todas las especies vegetales (Bittel y Robatzek, 2007). Este sistema está basado en la percepción sensitiva de patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) conocidos también como proteínas de resistencia (R), los cuales se encuentran en la superficie de las células de las plantas (Boller y He, 2009).

La percepción de un microorganismo en la superficie de la célula inicia la inmunidad activada por PAMPs (PTI, por sus siglas en inglés), que generalmente detiene la infección de los microorganismos antes de que surja una proliferación masiva de éste en la planta. Sin embargo, los microorganismos patogénicos han desarrollado la forma de eliminar la PTI al interferir con el reconocimiento de la membrana plasmática o mediante la secreción de proteínas efectoras en el citosol de la célula vegetal que, presumiblemente, alteran la señalización de resistencia o la manifestación de las respuestas de resistencia, lo que genera una susceptibilidad provocada por efectores (ETS, por sus siglas en inglés). Una vez que los agentes patógenos han adquirido la capacidad para suprimir las defensas primarias, las plantas desarrollan un mecanismo más especializado para detectar microorganismos, a través de receptores intracelulares (proteínas de resistencia)

adicionales, tales como las proteínas NB-LRR (con un dominio repetido rico en leucina y otro de unión a nucleótidos), las cuales, constituyen una segunda barrera de defensa llamada inmunidad disparada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés), comúnmente conocida como gen por gen (Pieterse *et al.*, 2009), la cual resulta en una respuesta de resistencia a la enfermedad conocida como respuesta hipersensible (HR) que genera una muerte celular programada (Jones y Dangl, 2006). Los patógenos que han perdido el efector, quizás ganen nuevos efectores a través de un flujo horizontal de genes que puedan ayudar a los patógenos a suprimir ETI nuevamente. Sin embargo, la selección natural a su vez, favorece a nuevos alelos de genes de resistencia NBS-LRR de la planta, para que puedan reconocer uno de los nuevos efectores adquiridos, resultando de nuevo, en una inmunidad disparada por los efectores o ETI (Jones y Dangl, 2006). Todo este proceso se presenta en la figura 1.6.

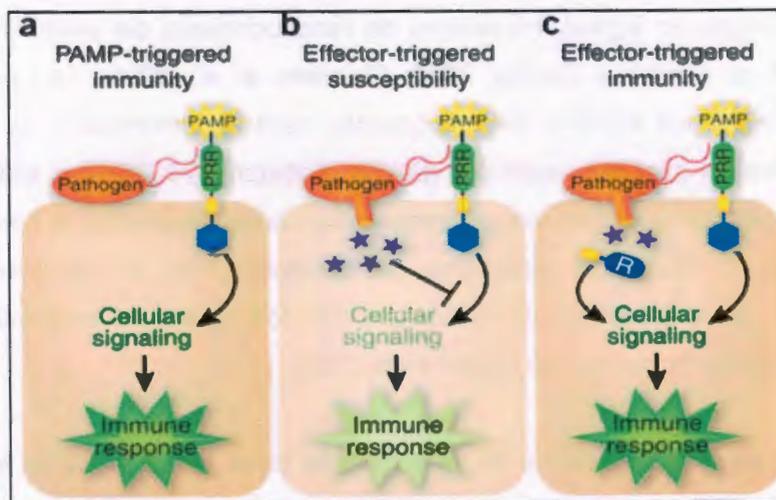


Figura 1.6 Representación esquemática simplificada del sistema inmune de la planta. A). Al ataque de patógenos, los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) activan los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) en el huésped, lo que resulta en una cascada de señalización que lleva a la inmunidad disparada por PAMPs (PTI). B). Los agentes patógenos virulentos han adquirido los efectores (estrellas color púrpura) que suprimen la PTI, lo que provoca la susceptibilidad por efectores (ETS). C). A su vez, las plantas han adquirido resistencia (R) a través de las proteínas que reconocen estos atacantes específicos de los efectores, lo que resulta en una respuesta inmune secundaria llamada inmunidad activada por efectores (ETI) (Pieterse *et al.*, 2009).

En base a todo lo que se ha descrito sobre el sistema inmune de la planta, este puede ser representado como modelo en zigzag que comprende cuatro fases principales en su desarrollo y se muestra en la figura 1.7.

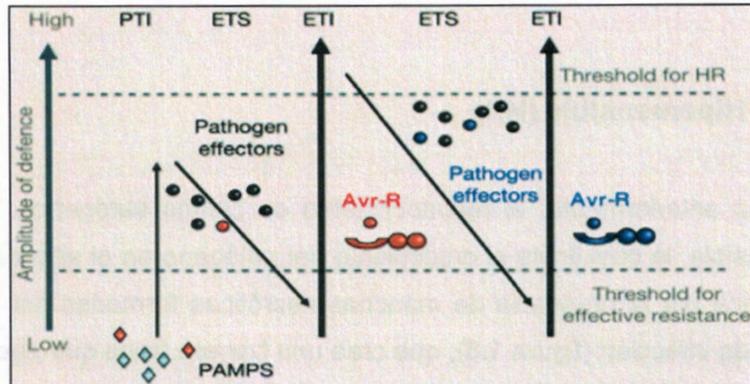


Figura 1.7 Modelo de "zigzag" del sistema inmune de la planta. Fase 1. PTI o inmunidad disparada por PAMPs. Fase 2. ETS o susceptibilidad disparada por efectores. Fase 3. ETI o inmunidad disparada por efectores. Fase 4. Patógenos que tal vez ganaron nuevos efectores a través del flujo horizontal de genes, pueden ayudar a reprimir de nuevo ETI. Pero la selección también favorece a las plantas que pueden reconocer los efectores recién adquiridos, produciendo de nuevo ETI. (Jones y Dangl, 2006).

La resistencia que es mediada por las proteínas R, es efectiva contra patógenos que pueden crecer solamente en tejido hospedero vivo (biótrofos obligados) o patógenos hemibiótrofos, pero no contra patógenos que matan al tejido hospedero durante su colonización (necrótrofos) (Glazebrook, 2005).

1.1.8 Respuestas de defensa inducidas en las plantas

La naturaleza de las respuestas de defensa que son activadas durante PTI y ETI sustancialmente se sobreponen (Tsuda *et al.*, 2008), e incluyen el reforzamiento de la pared celular a través de la síntesis de callosa y lignina; la producción de metabolitos secundarios antimicrobiales, tales como fitoalexinas y la acumulación de proteínas relacionadas a patogénesis (PR), tales como quitinasas y glucanasas, las cuales degradan la pared celular de los hongos y oomycetos.

El reconocimiento de los efectores a través del sistema ETI es particularmente efectivo, debido a que es seguido por una respuesta hipersensible (HR) con un estallido de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que culminan en una muerte celular programada en el sitio de invasión del patógeno (De Wit *et al.*, 1997).

1.1.9 Respuesta Hipersensible (HR)

Como se mencionó anteriormente, el reconocimiento de ciertos patógenos, activa una respuesta hipersensible, la cual limita el crecimiento del patógeno en el sitio de infección. La HR se caracteriza por la presencia de manchas necróticas formadas por las células muertas en el sitio de infección (figura 1.8), que crea una barrera física que puede impedir la proliferación y propagación de algunos patógenos, limitando el suministro de nutrientes debido a que el tejido muerto rápidamente llega a deshidratarse (Heat, 2000; Alfano y Collmer, 1996; Goodman y Novacky, 1994).

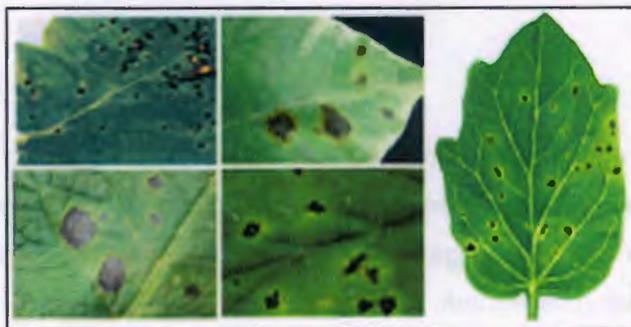


Figura 1.8 Respuesta hipersensible (HR). Caracterizada por manchas necróticas formadas por las células muertas en el sitio de infección (Heat, 2000).

La inducción de HR también está asociada con niveles elevados de ácido salicílico (AS), un regulador clave de respuesta de defensa y resistencia a patógenos, así como con la síntesis de proteínas relacionadas a patogénesis (PR) que exhiben actividad antimicrobial (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Ryals *et al.*, 1996) y de esta manera, se establece una respuesta de resistencia no específica en toda la planta denominada resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) (Durrant y Dong, 2004).

1.1.10 Respuesta sistémica adquirida (SAR)

Además de la respuesta hipersensible que bloquea el crecimiento local de un patógeno infeccioso, una respuesta de defensa secundaria puede ser activada en las partes no infectadas de las plantas resistentes al ataque de una variedad de patógenos normalmente virulentos. Esta respuesta es llamada SAR, la cual es precedida por una acumulación de AS, que es observado no solamente durante la respuesta hipersensible, si no también, en el tejido distal no infectado. Esto dirige a la inducción de un subjuego de genes *PR* (relacionados a patogénesis) que codifican para proteínas tales como β -glucanasas y quitinasas (Ward *et al.*, 1991; Van Loon y Van Kammen, 1970).

La proteína reguladora NPR1 (No expresivo de genes *PR-1*) emerge como un importante traductor de la señal de AS. Antes de la inducción de SAR, NPR1 reside en un complejo oligomérico en el citoplasma. Después de la inducción de SAR, la acumulación de AS dispara un cambio redox en la célula que lleva a la monomerización de NPR1 (Aravind y Koonin, 1999; Cao *et al.*, 1997). La NPR1 en forma monomérica es transportada al núcleo y a su vez interacciona con factores de transcripción TGA, actuando de esta manera como un coactivador transcripcional de la expresión de genes *PR* (Dong, 2004). De manera general, en la figura 1.9, se ilustra el sistema inmune innato de la planta, desde el reconocimiento hasta la producción de las proteínas relacionadas a patogénesis.

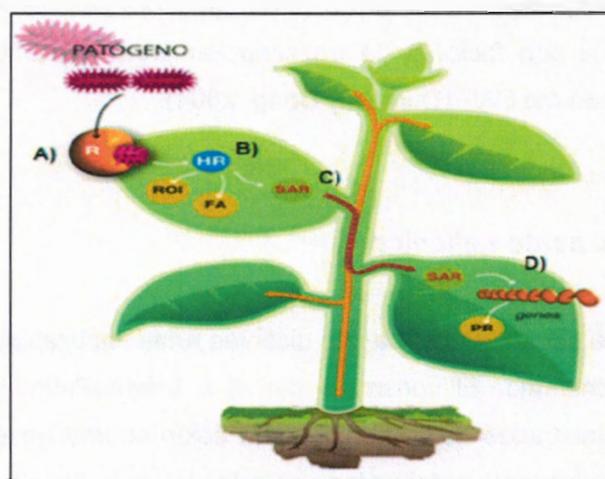


Figura 1.9 Sistema inmune innato de las plantas. A) Reconocimiento del patógeno (involucra PTI y ETI), B) Respuesta Hipersensible (HR), C) Respuesta Sistémica Adquirida, D) Activación de genes relacionados a patogénesis (PR) (Tomado de www.lidaplantresearch.com).

1.1.11 Ácido Salicílico (AS)

Por más de 200 años, la hormona vegetal ácido salicílico (AS) ha sido estudiada por su uso medicinal en humanos (aspirina). Sin embargo, su extensivo papel principal en plantas, particularmente en defensa contra patógenos, ha llegado a ser evidente durante los últimos 20 años. El AS es uno de los compuestos fenólicos de la amplia variedad de compuestos relacionados al grupo hidroxilo y sus derivados que son sintetizados por plantas. El AS en particular, influye en la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, etc. Los esfuerzos por identificar la señal responsable para la activación de resistencia local y SAR, revelaron los importantes papeles que tiene el AS y su derivado, metil salicilato (MeSA) (Vlot *et al.*, 2009).

Las primeras observaciones sobre aplicación exógena de AS en tabaco y el incremento en la resistencia de la planta ante el virus del mosaico del tabaco (White, 1979), abrieron el campo a numerosas investigaciones encaminadas a estudiar los eventos moleculares implicados en la señalización involucrada en la resistencia inducida. En los 90's fue descubierto un posible vínculo entre la acumulación de AS y SAR (Rasmussen *et al.*, 1991; Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). La importancia de AS en la inducción de SAR fue documentado con subsecuentes experimentos en plantas transgénicas sobreexpresando un gen salicilato hidroxilasa (el gen *nahG*) (Delaney *et al.*, 1994; Gaffney *et al.*, 1993). En respuesta al AS, la proteína reguladora positiva NPR1 se mueve al núcleo donde interactúa con factores de transcripción para inducir la expresión de genes de defensa, activando así SAR (Durrant y Dong, 2004).

1.1.12 Metabolismo del ácido salicílico

El AS en las plantas puede ser generado vía dos distintas rutas enzimáticas que requieren al metabolito primario corismato. El corismato deriva a L-fenilalanina que puede ser convertido a AS vía intermediarios de benzoato o vía ácido coumárico en una serie de reacciones enzimáticas inicialmente catalizadas por la fenilalanina amonio liasa (PAL, por sus siglas en inglés). El corismato puede también ser convertido a AS vía isocorismato en

dos procesos involucrando la isocorismato sintasa (ICS, por sus siglas en inglés) e isocorismato piruvato liasa (IPL, por sus siglas en inglés). La cantidad de AS inducido por patógenos es sintetizado vía esta ruta en *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* y *Lycopersicon esculentum* (Catinot, *et al.*, 2008; Uppalapati *et al.*, 2007; Wildermuth *et al.*, 2001).

La mayoría del AS producido en la planta es convertido en AS O- β -glucósido (SAG, por sus siglas en inglés), por una AS glucosiltransferasa (SAGT, por sus siglas en inglés). *Arabidopsis* codifica dos enzimas SAGT, una que convierte preferencialmente AS a SAG, mientras que la otra forma el derivado menos abundante de AS, el saliciloil glucosa éster (SGE, por sus siglas en inglés). El AS es sintetizado en el cloroplasto, mientras que la SAGT parece estar localizada en el citosol. El SAG es activamente transportado del citosol a la vacuola, donde puede funcionar como una forma almacenada inactiva que puede ser convertido de nuevo a AS. (Dean *et al.*, 2005; Dean y Mills, 2004; Hennig *et al.*, 1993). En la figura 1.10 observamos un esquema de la ruta del AS.

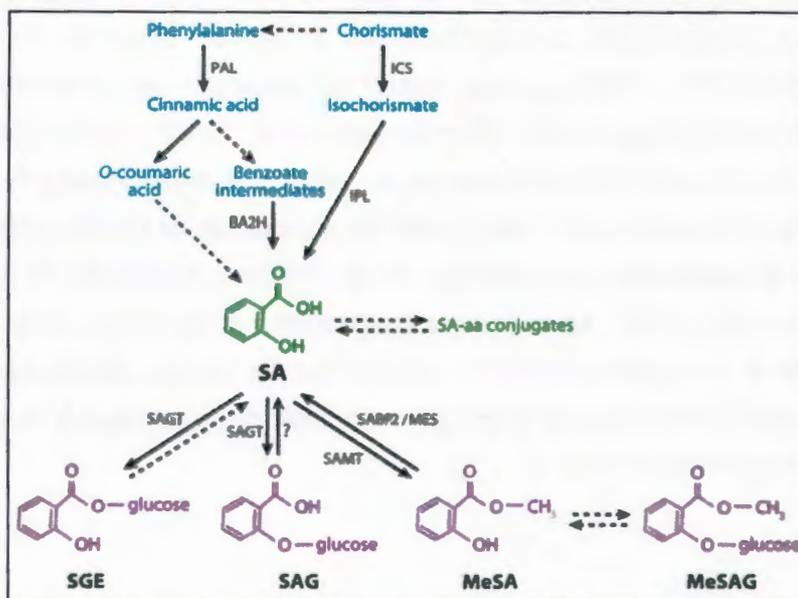


Figura 1.10 Esquema simplificado de las vías para la síntesis y metabolismo del ácido salicílico (Vlot *et al.*, 2009).

1.1.13 Compuestos análogos del ácido salicílico

Actualmente se cuenta con análogos funcionales del AS que se utilizan con éxito incluso a nivel comercial en el control y prevención de ciertos patógenos. Varios compuestos naturales y sintéticos son inductores de SAR (Vlot *et al.*, 2009). Tales análogos activos de AS incluyen: aspirina; ácido 2,6-dihidroxibenzoico (2,6-DHBA); ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) y 7-carboxibenzotiadiazol (BTH). El 2,6-DHBA es un análogo activo del ácido salicílico en la inducción de SAGT en hojas de tabaco (Enyedi y Raskin, 1993) y de un estallido oxidativo inmediato en cultivo en suspensión de células del tabaco (Kawano *et al.*, 2004). El INA (Conrath *et al.*, 1995) y el BTH (Feys *et al.*, 2001) son análogos activos de AS ampliamente aceptados. El ácido 4-clorosalicílico, ácido 5-clorosalicílico y ácido 3,5-diclorosalicílico mostraron ser activos en la inducción de la acumulación de proteínas PR-1 y la mejora de la resistencia a enfermedades en discos de hojas de tabaco (Conrath *et al.*, 1995).

Aunque el papel del AS como señal de defensa está bien establecido en las dicotiledóneas, su papel en las monocotiledóneas es menos conocido. El AS o sus análogos sintéticos INA o BTH pueden inducir la expresión de proteínas PR y/o resistencia en la cebada (Kogel *et al.*, 1994; Muradov *et al.*, 1994), el maíz (Morris *et al.*, 1998), el trigo (Anand *et al.*, 2003; Görlach *et al.*, 1996) y el arroz (Hwang *et al.*, 2008; Rohilla *et al.*, 2002; Schweizer *et al.*, 1999). Además, en cebada los niveles endógenos de AS incrementan la resistencia a la infección por el patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* (Vallélian *et al.*, 1998). Algunos compuestos sintéticos se utilizan como productos comerciales para la inducción de SAR en condiciones de campo, por ejemplo el BTH (BION[®], ACTIGARD[®]) que se aplica en el cultivo de arroz como protección frente al tizón del arroz (Sekizawa y Mase, 1980).

1.1.14 Genes de resistencia (*R*)

El requisito para que una planta sea capaz de reconocer de manera eficiente a un patógeno, y por lo tanto activar las respuestas de defensa apropiadas, es que necesita de ciertos receptores denominados proteínas de resistencia, las cuales son producto de genes de resistencia (*R*) (Staskawicz *et al.*, 1995). El disponer de genes de resistencia clonados, abre la posibilidad de incorporar por transformación genética nuevos genes de resistencia en cultivos de interés. En plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, en donde el genoma ya ha sido secuenciado, se han identificado aproximadamente 150 genes que codifican para proteínas tipo NBS-LRR y más de 400 en *Oryza sativa* (arroz) (Monosi *et al.*, 2004; Innes, 2004; Meyers *et al.*, 2003). Estos datos nos dan un panorama acerca de la gran diversidad de genes tipo NBS-LRR que se encuentran en los genomas de las plantas. Actualmente, debido a la gran importancia de estos genes, se han descrito más de 40 genes *R* caracterizados en diferentes modelos de plantas contra diferentes patógenos, algunos de ellos se describen en el cuadro 1.1 (Martin *et al.*, 2003). Los genes que presentan una alta homología con estos genes de resistencia pero que no han sido caracterizados se denominan candidatos a genes de resistencia o RGCs (por sus siglas en inglés).

Cuadro 1.1 Genes de resistencia en plantas.

Gen <i>R</i>	Planta	Patógeno	Microorganismo	Proteína	Referencia
<i>Pto</i>	Tomate	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	Proteína cinasa	Martin <i>et al.</i> , 1993
<i>RPS2</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	CC-NBS-LRR	Bent <i>et al.</i> , 1994
<i>N</i>	Tabaco	Tobacco mosaic virus	Virus	TIR-NBS-LRR	Whitham <i>et al.</i> , 1994
<i>Xa21</i>	Arroz	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Bacteria	LRR-proteína cinasa	Song <i>et al.</i> , 1995
<i>Prf</i>	Tomate	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	CC-NBS-LRR	Salmeron <i>et al.</i> , 1996
<i>M</i>	Lino	<i>Melampsora lini</i>	Hongos	TIR-NBS-LRR	Anderson <i>et al.</i> , 1997
<i>I2</i>	Tomate	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hongo	CC-NBS-LRR	Ori <i>et al.</i> , 1997
<i>RPM1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	CC-NBS-LRR	Boyes <i>et al.</i> , 1998
<i>Cf</i>	Tomate	<i>Cladosporium fulvum</i>	Hongo	LRR-TM	Dixon <i>et al.</i> , 1998
<i>Gpa2</i>	Papa	<i>Globodera pallida</i>	Nematodo	CC-NBS-LRR	Van Der Vossen <i>et al.</i> , 2000
<i>RPP4</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	Hongos	TIR-NBS-LRR	Van Der Biezen <i>et al.</i> , 2002
<i>Mi</i>	Tomate	<i>Meloidogyne javanica</i>	Nematodo	CC-NBS-LRR	Jablonska <i>et al.</i> , 2007

1.1.15 Proteínas de resistencia (R)

Las proteínas R, producto de genes de resistencia han sido clasificadas de acuerdo al dominio que comparten (Ellis y Jones, 1998). Dichas clases se describen a continuación: A) Genes *R*, que codifican para proteínas con dominios repetidos ricos en leucina (LRR) anclados con un dominio transmembranal (Van Der Biezen *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2000; Meyers *et al.*, 1999); B) genes *R*, que codifican para proteínas con un dominio con actividad de proteína cinasa de serina/treonina (Ellis *et al.*, 2000); C) genes *R*, que codifican proteínas con dominio con actividad de proteína cinasa de serina/treonina con un dominio extracelular LRR; D) genes *R*, que codifican proteínas con un dominio transmembranal anclado a un dominio de hélice súper enrollada (CC, por sus siglas en inglés) (Van Der Biezen *et al.*, 2002; Meyers *et al.*, 1999); E) genes *R*, la clase más abundante que codifican para proteínas con un dominio de unión a nucleótidos (NBS, por sus siglas en inglés) y un dominio repetido rico en leucinas (LRR, por sus siglas en inglés) (Martin *et al.*, 2003). Dentro de la clase NBS-LRR, la proteína RRS1-R es un nuevo miembro, el cual contiene un sitio de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) y un dominio con homología a los factores de transcripción WRKY (Deslandes *et al.*, 2003); F) y más recientemente una proteína de resistencia clonada de arroz denominada Xa27 que no muestra homología con otras proteínas R (Gu *et al.*, 2005). En la figura 1.11 se ilustra lo descrito anteriormente.

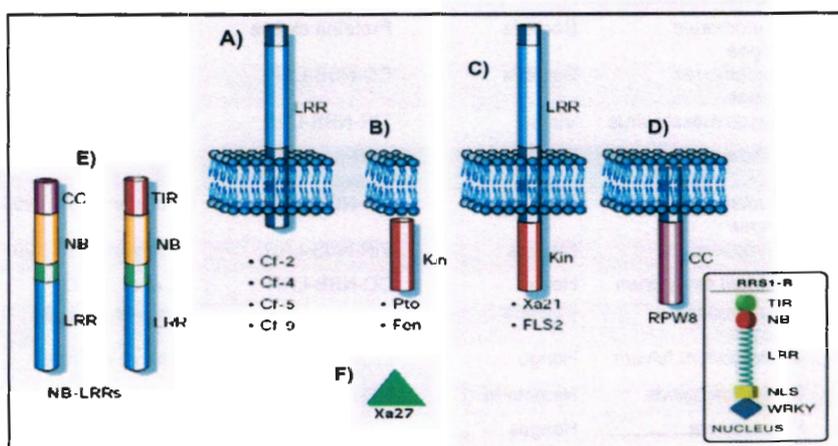


Figura 1.11 Representación de las principales clases de proteínas R de las plantas. Se clasifican de acuerdo al dominio común que comparten (Chisholm *et al.*, 2006; Dangl y Jones, 2001).

La región NBS se piensa que es importante para la unión a ATP y en la funcionalidad general de los productos de los genes *R* (Saraste *et al.* 1990; Walker *et al.*, 1982), mientras que el dominio LRR puede ser el principal determinante en el reconocimiento de productos de los genes *Avr* (Jones y Jones, 1997; Kobe y Deisenhofer, 1995). Esta clase de proteínas pueden dividirse en dos subfamilias de acuerdo a la característica estructural del extremo N-terminal en: TIR-NBS-LRR y los CC-NBS-LRR (no TIR). El nombre del dominio TIR es debido a que presentan homología con el dominio de señalización intracelular denominado Toll de *Drosophila* y el receptor de interleucina-1 en mamíferos (Young, 2000; Meyers *et al.*, 1999).

1.1.16 Secuencias candidatas a genes de resistencia (RGCs)

El dominio conservado NBS de las proteínas NBS-LRR, contiene motivos conservados denominados P-loop o cinasa 1 (motivo de unión a fosfato), el motivo cinasa 2, el motivo GLPL y RNBS-D (Meyers *et al.*, 1999; Traut, 1994; Saraste *et al.*, 1990). Al hacer uso de estos dominios conservados de secuencias NBS-LRR se han obtenido por medio de PCR candidatos a genes de resistencia (RGCs) en varias especies vegetales de interés comercial (Thirumalaiah et al., 2008), tales como patata (Leister *et al.*, 1996), maíz (Collins *et al.*, 1998), girasol (Gentzbittel *et al.*, 1998), lechuga (Shen *et al.*, 1998), *Brassica* (Joyeux *et al.*, 1999), arroz (Mago *et al.*, 1999), frijol común (Rivkin *et al.*, 1999), cítricos (Deng *et al.*, 2000), café (Noir *et al.*, 2001), garbanzo (Huettel *et al.*, 2002), uva (Donald *et al.*, 2002), soya (He *et al.*, 2003; Peñuela *et al.*, 2002; Kanazin *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996), manzana (Lee *et al.*, 2003), trigo (Lacock *et al.*, 2003), achicoria (Plocik *et al.*, 2004), sorgo (Totad *et al.*, 2005) y más recientemente en cocotero (Puch-Hau, 2012).

Los RGCs son secuencias con función desconocida pero que poseen dominios conservados característicos de los genes *R* y muchas de estas secuencias han sido mapeadas y se ha demostrado que están ligadas filogenéticamente a los genes *R* conocidos, proporcionando evidencia que ciertas regiones genómicas probablemente codifican para resistencia ante patógenos, por lo que han sido de gran utilidad para el desarrollo de marcadores moleculares para la búsqueda de variedades de plantas resistentes a patógenos (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2000).

Por otro lado, el hallazgo de ciertos genes *R* involucrados en la respuesta a patógenos es de gran importancia para los programas de ingeniería genética debido a que podemos generar plantas transgénicas resistentes a dichos microorganismos (Timmerman-Vaughan *et al.*, 2000; Meyers *et al.*, 1999).

1.1.17 Efecto del AS en la expresión de genes relacionados con SAR y RGCs

Se conoce que el ácido salicílico es una molécula de señalización importante involucrada en la resistencia a enfermedades de plantas y el ataque de patógenos; además, el AS induce SAR en plantas (Alvarez, 2000; Enyedi *et al.*, 1992) y la expresión de genes relacionados con la patogénesis y resistencia a todos los fitopatógenos, incluyendo bacterias, hongos y virus (Conrath *et al.*, 1995). La activación de genes *PR* requiere de la presencia de AS que actúa como señal (Martin *et al.*, 2003). Se ha visto que la aplicación exógena de AS en tabaco estimula la acumulación de proteínas PR e incrementa la resistencia al virus del mosaico del tabaco (MTV, por sus siglas en inglés) (White, 1979). En el cuadro 1.2 se muestra un grupo de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR).

Cuadro 1.2 Familias reconocidas como proteínas relacionadas con la patogénesis.

Familia	Tipo de miembro	Propiedades	Símbolo del gen
PR1	Tabaco Pr-1 ^a	Antifúngico	<i>Ypr1</i>
PR2	Tabaco Pr2	B-1-3 glucanasa	<i>Ypr2</i> , <i>Gns2</i> (<i>Glb</i>)
PR3	Tabaco PQ	Quitinasa tipo II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>
PR4	Tabaco R	Quitinasa tipo II, III	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>
PR5	Tabaco S	Tipo-Taumatina	<i>Ypr5</i>
PR6	Tomate Inhibidor I	Inhibidor-Proteinasa	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (<i>Pin</i>)
PR7	Tomate P ₆₉	Endo-Proteinasa	<i>Ypr7</i>
PR8	Calabaza Quitinasa	Quitinasa tipo III	<i>Ypr8</i> , <i>Chic</i>
PR9	Tabaco	Peroxidasa	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR10	Parsley PR1	Tipo-Ribonucleasa	<i>Ypr10</i>
PR11	Tabaco Class V	Quitinasa tipo I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR12	Radish Rs-AFP3	Defencina	<i>Ypr12</i>
PR13	Arabidopsis THI 2.1	Tionina	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR14	Cebada LTP4	Proteína de transferencia de lípidos	<i>Ypr14</i> , <i>Lpt</i>
PR15	Cebada OxOa	Oxalato Oxidasa	<i>Ypr15</i>
PR16	Cebada OxOLP	Tipo Oxalato-Oxidasa	<i>Ypr16</i>
PR17	Tabaco PRp27	Desconocido	<i>Ypr17</i>

Existen numerosos estudios relacionados con la aplicación exógena de AS en los cuales se ha observado que este compuesto juega un papel importante en la inducción de resistencia ante el ataque de patógenos. En el cuadro 1.3 se muestran algunos estudios del efecto del AS en la expresión de genes relacionados con SAR.

Cuadro 1.3 Estudios relacionados con ácido salicílico y resistencia sistémica adquirida (SAR).

Artículo	Autor	Resumen
Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance Play a Role in Attenuating Crown Gall Disease Caused by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Anand <i>et al.</i> , 2008	Se investigaron los efectos del ácido salicílico (AS) y la resistencia sistémica adquirida (SAR) en la enfermedad de agalla de la corona causada por <i>A. tumefaciens</i> . Plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> tratadas con AS (5 mM) mostraron una disminución de la susceptibilidad a la infección por <i>Agrobacterium</i> .
Exogenous Applications of Salicylic Acid for Inducing Systemic Acquired Resistance Against Tomato Stem Canker Disease	Esmailzadeh <i>et al.</i> , 2008	Se evaluaron los posibles efectos del uso de ácido salicílico (AS) en la inducción de resistencia del hospedante contra el cancro del tallo del tomate. Se probaron aplicaciones foliares de ácido salicílico con dos concentraciones de 200 μ M y 400 μ M frente a hongos patógenos. Las aplicaciones del AS en la concentración de 400 μ M redujo significativamente el índice de la enfermedad en comparación con un control infectado.
Salicylic acid-induced resistance to <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> in tomato	Mandal <i>et al.</i> , 2009	Se demostró que la aplicación exógena de ácido salicílico 200 μ M mediante aplicación en raíz y foliar puede inducir resistencia contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Lycopersici</i> en tomate. La inducción de la resistencia se logró aplicando AS directamente al sistema de raíces de la planta y también por aplicación foliar.
Differential gene expression, induced by salicylic acid and <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> infection, in tomato	Oliveira <i>et al.</i> , 2008	Se determinó el perfil de transcripción en plantas de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>), Durante la infección con <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> y después de la aplicación foliar de ácido salicílico (5 mM). Se identificaron 307 clones, esto permitió aislar varios genes relacionados con la defensa de las plantas a los fitopatógenos, incluyendo genes con funciones desconocidas

En relación a los RGCs, en general estos se han caracterizado en plantas sin tratamiento o inoculadas con diversos patógenos, en cultivos como pino (Liu, 2003); frijol común (Ferrier-Cana *et al.*, 2003); jengibre (Nair y Thomas, 2007); yuca (Contreras y López, 2008); arroz (Du *et al.*, 2009); caña de azúcar (You-Xiong *et al.*, 2009); camote (Guan-Shui *et al.*, 2009); uva (Albertazzi *et al.*, 2009); tabaco (Gao *et al.*, 2010); durazno (Cao *et al.*, 2011); pera (Zhang *et al.*, 2011); mijo perla (Ranjini *et al.*, 2011); *K. galanga* (Joshi *et al.*, 2012) y chile dulce (Wan *et al.*, 2012), entre otros.

Sin embargo en un estudio realizado por You-Xiong y colaboradores (2009), se demostró que el ácido salicílico puede inducir la expresión de genes de resistencia de tipo NBS-LRR en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* Roxb), que es una monocotiledónea al igual que el cocotero. El estudio se realizó a partir de iniciadores degenerados de genes *R* de tipo NBS-LRR con los cuales se lograron aislar 11 secuencias RGCs en caña de azúcar de la variedad NCo376 que presenta alta resistencia al hongo causante del carbón de la caña de azúcar (*Ustilago scitaminea*); estas secuencias presentaron los motivos característicos de los genes de resistencia NBS-LRR y residuo de triptófano indicando que son de tipo non-TIR-NBS-LRR característico en monocotiledóneas. De estas secuencias, fue evaluada la de un gen candidato denominado *PIC* (EF059974) en plántulas de caña asperjadas con el hongo por un lado y ácido salicílico por otro (5 mM). El tratamiento con AS indujo una mayor expresión del gen *PIC*, comparado con el tratamiento con el hongo; el tejido donde se expresó con mayor intensidad el gen fue la hoja.

De igual manera, en otro estudio realizado por Wan y colaboradores (2012), se logró demostrar que el AS puede inducir la expresión de genes de resistencia de tipo NBS-LRR en chile dulce (*Capsicum annuum* L). Un total de 78 RGCs fueron amplificadas en chile dulce de la variedad PBC631C, empleando PCR con iniciadores degenerados e identificados mediante una comparación en la base de datos del National Center for Biotechnology (NCBI). 55 de las 78 secuencias presentaron marco de lectura abierto y motivos característicos que los identificaron como genes de tipo NBS-LRR y fueron agrupados en las dos subfamilias non-TIR-NBS-LRR y TIR-NBS-LRR. Se sabe que en dicotiledóneas es posible encontrar ambas familias de genes (Pan *et al.*, 2000). Estas secuencias fueron divididas en siete clados distintos y para el análisis de los niveles de expresión de los RGCs en los diferentes órganos, dos secuencias representativas de cada clado fueron seleccionadas. El tratamiento consistió en la aplicación al medio de cultivo de 100 μ M de AS por seis horas y el posterior análisis de la expresión en hoja. Los resultados mostraron un aumento en los niveles de expresión de los genes posterior al tratamiento con AS; el incremento fue más notable en los CaRGC01, CaRGC05 y CaRGC49 (TIR-NBS-LRR), y en CaRGC14 (non-TIR-NBS-LRR). También fue posible encontrar expresión basal de estos genes en los diferentes tejidos sin tratamiento (hoja, tallo y raíz).

A la fecha, en cocotero no se cuenta con ningún estudio realizado sobre la expresión de genes de resistencia, sin embargo, en base a los estudios presentados podemos suponer que en plantas de cocotero es posible inducir la expresión de los genes de resistencia a enfermedades o patógenos mediante la aplicación exógena del ácido salicílico.

1.1.18 Estudios sobre los mecanismos de defensa planta-fitoplasma

A pesar de que los fitoplasmas están relacionados con más de 700 enfermedades en varios cultivos, entre los que se encuentra el AL, el entendimiento sobre la respuesta de las plantas a fitoplasmas es muy pobre. En un estudio realizado en *Vitis vinifera* por Albertazzi y colaboradores (2009) se emplearon microarreglos para determinar genes que modificaban su expresión en respuesta a la infección del fitoplasma Bois Noir. Observaron la represión de genes involucrados en la degradación de la pared celular y la inducción de genes involucrados en el reforzamiento de la misma y la expresión de un factor de transcripción Myb (oncogén mieloblastosis), perteneciente a una familia de genes que tienen un rol en las respuestas de defensa de las plantas. Otros de los genes que modificaron su expresión, fueron aquellos que codifican para receptores de membrana (genes *R*), así como también genes relacionados a patogénesis (*PR*) como *PR-1*, el cual fue inducido fuertemente y es un marcador de la vía de señalización del ácido salicílico (Pieterse y Van Loon, 1999), lo que puede sugerir que el ácido salicílico está involucrado en las respuestas ante la infección de fitoplasmas. Otros de los genes que fueron inducidos son los factores de transcripción como los NAC (NAM, ATAF y CUC) y los WRKY (proteína de unión al ADN), los cuales previamente han sido reportados por jugar un rol en la senescencia y la respuestas de defensa ante patógenos (Eulgem, 2005), así como también los factores de respuesta a etileno (ERFs), los cuales están involucrados en una gran variedad de procesos de desarrollo y respuestas a estrés en plantas.

En base a estos argumentos, se puede suponer que las plantas de cocotero pueden ser capaces de activar los mecanismos de defensa en respuesta al ataque de fitoplasmas. Este proceso tal vez pudiera estar sucediendo con los ecotipos que presentan resistencia ante la enfermedad del AL como son el alto del Pacífico y el enano malayo amarillo.

1.1.19 Estudios sobre los mecanismos de defensa en cocotero

En cocotero, la investigación de las respuestas de defensa a patógenos, incluyendo a los fitoplasmas del AL, es un área muy poco conocida. Sin embargo, lo más cercano que se ha hecho, es un estudio realizado por Lizama y colaboradores (2007), en el cual se trabajó con un sistema *in vitro* con callos de cocotero, que fueron tratados con quitosano para simular las interacciones moleculares que ocurren con patógenos. En este estudio se pudo observar que la aplicación de quitosano modificó diferencialmente la expresión de algunos genes similares a los receptores de señalización a patógenos tipo cinasas (RLKs), así como también la actividad de una β -1,3-glucanasa (proteína relacionada a patogénesis). Además, el tratamiento de los callos con quitosano causó la acumulación de peróxido de hidrogeno, una especie reactiva de oxígeno involucrada en la respuesta hipersensible. Otro hallazgo de este estudio, fue que la aplicación de AS a los callos de cocotero también modificó (incrementando) la abundancia de los transcritos de los genes antes mencionados, mientras que con metil jasmonato (éster metílico derivado del ácido jasmónico) no se vio influenciada la expresión.

En otro estudio realizado por Narváez (2010), utilizando iniciadores degenerados a partir de secuencias conservadas del gen *NPR1*, se logró aislar un fragmento de proteína de 69 aminoácidos que corresponde a un dominio conservado de ankirina (ANK) de la proteína de *NPR1*. En este estudio se evaluó si el mecanismo de defensa SAR está presente en cocotero y puede ser inducido con la aplicación de AS y en consecuencia inducir resistencia a *Phytophthora capsici* (patógeno modelo). Las plantas de cocotero en condiciones *in vitro* fueron expuestas a concentraciones de 1.0 y 2.5 mM de AS y posteriormente fueron infectadas con *P. capsici*. Los resultados mostraron que el sistema *in vitro* Cocotero - *P. capsici* puede funcionar para evaluar los mecanismos de defensa en esta especie. Las plantas tratadas con el patógeno desarrollaron una enfermedad tipo pudrición de cogollo con daño en hojas y tallo. Las plantas a las que se les aplicó 2.5 mM de AS presentaron una reducción de este daño en comparación con plantas no tratadas. En este estudio se verificó si el gen *NPR1* se encontraba presente en cocotero y se obtuvo una secuencia parcial de un análogo del gen *NPR1* que mostró un 82% de identidad con el gen *NPR1* (1788 pb) de *Musa* del grupo ABB del cultivar *Dongguan Dajiao*, molécula tipo ARNm. Estos resultados mostraron por primera vez que bajo las

condiciones empleadas, *P. capsici* puede causar síntomas de pudrición de cogollo, el tratamiento con AS puede reducir el daño ante la infección y la evidencia de que gen *NPR1* puede estar presente, lo que sugieren que SAR podría estar operando como un sistema de defensa en cocotero. Esto se ha tomado como base para realizar estudios sobre la expresión de este gen en respuesta al AS, como molécula inductora de SAR que podría estar operando como un sistema de defensa en cocotero.

El trabajo anterior dio lugar a un estudio realizado por Nic-Matos (2012), en el cuál se evaluó la expresión del gen *NPR1* en plántulas de cocotero de siete meses de edad, las cuales fueron tratadas con 2.5 mM de AS aplicado al medio de cultivo y posteriormente fue colectado el tejido de hoja a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72, 96 y 120 h). Los resultados mostraron que las plantas analizadas durante el tratamiento con AS a las 24 y 96 h mostraron un marcado incremento en los niveles de transcritos del gen *CnNPR1* (*Cocos nucifera NPR1*), mientras que los controles, únicamente mostraron una constante expresión basal del transcrito. Posteriormente se diseñaron iniciadores específicos a partir del fragmento de 69 aminoácidos (Narváez, 2010), con los cuales se logró por medio del RACE, el aislamiento del extremo terminal 3' de *CnNPR1*. El análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos mostró un porcentaje de identidad de 81% con *MdNPR1* de *Musa ssp.* ABB, 78% con *OsNPR1* de arroz y 78% con *ZmNPR1* de maíz. El tamaño del gen aislado en las especies ya mencionadas va de los 550 a 600 aminoácidos aproximadamente. El tamaño total del extremo terminal 3' aislado en cocotero fue de 316 aminoácidos y abarcó por completo el dominio conservado de repeticiones de Ankirina. También se pudo identificar tres residuos requeridos para la localización nuclear (NLS) el cual es esencial en la inducción de la expresión de genes relacionados a patogénesis (Kinkema *et al.*, 2000). El análisis filogenético mostró que *CnNPR1* presenta una cercana homología con *NPR1* de *Musa ssp.* ABB (FJ357442.1) (Zhao *et al.*, 2008) y *NPR1* de *Zea Mays* (AAT24361.1). Estructuralmente, la proteína *NPR1*, contiene una secuencia bipartita de localización nuclear (NLS) y dos dominios conservados de interacción proteína-proteína: un dominio de cuatro repeticiones de Ankirina (ANK) y un dominio BTB/POZ (Broad-complex, Tramtrack and Bric-abrac/Pox virus and Zinc Finger) (Rochon *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Hepworth *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 1997).

En la figura 1.12 se presenta el árbol filogenético de *CnNPR1*. Sin embargo, aún falta obtener el extremo terminal 5' que contiene el dominio conservado BTB/POZ para poder conocer más acerca de la función de la proteína *CnNPR1* de cocotero.

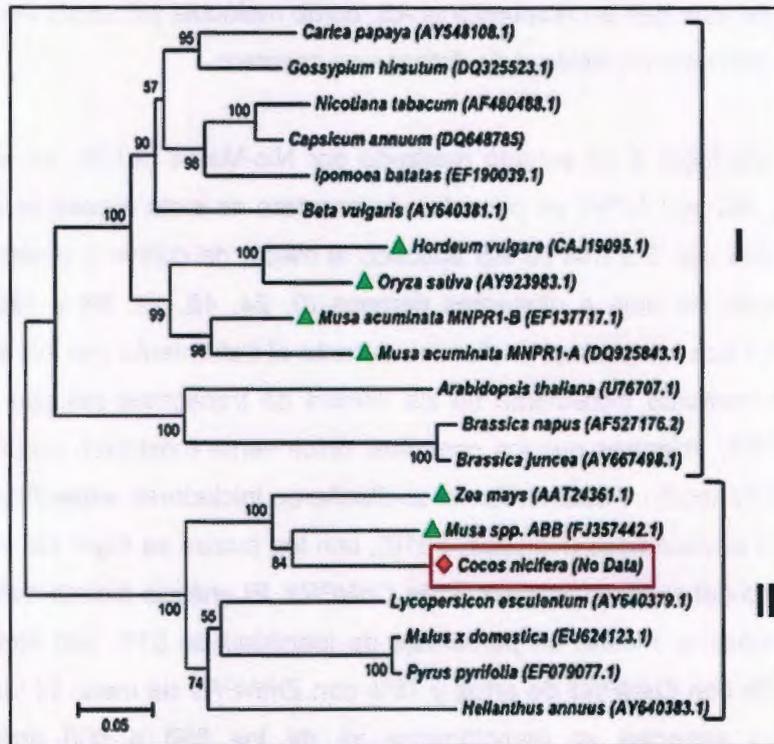


Figura 1.12 Árbol filogenético realizado empleado 20 secuencias de NPR1 de diferentes especies de plantas. Los triángulos en verde muestran las 6 especies de monocotiledóneas empleadas en el análisis, y el rectángulo rojo muestra la secuencia aislada de cocotero (*CnNPR1*), mientras que las secuencias sin marcar, pertenecen a las 13 secuencias restantes de especies dicotiledóneas. I y II, muestran los dos clados en los que se dividen estas 20 secuencias en total (Nic-Matos, 2012).

Las aportaciones antes mencionadas nos dan bases para pensar que el cocotero puede ser capaz de activar SAR ante el ataque de patógenos, en donde los genes de resistencia pudieran estar jugando un papel fundamental en la percepción de los patógenos en este cultivo vía AS.

1.1.20 Estudios sobre RGCs en cocotero

El único estudio que se ha realizado sobre candidatos a genes de resistencia (RGCs, por sus siglas en inglés) en cocotero es el de Puch-Hau (no publicado) en el cual se logró la amplificación por PCR e identificar 162 secuencias RGCs de tipo NBS-LRR de las cuales 139 presentaron marco de lectura abierto. El trabajo se realizó con ADN genómico extraído de palmas de cocotero de los ecotipos alto del Pacífico y enano malayo amarillo (ambos resistentes al AL) y alto del Atlántico (susceptible al AL), utilizando iniciadores degenerados diseñados a partir de motivos específicos conservados de tipo NBS-LRR de secuencias homólogas a genes de resistencia. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y en base a los análisis bioinformáticos fueron clasificados en 29 grupos diferentes, los cuales posteriormente se agruparon en 11 clados distintos (Figura 1.13) en base a diferentes criterios (Puch-Hau, no publicado). La secuencia deducida de aminoácidos reveló la presencia de los motivos característicos de las proteínas de resistencia del tipo NBS-LRR y el análisis filogenético agrupó a los RGCs dentro de la familia non-TIR-NBS-LRR. Este es el primer estudio en donde se reporta el aislamiento de secuencias RGCs en palmas de cocotero y que podrían contribuir a entender parte de los mecanismos de defensa de este cultivo ante los patógenos que lo afectan. Partiendo de esta investigación se seleccionaron tres secuencias RGCs representativas, de tres clados diferentes, las cuales fueron nombradas como *CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10* (Cn, por *Cocos nucifera* y el número, por el clado) para desarrollar el presente trabajo. En la figura 1.14 se puede apreciar el árbol filogenético de los RGCs aislados en cocotero y su homología con genes de resistencia conocidos.

Debido a que en cocotero no se cuenta con ningún estudio realizado sobre expresión de genes de resistencia y con base en los antecedentes discutidos, el presente estudio pretende aportar al conocimiento y entendimiento de los mecanismos de defensa en esta especie, mediante el estudio de la expresión de candidatos a genes de resistencia de tipo NBS-LRR en plántulas de cocotero, inducidos con ácido salicílico. A partir de RGCs (secuencias candidatas a genes *R*) aisladas en estudios anteriores.

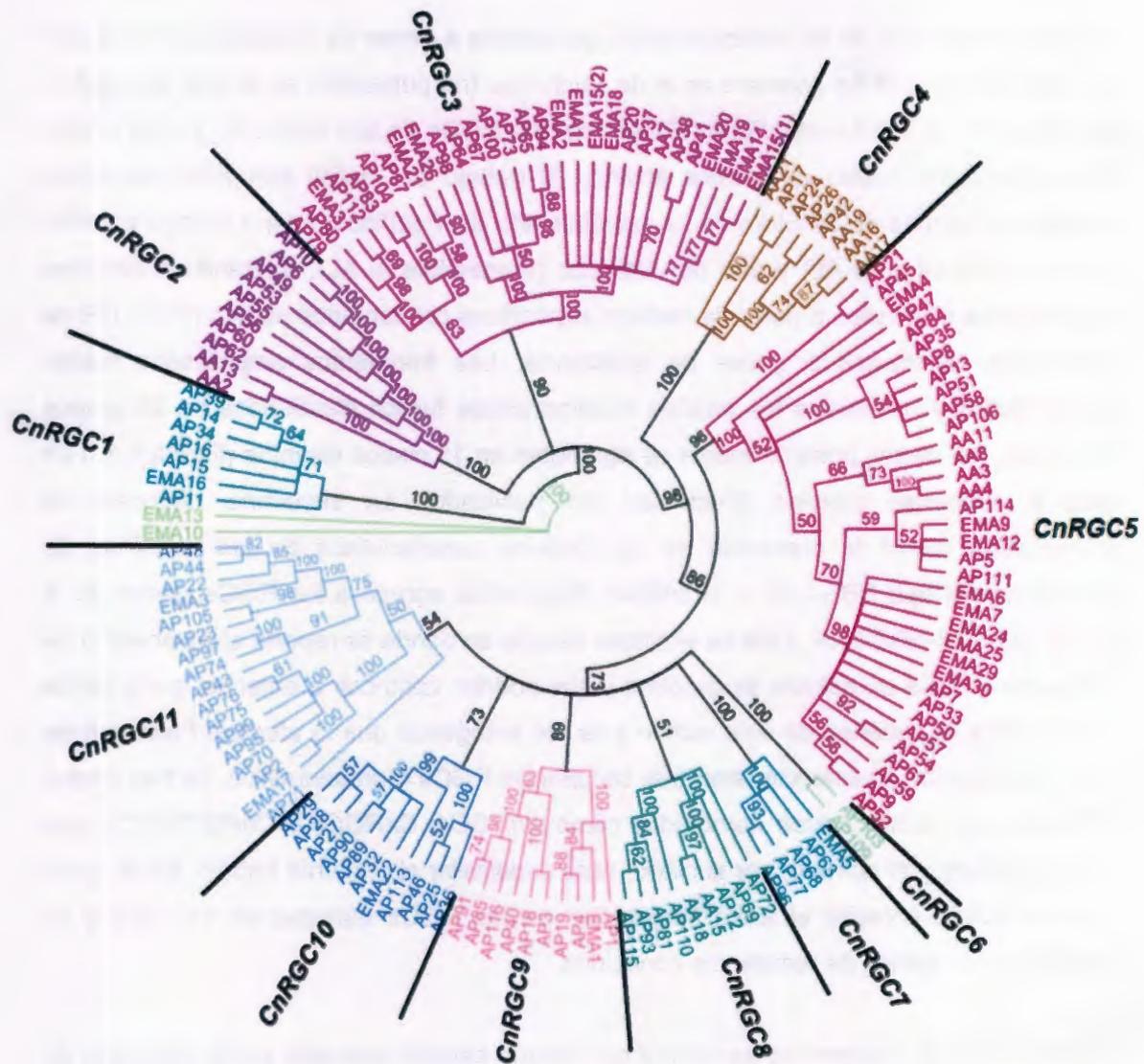


Figura 1.13 Análisis filogenético de las secuencias RGCs aisladas en cocotero. Las secuencias provenientes del Alto del Pacifico están abreviadas como AP, las de Enano Malayo Amarillo como EMA y las del Alto del Atlántico como AA. Las secuencias fueron clasificadas en 11 clados diferentes, en base a dos criterios: su porcentaje de identidad (>50% mismo clado) y si pertenecen a un grupo monofilético (Puch-Hau, no publicado).

1.2 HIPÓTESIS

La aplicación exógena de ácido salicílico (AS) puede inducir la expresión diferencial de candidatos a genes de resistencia (RGCs) en diferentes tejidos de plántulas de cocotero.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

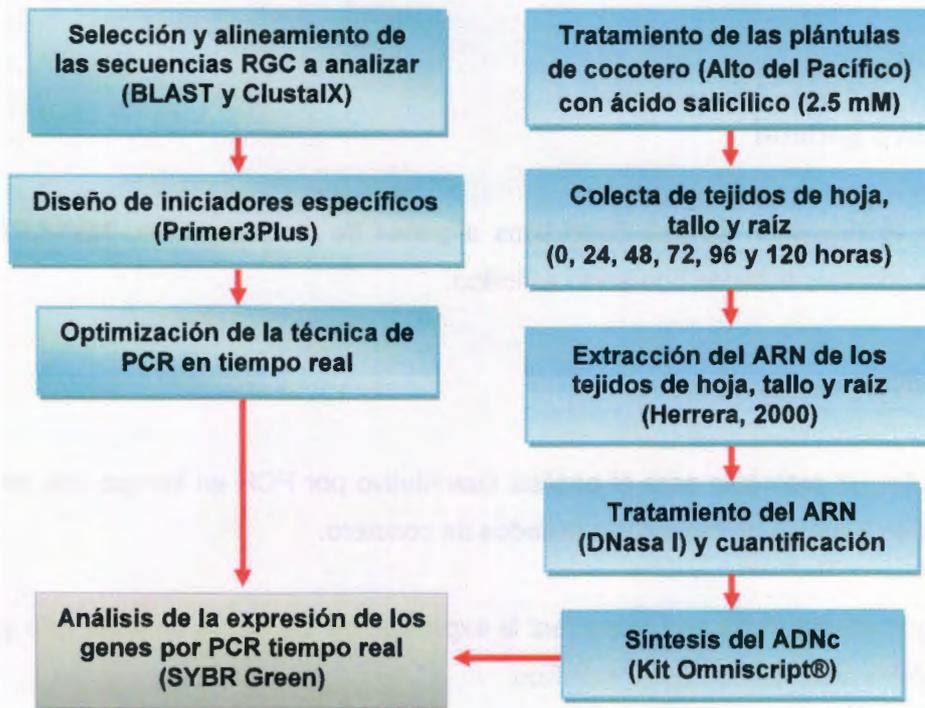
Caracterizar la expresión de tres candidatos a genes de resistencia tipo NBS-LRR en plántulas de cocotero tratadas con ácido salicílico.

1.3.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un protocolo para el análisis cuantitativo por PCR en tiempo real de tres candidatos a genes de resistencia aislados de cocotero.
- Analizar mediante PCR en tiempo real la expresión de los RGCs en hoja, tallo y raíz de plántulas tratadas con ácido salicílico.

1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En el siguiente esquema se muestra la estrategia experimental para llevar a cabo el estudio de expresión de RGCs en cocotero.



1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albertazzi G., Milc J., Caffani A., Francia E., Roncaglia E., Ferrari F., Tagliafico E., Stefani E. and Pecchioni N. (2009). Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. *Plant Science*, 176: 792-804.
- Alfano J. and Collmer A. (1996). Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell*, 8: 1683-1698.
- Alvarez A. (2000). Salicylic acid in machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology*, 44: 429-442.
- Anand A., Schmelz E., Muthukrishnan S. (2003). Development of a lesion-mimic phenotype in a transgenic wheat line overexpressing genes for pathogenesis-related (PR) proteins is dependent on salicylic acid concentration. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16: 916-25.
- Anand A., Uppalapati S., Ryu C., Allen S., Kang L., Tang Y., and Mysore K. (2008). Salicylic Acid and Systemic Acquired Resistance Play Role in Attenuating Crown Gall Disease Caused by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology*, 146: 703-715.
- Anderson P., Lawrence G., Morrish B., Ayliffe A., Finnegan E., and Ellis J. (1997). Inactivation of the flax rust resistance gene *M* associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. *Plant Cell*, 9(4): 641-951.
- Aravind L., and Koonin E.V. (1999). Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: Structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *Journal of Molecular Biology*, 285: 1353-1361.
- Beakbane A., Slater C. and Posnette, A. (1972). Mycoplasmas in the phloem of coconut, *Cocos nucifera* L., with lethal yellowing disease. *Journal of Horticultural Science*, 47: 265.
- Been B. (1981). Observations on field resistance to lethal yellowing in Jamaica. *Oléagineux*, 36: 9-11.
- Bent AF., Kunkel BN., Dahlbeck D., Brown KL., Schmidt R., Giraudat J., Leung J., Staskawicz BJ. (1994). RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science*, 265: 1856-1860.
- Bittel P. and S. Robatzek (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 335-341.
- Boller T. and He S. Y. (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, 324: 742-744.

- Boyes D., Nam J. and Dangl J. (1998). The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 15849-15854.
- Bradley W., Poel J. and Huang H. (2006). *Cocos Nucifera*: An Abundant Renewable Source of Energy. *Proceedings of the International conference on Renewable Energy for Developing countries*. Baylor University, USA.
- Busam G., Kassemeyer H. and Matern U. (1997). Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiology*, 115: 1029-1038.
- Cao H., Glazebrook J., Clarke J.D., Volko S., and Dong X. (1997). The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88: 57-63.
- Cao K., Wang L. R., Zhu G. R., Fang W. C., and Chen C. W. (2011). Isolation, characterization and phylogenetic analysis of resistance gene analogues in a wild species of peach (*Prunus kansuensis*). *Canadian Journal of Plant Science*, 91: 961-970.
- Castro M. E. y García P. E. (2009). La inmunidad innata en las plantas: una batalla molecular entre receptores y estimuladores. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. *Biológicas*, No.11, pp. 43-47.
- Catinot J., Buchala A., Abou-Mansour E., Métraux J. (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Letters*, 582: 473-78.
- Chan E. and Elevitch C. R (2006). *Cocos nucifera* (coconut) *Arecaceae* (palm family). *Species Profiles for Pacific Island Agroforestry*. www.Traditionaltree.org.
- Chisholm S., Coaker G., Day B., and Staskawicz B. (2006). Host-microbe interactions shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124: 803-814.
- Collins N., Webb C., Seah S., Ellis J., Hulbert S. and Pryor A. (1998). The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(10): 968-978.
- CONACOCO (2008). Consejo Nacional del cocotero, www.conacoco.com.mx.
- Conrath U., Chen Z., Ricigliano J.R., Lessig D. (1995). Two inducers of plant defense responses, 3, 6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activities in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 7143-7147.

- Contreras E. y López C. (2008). Expresión de dos genes candidatos a resistencia Contra la bacteriosis vascular en yuca. *Acta Biológica Colombiana*, 13(2): 175–188.
- D'Amelio R., Marzachi C., Bosco D. (2010). Activity of benzothiadiazole on chrysanthemum yellows phytoplasma ('*Candidatus Phytoplasma asteris*') infection in daisy plants. *Crop Protection*, 29: 1094–1099.
- Dangl J.L. and Jones J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411: 826–833.
- Dean J., Mills J. (2004). Uptake of salicylic acid 2-O- β -D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiologia Plantarum*, 120: 603–612.
- Dean J., Mohammed L., Fitzpatrick T. (2005). The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*, 221: 287–96.
- Delaney T., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weyman K., Negrotto D., Gaffney T., Gutrella M., Kessmann H., Ward E., Ryals J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance response. *Cell*, 77: 565–577.
- Deng Z., Huang S., Ling P., Chen C., Yu C., Weber C., Moore G. and Gmitter F. (2000). Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in *citrus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(5-6): 814–822.
- Deslandes L., Olivier J., Peeters N., Feng D., Khounlotham M., Boucher C., Somssich I., Genin S., and Marco Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 8024–8029.
- De Wit P.J. (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends in Plant Science*, 2: 452–458.
- Dixon M., Hatzixanthis K., Jones D., Harrison K. and Jones J. (1998). The Tomato Cf-5 Disease Resistance Gene and Six Homologs Show Pronounced Allelic Variation in Leucine-Rich Repeat Copy Number. *Plant Cell*, 10: 1915–1925.
- Domínguez C., López J., Castillo R., y Ruíz B. (1999). El COCOTERO *Cocos nucifera* L. Manual para la producción en México. INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Huimanguillo. Libro Técnico Núm. 6. Tabasco. México. 132 p.
- Donald T.M., Pellerone F., Adam-Blondon A.F., Bouquet A., Thomas M.R. and Dry I.B. (2002). Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(4): 610–618.
- Dong X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 547–552.

- Doyle P. (1998). The impact of lethal yellowing type coconut diseases on small farmers. Natural Resources Institute, UK. p 13-26.
- Du B., Zhang W., Liu B., Hu J., Wei Z., Shi Z., He R., Zhu L., Chen R., Han B., and He G. (2009). Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 6(52): 22163-22168.
- Durrant W.E. and X. Dong. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 185-209.
- Ellis J. and Jones D. (1998). Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogens resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 288-293.
- Ellis J., Doods P. and Pryor T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 278-284.
- Enyedi A., Raskin I. (1993). Induction of UDP-glucose: salicylic acid glucosyltransferase activity in tobacco mosaic virus-inoculated tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves. *Plant Physiology*, 101: 1375-1380.
- Enyedi A., Yalpani N., Sliverman P., Raskin I. (1992). Signal molecule in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell*, 70: 879-886.
- Esmailzadeh M., Soleimani M. J., and Rouhani H. (2008). Exogenous applications of Salicylic Acid for inducing Systemic Acquired Resistance against tomato stem canker disease. *Journal of Biological Sciences*. 8(6): 1039-1044.
- Eulgem T. (2005). Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome, *Trends in Plant Science*, 10: 71-78.
- FAO. (2007). Statistical Database Gateway. <http://apps.fao.org>
- Ferrier-Cana E., Geffroy V., Macadré C., Creusot F., Imbert-Bolloré P., Sévignac M., Langin T. (2003). Characterization of expressed NBS-LRR resistance gene candidates from common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 251-261.
- Feys B., Moisan L., Newman M. and Parker J. (2001). Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO Journal*, 20: 5400-5411.
- Fremont Y., Ziller R. and Nuce de Lamothe M. (1969). El Cocotero. En *Colección de Agricultura Tropical*. Editorial Blume, España. pp 6-31.
- Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Nerotto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H., Ryaals J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261: 754-756.

- Gao Y., Xu Z., Jiao F., Yu H., Xiao B., Li Y., Lu X. (2010). Cloning, structural features, and expression analysis of resistance gene analogs in Tobacco. *Molecular Biology Reports*, 37: 345–354.
- García-Pineda E., y Lozoya-Gloria E. (2004). Genes de resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22: 414-422.
- Gentzbittel L., Mouzeyar S., Badaoui S., Mestries E., Vear F., De Labrouhe D. and Nicolas P. (1998). Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(3-4): 519-525.
- Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 43: 205–227.
- Goodman R. and Novacky A. (1994). *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens*. Saint Paul, MN: APS Press.
- Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U., Kogel K., Oostendrop M., Staub T., Ward E., Kessmann H. and Ryals J. (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, 8: 629–43.
- Griffith R. (1987). Red ring disease of coconut palm. *Plant Disease*, 71: 193-196.
- Gu K., Yang B., Tian D., Wu L., Wang D., Sreekala C., Yang F., Chu Z., Wang G., White, F. and Yin Z. (2005). R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 435: 1122–1125.
- Guan-Shui C., Yi-Fei Z, Li-Li H., and Da-Ren P. (2009). Cloning and Characterization of Full Length cDNA of a CC-NBS-LRR Resistance Gene in Sweetpotato. *Agricultural Sciences in China*, 8(5): 538-545.
- Hammond-Kosack K., and Jones J. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8: 1773–1791.
- Hanold D. and Randles J. (1991). Coconut cadang-cadang disease and its viroid agent. *Plant Disease*, 75: 330-335.
- Harrison N. and Elliot M. (2007). Lethal Yellowing (LY) of palm. Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS), Fact Sheet, PP-222, 9p.
- Harrison N., Cordova I., Richardson P. and Dibonito R. (1999). Detection and diagnosis of lethal yellowing. In: C. Oropeza, J.L. Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardeña and J.M. Santamaría (Editors) *Current Advance in Coconut Biotechnology*. Pp. 183-196. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherland (In press).
- Harrison N. and Oropeza C. (2008) Coconut lethal yellowing. In: NA Harrison, GP Rao y C Marcone (Eds.). *Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas*. Studium Press LLC, Houston, USA pp. 219-248.

- He C., Tian A., Zhang J., Zhang Z., Gai J. and Chen S. (2003). Isolation and characterization of a full-length resistance gene homolog from soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(5): 786-793.
- Heat M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, 44(3): 321–334.
- Hennig J., Malamy J., Gryniewicz G., Indulski J., Klessig D. (1993). Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *Plant Journal*, 4: 593–600.
- Hepworth S., Zhang Y., Mckim S., Li X. and Haughn G. (2005). Blade-On-Petiole-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17: 1434-1448.
- Herrera I. L. (2000). RT-PCR en el diagnóstico de la tristeza de los cítricos (CVT). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación de Estudios avanzados del IPN, Unidad Irapuato, México.
- Howard F. W. (1990). Evaluation of grasses for cultural control of *Myndus crudus*, a vector of Lethal Yellowing of palms. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 56(2): 131-137.
- Howard F. W. and Barrant C. (1989). Question and answers about lethal yellowing disease. *Principes*, 33: 163-171.
- Howard F. W., Kramer J. and Teliz-Ortiz M. (1984). *Myndus crudus* (Homoptera: Cixiidae) in Cancún, México. *Florida Entomologist*, 67(4): 577-579.
- Howard F.W., Norris R. and Thomas D. (1983). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a plant-hopper *Myndus crudus* (Homoptera Cixiidae). *Tropical Agriculture (Trinidad)*, 60: 168-171.
- Huettel B., Santra D., Muehlbauer F., and Kahl G. (2002). Resistance gene analogues of chickpea (*Cicer arietinum* L.): isolation, genetic mapping and association with a *Fusarium* resistance gene cluster. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(2-3): 479-490.
- Hwang S., Lee I., Yie S., Hwang D. (2008). Identification of an OsPR10a promoter region responsive to salicylic acid. *Planta*, 227: 1141–50.
- Innes R.W. (1998). Genetic dissection of R gene signal transduction pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 229–304
- Innes R.W. (2004). Guarding the goods. New insights into the central alarm system of plants. *Plant physiology*, 13: 695-701.

- Jablonska B., Ammiraju J., Bhattarai K., Mantelin S., Martinez O., Roberts P. and Kaloshian I. (2007). The Mi-9 Gene from *Solanum arcanum* Conferring Heat-Stable Resistance to Root-Knot Nematodes Is a Homolog of Mi-1. *Plant Physiology*, 143(2): 1044-1054.
- Jones J. D. and Dangl J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117): 323-329.
- Jones D. and Jones J. (1997). The roles of leucine rich repeats in plant defenses. *Advances in Botanical Research-Advances in Plant Pathology*, 24: 90–167.
- Joseph T. and Radha K. (1975). Role of *Phytophthora palmivora* in but rot of coconut. *Plant Disease Reports*, 59: 1014-1017.
- Joshi R., Kar B., Mohanty S., Subudhi E. and Nayak S. (2012). Molecular Cloning, Characterization, and Expression Analysis of Resistance Gene Candidates in *Kaempferia galanga* L. *Molecular Biotechnology*, 50: 200–210.
- Joyeux A., Fortin M., Mayerhofer R. and Good A. (1999). Genetic mapping of plant disease resistance gene homologues using a minimal *Brassica napus* L. population. *Genome*, 42(4): 735-743.
- Kanazin V., Frederick M. and Shoemaker R. (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21): 11746-11750.
- Kang M., Park K., and Choi D. (1998). Coordinated expression of defense-related genes by TMV infection or salicylic acid treatment in tobacco. *Molecules and Cells*, 31: 388-392.
- Kawano T., Tanaka S., Kadono T. and Muto S. (2004). Salicylic acid glucoside acts as a slow inducer of oxidative burst in tobacco suspension culture. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59: 684-692.
- Kinkema M., Fan W., Dong X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell*, 12: 2339–2350.
- Kobe B. and Deisenhofer J. (1995). A structural basis of the interaction between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*, 374: 183-86.
- Kogel K., Beckhove U., Dreschers J., Münch S., Rommé Y. (1994). Acquired resistance in barley: the resistance mechanism induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiology*, 106: 1269–77.
- Lao D. A. (2008). *Coco-biodiesel more than a diesel replacement*. Bioenergy Forum 2008, Bangkok.

- Lacock L., Van Niekerk C., Loots S., Du Preez F. and Botha A. (2003). Functional and comparative analysis of expressed sequences from *Diuraphis noxia* infested wheat obtained utilizing the conserved Nucleotide Binding Site. *African Journal of Biotechnology*, 2(4): 75-81.
- Lee S., Seo J., Rodriguez-Lanetty M. and Lee D. (2003). Comparative analysis of superfamilies of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species. *Molecular Genetics and Genomics*, 269(1): 101-108.
- Leister D., Ballvora A., Salamini S. and Gebhardt C. (1996). A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetics*, 14(4): 421-429.
- Lida plant research. Extracto de *Saccharomyces cerevisiae*: modo de acción contra patógenos. http://www.lidaplantresearch.com/site/investigacion_lectura.php?id_seccion=30&id_contenido=131(Acceso 19 Noviembre 2013).
- Liu G., Holub E., Alonso J., Ecker J. and Fobert P. (2005). An *Arabidopsis* NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. *Plant Journal* 41(2): 304-318.
- Liu J., Ekramoddoulla A. (2003). Isolation, genetic variation and expression of TIR-NBS-LRR resistance gene analogs from western white pine (*Pinus monticola* Dougl. ex D. Don.). *Molecular Genetics and Genomics*, 270: 432-441.
- Lizama G., Estrada I., Caamal M., Souza R., Oropeza C., Islas I., Zuñiga J. (2007). Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70: 130-141.
- López C., Zuluaga A., Cooke R., Delseny M., Tohme J., and Verdier V. (2003). Isolation of Resistance Gene Candidates (RGCs) and characterization of an RGC cluster in cassava. *Molecular Genetics and Genomics*, 269: 658-671.
- Mago R., Nair S. and Mohan M. (1999). Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(1-2): 50-57.
- Malamy J., Carr J., Klessig D., Raskin I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250: 1002-1004.
- Mandal S., Mallick N., Mitra A. (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 642-649.
- Martin G., Bogdanove A. and Sessa G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 54: 23-61.
- Martin G., Brommonschenkel S., Chunwongse J., Frary A., Ganai M., Spivey R., Wu T., Earle E. and Tanksley S. (1993). Map-based cloning of a protein Kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262: 1432-1436.

- Matus B., Espadas F., Talavera C., Aguilar M., Santamaría J., and Oropeza C. (2003). Changes in Carbohydrate Metabolism in Coconut Palms Infected with the Lethal Yellowing Phytoplasma. *Phytopathology*, 93: 976-981.
- McCoy R. E. (1972). Remission of lethal yellowing in coconut palms treated with tetracycline antibiotics. *Plant Disease Reporter*, 56: 1019-1021.
- McCoy R. E. (1973). Effect of various antibiotics on development of Lethal Yellowing in coconut palm. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 86: 503-506.
- McCoy R. E. (1974). Techniques for treatment of palm trees with antibiotics. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 87: 537-540.
- McCoy R. E., Norris R., Vieyra G., and Delgado S. (1982). México: lethal yellowing disease of coconut palm. *FAO Plant Protection Bulletin*, 30: 79-80.
- Métraux J., Signer H., Ryals J., Ward E., Wyss-Benz M., Gaudin J., Raschdorf K., Schmid E., Blum W., Inverardi B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, 250: 1004-1006.
- Meyers B., Dickerman A., Michelmore R., Sivaramakrishnan S., Sobral B. and Young N. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal*, 20: 317-332.
- Meyers B., Kozik A., Griego A., Kuang H. and Michelmore R. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15: 809-834.
- Monosi B., Wisser R.J., Pennill L. and Hulbert S. (2004). Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1434-1447.
- Morris S., Vernooij B., Titatarn S., Starrett M., Thomas S., Wiltse C., Frederiksen R., Bhandhufalck A., Hulbert S. and Uknes S. (1998). Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(7): 643-58.
- Mouradov A., Mouradova E., and Scott K. (1994). Gene family encoding basic pathogenesis-related 1 proteins in barley. *Plant Molecular Biology*, 26: 503-507.
- Nair R. and Thomas G. (2007). Isolation, characterization and expression studies of resistance gene candidates (RGCs) from *Zingiber* spp. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 123-134.
- Narváez C. M. (2010). Inducción de SAR en plantas de cocotero infectadas con *Phytophthora capsici*. Tesis de Maestría. Unidad de Biotecnología de cocotero. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Nic-Matos J. (2012). Estudio de la expresión del gen *CnNPR1* en plantas de cocotero tratadas con ácido salicílico Tesis de Maestría. Unidad de Biotecnología de cocotero. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

- Noir S., Combes M., Anthony F. and Lashermes P. (2001). Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). *Molecular Genetics and Genomics*, 265(4): 654-662.
- Ohler J. G. (1984). Coconut: Tree of life. Plant production and protection paper 57. FAO. Rome, Italy, 446 pp.
- Ohler J. (1999). Modern Coconut Management. Palm Cultivation and Products. FAO. Pag. Web <http://ecoport.org/>
- Oliveira D., Andrade M., Vilela L., and Vanusa M. (2008). Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection, in tomato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(8): 1017-1023.
- Ori N., Eshed Y., Paran I., Presting G., Aviv D., Tanksley S., Zamir D. and Fluhr R. (1997). The I2C family from the wilt disease resistance locus I2 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell*, 9(4): 521-532.
- Oropeza C. and Zizumbo-Villarreal D. (1997). The history of Lethal Yellowing in México, in International workshop on Lethal Yellowing-like diseases of coconut, Eden-Green S. y Ofori F. (editors). Elmina, Ghana, November, 69-76.
- Pan Q., Wendel J., Fluhr R. (2000). Divergent evolution of plant NBS LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 50(3): 203–213.
- Parthasarathy M., Van Slobbe W. and Soudant C. (1978). Hartrot or fatal wilt of palms. 1. Coconuts (*Cocos nucifera*). *Principes*, 22: 3-14.
- Peñuela S., Danesh D. and Young N. (2002). Targeted isolation, sequence analysis, and physical mapping of non-TIR NBS-LRR genes in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(2-3): 261-272.
- Pflieger S., Lefebvre V., Causse M. (2001). The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding*, 7: 275-291.
- Pieterse C. M., Leon-Reyes A., Van der Ent S. and Van Wees S. (2009). Networking by small molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5(5): 308-316.
- Pieterse C. M. and Van Loon L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science*, 4: 52–58.
- Pink D. A. (2002). Strategies using genes for non-durable resistance. *Euphytica*, 1: 227-236.

- Plocik A., Layden J. and Kesseli R. (2004). Comparative analysis of NBS domain sequences of NBS-LRR disease resistance genes from sunflower, lettuce and chicory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(1): 153-163.
- Puch-Hau C. (2012). Aislamiento e identificación de secuencias análogas a genes de resistencia en cocotero. Tesis de Maestría. Unidad de Biotecnología de cocotero. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Ranjini P., Shailasree S., Ramachandra K. and Shekar H. (2011). Isolation and characterization of a NBS-LRR resistance gene analogue from pearl millet. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(10): 1014–1024.
- Rasmussen JB., Hammerschmidt R., Zook MN. (1991). Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae*, pv *syringae*. *Plant physiology*, 97: 1342-1347.
- Rivkin M.I., Vallejos C.E. and McClean P.E. (1999). Disease-resistance related sequences in common bean. *Genome*, 42(1): 41-47.
- Rochon A., Boyle P., Wignes T., Fobert P. and Després C. (2006). The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of c-terminal cysteines. *Plant Cell*, 18: 3670-3685.
- Rohde W., Randles J., Langridge P. and Hanold D. (1990). Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. *Virology*, 176: 648-51.
- Rohilla R., Singh US., Singh RL. (2002). Mode of action of acibenzolar-S-methyl against sheath blight of rice, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Pest Manag. Science*, 58: 63–69.
- Ryals JA., Neuenschwander UH., Willits MG., Molina A., Steiner H. and Hunt M. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8: 1809–1819.
- Salmeron J., Oldroyd G., Rommens C., Scofield S., Kim H., Lavelle D., Dahlbeck D. and Staskawicz B. (1996). Tomato Prf Is a Member of the Leucine-Rich Repeat Class of Plant Disease Resistance Genes and Lies Embedded within the Pto Kinase Gene Cluster. *Cell*, 86(1): 123-133.
- Sánchez-Rojo S., López-Delgado H., Mora-Herrera M., Almeyda-León H., Zavaleta-Mancera H. and Espinosa-Victoria D. (2011). Salicylic Acid Protects Potato Plants from Phytoplasma-associated Stress and Improves Tuber Photosynthate Assimilation. *American Journal of Potato Research*, 88: 175–183.
- Saraste M., Sibbald P. and Wittinghofer A. (1990). The P-loop a common motif in ATP- and GTP binding proteins. *Trends in Biotechnology*. 15: 430–435.

- Schweizer P., Schlagenhauf E., Schaffrath U., Dudler R. (1999). Different patterns of host genes are induced in rice by *Pseudomonas syringae*, a biological inducer of resistance, and the chemical inducer benzothiadiazole (BTH). *European Journal of Plant Pathology*, 105: 659–665.
- Sekizawa Y., and Mase S. (1980). Recent progress in studies on non-fungicidal controlling agent Propanazole, with reference to the induced resistance mechanism of rice plant. *Journal of Plant Protection Research*, 13: 114-121.
- Shen K.A., Meyers B.C., Islam-Faridi M.N., Chin D., Stelly D.M. and Michelmore R.W. (1998). Resistance gene candidates identified by PCR with degenerate oligonucleotide primers map to clusters of resistance genes in lettuce. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 11(8): 815-823.
- Song W., Wang G., Chen L., Kim H., Pi L., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W., Zhu L., Fauquet C. and Ronald P. (1995). A receptor kinase-like protein encode by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*, 270: 1804-1806.
- Staskawicz B., Ausubel F., Baker B., Ellis J. and Jones J. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268: 661-667.
- Thirumalaiandi R, Selvaraj MG, Rajasekaran R and Subbarayalu M. (2008). Cloning and characterization of resistance gene analogs from underexploited plant species. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11: 1-11.
- Timmerman-Vaughan G., Frew T. and Weeden N. (2000). Characterization and linkage mapping of R-gene analogous DNA sequences in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101(1-2): 241-247.
- Totad A.S., Fakrudin B. and Kuruvinashetti M.S. (2005). Isolation and characterization of resistance gene analogs (RGAs) from sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Euphytica*, 143(1-2): 179-188.
- Traut T. (1994). The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide binding-sites. *European Journal of Biochemistry*, 222: 9-19.
- Tsuda K., Sato M., Glazebrook J., Cohen J.D. and Katagiri F. (2008). Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant Journal*, 53: 763–775.
- Uhl N. and Dransfield J. (1987). *Genero Palmarum: The L.H. Bailey Hortorium and International Palm Society*. Allen Press, Lawrence, Kansas, 1: 610 pp.
- Uppalapati SR., Ishiga Y., Wangdi T., Kunkel BN., Anand A., Mysore KS., Bender CL. (2007). The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20: 955–965.

- Vallélian-Bindschedler L., Metraux J., Schweizer P. (1998). Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defense-gene activation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 702–5.
- Van Der Biezen E., Freddie C., Kahn K., Parker J. and Jones J. (2002). *Arabidopsis* RPP4 is a member of the RPP5 multigene family of TIR-NB-LRR genes and confers downy mildew resistance through multiple signaling components. *Plant Journal*, 29: 439-451.
- Van der Vossen E., Jeroen N.A.M. van der Voort R., Kanyuka K., Bendahmane A., Sandbrink H., Baulcombe D., Bakker, Stiekema W. and Klein-Lankhorst R. (2000). Homologues of a single resistance-gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant Journal*, 23(5): 567-576.
- Van Loon L. and Van Kammen A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 40: 199–211.
- Van't Slot K. and Knogge W. (2002). A dual role for microbial pathogen-derived effector proteins in plant disease and resistance. *Critical Reviews in Plant Science*, 21: 229-271.
- Vlot A., Dempsey D., Klessig D. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 177-206.
- Walker J., Saraste M., Runswick M. and Gay N. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal*, 1(8): 945-951.
- Wan H., Yuan W., Ye Q., Wang R., Ruan M., Li Z., Zhou G., Yao Z., Zhao J., Liu S. and Yang Y. (2012). Analysis of TIR- and non-TIR-NBS-LRR disease resistance gene analogous in pepper: characterization, genetic variation, functional divergence and expression patterns. *BMC Genomics*, 13: 502.
- Ward E., Uknes S., Williams S., Dincher S., Wiederhold D., Alexander D., Ahl-Goy P., Metraux J. and Ryals J. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 3: 1085–1094.
- White R. (1979). Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, 99: 410-412.
- Whitham S., Dinesh-Kumar SP., Choi D., Hehl R., Corr C., Baker B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78(6): 1011-1015.
- Wildermuth M., Dewdney J., Wu G., Ausubel F. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414: 562–71.

-
- Witmer X., Nonogaki H., Beers E., Bradford K. and Welbaum G. (2003). Characterization of chitinase activity and gene expression in muskmelon seeds. *Seed Science Research*, 13: 167–178.
- Wu W., Ding Y., Wei W., Davis R., Lee I., Hammond R. and Zhao Y. (2012). Salicylic acid-mediated elicitation of tomato defence against infection by potato purple top phytoplasma. *Annals of Applied Biology*, 61(1): 36–45.
- Young N. (2000). The genetic architecture of resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 285–290.
- You-Xiong Q., Li-Ping X., Jian-Wei L. and Ru-Kai C. (2009). Isolation and Characterization of NBS-LRR Resistance Gene Analogs from Sugarcane. *Acta Agronomica Sinica*, 35: 631–639.
- Yu Y., Buss G. and Saghai Maroof M. (1996). Isolation of a super family of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21): 11751–11756.
- Zhang H., Wang Y., Zhang C., Wang X., Li H., Xu W. (2011). Isolation, characterization and expression analysis of resistance gene candidates in pear (*Pyrus* spp.). *Scientia Horticulturae*, 127: 282–289.
- Zhao J., Huang X., Chen Y., Chen Y. and Huang X. (2008). Molecular cloning and Characterization of an Ortholog of NPR1 Gene from Dongguan Dajiao (*Musa* spp.ABB). *Plant Molecular Biology Reports*, 27(3): 243–249.
- Zizumbo-Villarreal D. (1996). History of coconut (*Cocos nucifera* L.) in México. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43: 505–515.
- Zizumbo-Villarreal D. and Colunga-García M. (2001). Morpho-physiological variation and phenotypic plasticity in Mexican populations of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48: 547–554.
- Zizumbo-Villarreal D. and Piñero D. (1998). Pattern of morphological variation and diversity of *Cocos nucifera* (*Arecaceae*) in México. *American Journal of Botany*, 85: 855–865.
- Zizumbo-Villareal D., Colunga-García M., Fernández-Barrera M., Torres Hernández N. and Oropeza-Salín C. (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Plant Genetic Resources Newsletter*, FAO-Bioversity, 156: 23–33.
- Zizumbo-Villarreal D., Fernández-Barrera M., Torres-Hernández M., and Colunga-García M. (2005). Morphological variation of fruit in Mexican populations of *Cocos nucifera* L. (*Arecaceae*) under *in situ* and *ex situ* conditions. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 419–432.

CAPITULO II

DESARROLLO DE UN PROTOCOLO PARA EL ANÁLISIS CUANTITATIVO POR PCR EN TIEMPO REAL DE TRES CANDIDATOS A GENES DE RESISTENCIA AISLADOS DE COCOTERO.

2.1 INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es uno de los cultivos importantes en las zonas tropicales, donde sirve como alimento, en la construcción de casas, elaboración de utensilios de uso local y elaboración de productos industriales, tales como el aceite de coco, la copra y el coco desecado entre otros, los cuales, desempeñan un papel importante en la economía de muchos países en desarrollo. Además, son componentes importantes del paisaje, lo que contribuye a la belleza estética de muchas de las islas donde el turismo juega un papel clave en la economía (Granados y López, 2002; Kairo *et al.*, 2001; Martin y Watson, 1998; Pollard, 1995; Barrow, 1991). Es un miembro de la familia de monocotiledóneas *Arecaceae* (*Palmaceae*). Es la única especie del género *Cocos* del que pertenece a la subfamilia *Cocoideae* que incluye 27 géneros y 600 especies (Teulat *et al.*, 2000). El cultivo de cocotero está ampliamente distribuido en el mundo y posee un alto valor económico. La producción mundial, se estima en 40 billones de nueces, principalmente para la producción de aceite (Harries, 1995). La producción mundial de cocotero en 2007 fue de 61 mil toneladas entre los tres principales países productores, Indonesia, Filipinas y la India, esto es el 75% sobre la producción total (FAO, 2009).

A pesar de la importancia económica del cocotero como cultivo, en el Caribe ha disminuido con el paso de los años. Esto debido principalmente a escasas prácticas de cultivo, plantaciones viejas, plagas y enfermedades. Una de las principales enfermedades que ha devastado gran cantidad de hectáreas de cocotero, en países tales como Jamaica, Cuba, Islas Caimán, Estados Unidos, México, Belice, Honduras, Guatemala y República Dominicana es el Amarillamiento Letal (Harrison y Oropeza, 2008). Esta enfermedad es causada por fitoplasmas (Beakbane *et al.*, 1972; McCoy, 1972).

Ante esta problemática surge la necesidad de estudiar los mecanismos de defensa en este cultivo, y este conocimiento serviría de base para el desarrollo de nuevas tecnologías con el fin de hacer frente a los patógenos que lo afectan. Los genes de resistencia (*R*) son componentes importantes en el mecanismo de defensa de las plantas, que se expresan al detectar invasores patogénicos provocando una respuesta que puede evitar la infección (Jungeun *et al.*, 2012; Dangl y Jones, 2001; Flor, 1971). Varios genes que confieren resistencia a un amplio grupo de patógenos que incluyen bacterias, virus, hongos, oomicetos y nemátodos ya han sido clonados de diferentes especies de plantas (McHale *et al.*, 2006). En años recientes la clase más abundante en plantas, los genes de tipo NBS-LRR, han sido extensamente investigados en diferentes especies (Wan *et al.*, 2012), entre ellas el cocotero (Puch-Hau, 2012). Esta clase de genes se puede dividir en dos subfamilias de acuerdo a las características de su extremo N-terminal en TIR-NBS-LRR (dicotiledóneas) y no-TIR-NBS-LRR (monocotiledóneas) (Yue *et al.*, 2012; Dangl y Jones, 2001). Hasta la fecha se han identificado en plantas ocho motivos conservados del dominio NBS de los genes *R* que incluyen: P-loop, cinasa-2, cinasa-3a, GLPL, RNBS-A-TIR, RNBS-D-TIR, RNBS-A-no-TIR y RNBS-D-no-TIR (Yue *et al.*, 2012). En base a estos dominios conservados se han obtenido por medio de PCR candidatos a genes de resistencia (RGCs) en varias especies vegetales de interés comercial (Thirumalaiandi *et al.*, 2008). Los RGCs proveen información valiosa de secuencias para aplicar el enfoque de genes candidatos y clonar genes *R* completos (Pflieger *et al.*, 2001). Esta estrategia ha revelado ser muy útil como primer paso hacia la identificación de genes de resistencia.

La PCR en tiempo real puede generar amplicones muy pequeños (desde 60 pb) lo que la hace ideal para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas o experimentales, así como para la cuantificación de niveles de ARNm en muestras de tejidos (Bustin, 2002). Por otro lado, la optimización de la PCR es un parámetro importante para la correcta cuantificación de los niveles de expresión (Bustin, 2003).

En el presente capítulo se llevó a cabo el desarrollo de un protocolo para optimizar las condiciones de amplificación para la reacción de PCR en tiempo real de los diferentes juegos de iniciadores para cada gen, ya que estos parámetros son importantes para poder determinar si se puede o no cuantificar la expresión.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Selección de las secuencias de RGCs aisladas de cocotero

Para el desarrollo del presente trabajo se seleccionaron secuencias de candidatos a genes de resistencia o RGCs (cuadro 2.1), la selección se hizo partiendo del trabajo de Puch-Hau (2012) del cual se tomaron tres secuencias que corresponden a RGCs representativos de clados distintos y que presentan homología con genes de resistencia ya reportados en la literatura. Estos RGCs fueron nombrados como *CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10*. Las secuencias de estos RGCs corresponden al ecotipo alto del Pacífico que se sabe presenta mayor porcentaje de resistencia a la enfermedad del AL.

2.2.2 Alineamiento y diseño de iniciadores

Para llevar a cabo los ensayos de optimización y posterior análisis de expresión de los tres genes RGCs, se diseñaron iniciadores específicos (cuadro 2.3) para cada una de las secuencias. El alineamiento se realizó empleando el programa ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) y posteriormente, con el programa Boxshade v.3.21, se sombreadon las regiones conservadas con la finalidad de conocer las zonas donde se tiene un mayor porcentaje de divergencia entre las secuencias (figura 2.1) para asegurar de esta forma especificidad en la amplificación. Con base a bibliografía consultada y partiendo de regiones no conservadas, se diseñaron los iniciadores específicos con el programa Primer3Plus, a partir de las tres secuencias candidatas a genes de resistencia seleccionadas. Después de haber agregado las características deseadas, el programa nos indicó todos los posibles pares de iniciadores que se pueden formar, junto con el tamaño del amplicón esperado para cada par, que van desde los 192 a los 284 pb; cabe señalar que estos iniciadores fueron analizados en el BLAST para comprobar su identidad con algunas secuencias RGC. Se generaron cuatro iniciadores para cada secuencia (2 sentido y 2 antisentido); los iniciadores fueron de 23-28 nucleótidos, contenido de GC del 50-70% y $T_m \geq 65$ °C, con los cuales se realizaron los análisis de expresión.

2.2.3 Optimización de la técnica de PCR en tiempo real

Para establecer las condiciones óptimas de amplificación de PCR en tiempo real, se realizó lo siguiente: **A)**. Determinar la temperatura de hibridación. Para ello, se probó un gradiente de diferentes temperaturas de hibridación (58 a 64 °C). **B)**. Determinar el par de iniciadores adecuado. Se probaron las combinaciones de iniciadores para poder elegir la que genere una mejor amplificación, sin generar productos inespecíficos. **C)**. Determinar la concentración óptima de los iniciadores. Se probaron concentraciones de entre 0.5 a 2 μM para utilizar la que dio los mejores resultados de amplificación. **D)**. Evaluación de la eficiencia y linealidad. Se realizó para probar la reproducibilidad de los ensayos y determinar si se puede o no cuantificar la expresión de los genes.

2.2.4 Amplificación por PCR en tiempo real

La amplificación se realizó en un termociclador BIO-RAD C1000 con el sistema en tiempo real CFX96[®] y con la mezcla SsoFast™ EvaGreen[®] Supermix de Bio-Rad, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para establecer el protocolo de amplificación se probaron cuatro temperaturas (58, 60, 62 y 64°C) y el protocolo quedó de la siguiente manera: 1 ciclo a 95°C por 2 min; 35 ciclos a 95°C por 15 segundos y gradiente de 58-64°C por 30 segundos. Al final se incluyó el ciclo de desnaturalización o curva de disociación (Melt Curve) para detectar productos inespecíficos (dímeros de iniciadores, amplificaciones no específicas, etc.). Para llevar a cabo la mezcla de reacción se utilizó 2 μL del ADN, 0.75 μL por cada iniciador (sentido y antisentido) a 0.3 μM , 10 μL de la mezcla SsoFast™ EvaGreen[®] Supermix y la mezcla se completó con 11.5 μL de agua ultrapura para tener un volumen final de 25 μL en cada tubo.

2.2.5 Determinación de la eficiencia y linealidad de la PCR en tiempo real

La eficiencia de la PCR es un número que muestra el aumento (en veces) en la cantidad de los fragmentos de ADN amplificados que tienen lugar durante un ciclo (Bustin, 2003). Estos parámetros son importantes para poder determinar si se puede o no cuantificar la expresión de un gen. La eficiencia de la amplificación se determinó mediante la ejecución de PCR en tiempo real con una serie de diluciones (5^{-1} , 5^{-2} , 5^{-3} , 5^{-4}) de ADN genómico. Posteriormente se tomaron los valores de Ct para graficar la linealidad (Peirson *et al.*, 2003; Rutledge y Cote, 2003; Stahlberg *et al.*, 2003; Pfaffl, 2001; Rasmussen, 2001). La eficiencia fue calculada a partir de la pendiente de la curva estándar en base a la fórmula: $E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1 \times 100$ (Bustin y Nolan, 2004). Para llevar a cabo la mezcla de reacción se utilizaron 2 μL del ADN, 0.75 μL por cada iniciador (sentido y antisentido) a 0.3 μM , 10 μL de la mezcla SsoFast™ EvaGreen® Supermix y la mezcla se completó con 11.5 μL de agua ultrapura para tener un volumen final de 25 μL en cada tubo. Las condiciones de amplificación se muestran en la figura 2.2.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Selección, alineamiento y diseño de iniciadores de los RGCs

En cocotero se aislaron 162 secuencias RGCs de tipo NBS-LRR de los ecotipos alto del Pacífico y enano malayo amarillo (ambos resistentes al AL) y alto del Atlántico (susceptible al AL), de los cuales 139 presentaron marco de lectura abierto. Estas secuencias pertenecen a la familia non-TIR-NBS-LRR y se clasificaron en 29 grupos según su homología con genes de resistencia aislados en otras especies vegetales. Estas secuencias, en base a diferentes criterios, fueron agrupadas en 11 clados distintos (datos no publicados) de los cuales se tomaron tres secuencias representativas (cuadro 2.1) de clados diferentes, que presentaron homología con genes de resistencia reportados en la literatura, estos RGCs fueron nombrados *CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10*. En el cuadro 2.2 se muestra la homología de las secuencias con genes de resistencia conocidos.

Cuadro 2.1 Secuencias de nucleótidos de los RGC seleccionados.

CnRGC4

GGAAGAAGCAGCAATAGCGGAAGCAGTCCGTAATGATGCGACAGATCTCCGAACTGAGCTCCAATACATTTCTTA
CCCTTTCCGGACATTGGCATTITAGTCTCTCCCAATCGAGGCCCTCAAAGAATTCCTCCATTCCAACCTTCTCTCTCTC
GGTAGCAGCAGCGAGCTTCTGCGGCCACAATAGCTAGAGGCCAAGCCGTGGCACCTCTGCAAGATTTTCTAGCCCAGT
ACTCTAGATCTGAAGGACAACCTTCTGCTTATATTTCCAGAATGCTTTATTGCAGAAGAGAATCCATGAGTCACCCCTCT
GCAGAGGCTGCAGCTCCAGAACACGGCTTCAACTGCTAGGTAAGCTACATCATGATTCCGGGTTGTTATGACAATCCT
ACTTCCACATTTATTATCTACCAGCACTGGACTTAATTCATCAAACCAACCATTATGTGCCACATATCATCTAGGACGAT
AAGATACCTCTTTTGCAGAAATAACCATGAAGTACCTCCGCCAAACTGTCGCAAGGCATTGCGTCAATATTTCTGGAA
GAATATCACGATTTTCAATTGTAGAGGTCTTTATGAGTCTTCTCATTAGATCTTCGGCTGTATTTCTGGGTGACACGTA
CCCATGCTCTGTGATCAAAATGTCGCCTGGCTTCTGGCTCTGTAGACATCATTGACGAGAGTCGTCTTCCCCCCCC
CCCCATCCCA

CnRGC5

GGGAAGAGGCTGCAATAGAGAAAGCACTGTTTGAGATCGGAAGATAAATCATCATAACTCAAAAATAAAGCTCCTGGGA
GCTCTTTGTCAAGTTGCTCATAGACCATACTCGCTTTTGAGAACCTTGTCCATTCTAGGTTGCTTCTCTCCTTCGACC
TTAAAACCCCTGCAATGACTTTGATAGCGAGAGGAAGACCGTCACATTTTTCAACAATTTGAACCCCGATTTCTTTAACC
TAGAGATCTCCTCCTCCTCATCATCATCTTCAAGACATTCTTGTGGAGCAATTTCCAGCAACTGTCATTATCCATTT
TATCGACTTGGTGGATCTTCGCTCTAATATTGCTAGCAACGTTTGTATGTCGAGTGGTAATCAGAATCTTCCAGTAGCT
GCTGCATTTTCAATGGCATACTAAGCAATTTCTCCATACATCTTCTCCATACATCATCTAATAACAATAAAGAATCTTT
TTGAAAGTATAGAAGAAAGACGGGTACGAGCTCTGCCTTAGTTTCAGCCTCCCCATTTTTCCACCTGCATCCCTAAT
ATATCTTTGACAAATCTGTTTCTGAAAAGTCTGAGAAACACATGCCCATACCCGTATAGGAAAGTTATTTTTATAGTTT
CATGGTTGATATCCTAGAAGCAAGGGTCTTCCCCCCCCCCCCATCCCA

CnRGC10

GGGAAGAGGGAACAGTAGCGGAAGCATGTTTGAGATGTGTTGGCATCCAATGATAGCTCAGCTTCAGAGCAGGCAAA
ATATCATCTTCTTGTTCATCTAGCTCCCACAGATCACTCTGCAAGATATCCTCCACCTCTCCTCAGCTGTTTGAAGCGT
AGAAGGCCACCAAGGGTTTTCAAAGCCAATGGCAAGCCATTACACTTCTGACAACTTCTTCCCAATTTCTACCAAAT
TGGATGTTCTTTGGGTTCTAGACCATCAAATGCACTCTGTTCAAATAACAACCAACTTTGGTCTTCTGGTAAACAGTCAAG
GTGATAGGGGAGAAGTGTCTGCATGATCCTCGCCACAGATTCAATTACGAGTAGTAACTATAATTTTACACCATCCTCCAC
CTGTCAAGGCCACTCTGAAGTTATCCCAGAGGTTTAGTTTCTCATTCCAACGTCATCCAATACAAGCAATAACTTCTTTC
CTTTCAATTCCTCCTCAGGGCTTGTGAAGTGCATTAAGTTCTGTCAGCTCACAAGGTTCTTTGAGACTGATTGTATGA
TTGCTTACATAACCTGACTACATCAAAATCTAGTGAGACATTGACCCATGCCATTAATTTGAAATATTGGCAGACTCTTG
AATCATTGTAACAAGTCGGACAAGGGTCTTTTTCCCCCCCCCCCCATCCCA

Cuadro 2.2 Secuencias RGCs seleccionadas y su homología con genes de resistencia.

Clados	Proteína R	Patógeno	Tipo de patógeno	Enfermedad	Planta	Referencia
CnRGC4	RPM1	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	Tizón bacteriano	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Salanoubat <i>et al.</i> , 2000
	Pid3	<i>Magnaporthe grisea</i>	Hongo	Añublo del arroz	<i>Oryza sativa</i>	Shang <i>et al.</i> , 2009
	RXO1	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Bacteria	Rayado bacteriano	<i>Zea mays</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2005
CnRGC5	BPH14	<i>Nilaparvata lugens</i>	Insecto	Plaga	<i>Oryza sativa</i>	Du <i>et al.</i> , 2009
	Pm3	<i>Blumeria graminis</i>	Hongo	Moho polvoroso	<i>Triticum aestivum</i>	Yahiaoui <i>et al.</i> , 2004
	Pi36	<i>Magnaporthe grisea</i>	Hongo	Añublo del arroz	<i>Oryza sativa</i>	Liu <i>et al.</i> , 2007
	Pit	<i>Magnaporthe grisea</i>	Hongo	Añublo del arroz	<i>Oryza sativa</i>	Hayashi <i>et al.</i> , 2009
CnRGC10	RPG1-B	<i>Microsphaera sparsa</i>	Hongo	Moho polvoroso	<i>Hordeum vulgare</i>	Ashfield <i>et al.</i> , 2004
	Rdg2a	<i>Pyrenophora graminea</i>	Hongo	Estriado de la cebada	<i>Hordeum vulgare</i>	Bulgarelli <i>et al.</i> , 2010

Para diseñar los iniciadores específicos para cada gen, primeramente, con el programa clustalX se realizó el alineamiento de nucleótidos de una secuencia representativa de cada uno de los 11 clados del trabajo de Puch-Hau (datos no publicados). Posteriormente con el programa Boxshade v.3.21 se llevó a cabo el sombreado (figura 2.1) de las regiones conservadas, que a la vez, nos permitió también identificar los sitios que son divergentes e ideales para el diseño de los iniciadores específicos.



Figura 2.1 Imagen representativa del alineamiento de las secuencias de nucleótidos para el diseño de los iniciadores. Las regiones sombreadas de negro representan los sitios conservados y los cuadros verdes señalan las regiones divergentes en las cuales se diseñaron los iniciadores.

La secuencia de nucleótidos de los tres clados elegidos fue sometida al programa Primer3Plus de acuerdo a las condiciones consultadas en la literatura para el diseño de los iniciadores (cuadro 2.3) y los que flanquearon las regiones divergentes fueron seleccionados para los estudios de expresión.

Cuadro 2.3 Iniciadores específicos diseñados a partir de secuencias RGC de cocotero.

Clado	Secuencia	Tamaño (bases)	Tamaño del Amplicón
CnRGC4	F1 (sentido) 5'-CTTTCGGACATTGGCATTTTAGTC-3'	24	192 a 284 pb
	R1 (antisentido) 5'-CTAGCAGTTGAAAGCCGTGTTCTGG-3'	25	
	F2 (sentido) 5'-CCTTTCGGACATTGGCATTTTAGTC-3'	25	
	R2 (antisentido) 5'-TAGCAGTTGAAAGCCGTGTTCTG-3'	23	
	F1 (sentido) 5'-TTGCTTCTCTCCTTCGACCTTAAAACC-3'	27	
	R1 (antisentido) 5'-TATTAGAGCGAAGATCCACCAAGTC-3'	25	
CnRGC5	F2 (sentido) 5'-TTCTAGGTTGCTTCTCTCCTTCGACCT-3'	27	
	R2 (antisentido) 5'-CAATATTAGAGCGAAGATCCACCAAGTC-3'	28	
	F1 (sentido) 5'-TCCCACCTCTCCTCAGCTGTTTC-3'	23	
	R1 (antisentido) 5'-CCTTGACTGTTTACCAGAAGACCA-3'	24	
	F2 (sentido) 5'-CCTCCCACCTCTCCTCAGCTGTTTC-3'	25	
	R2 (antisentido) 5'-ATCACCTTGACTGTTTACCAGAAGACCA-3'	28	

2.3.2 Optimización de las condiciones de amplificación por PCR en tiempo real

Para obtener resultados confiables en las pruebas realizadas con la PCR en tiempo real fue necesario optimizar la reacción en el laboratorio. La optimización consistió en hacer que las variaciones normales de la prueba no causen efectos importantes en los valores Ct y que tengan un impacto mínimo en la cantidad de fluorescencia observada. Los criterios más importantes para la optimización son la especificidad, sensibilidad, eficiencia y reproducibilidad de la PCR en tiempo real (Edwards, 2004).

Para llevar a cabo la optimización de las condiciones de amplificación por PCR, se probaron cuatro diferentes temperaturas de hibridación para cada uno de los iniciadores. La selección del gradiente de temperaturas probadas fue hecha de acuerdo a la temperatura de hibridación a la que se diseñaron los iniciadores, las temperaturas probadas fueron: 58, 60, 62 y 64°C; como producto de amplificación inicial se empleó ADN genómico de palma de cocotero alto del Pacífico (AP). Los datos obtenidos mostraron que no hay diferencia significativa entre las temperaturas de hibridación, en todas las temperaturas probadas amplificó el ADN, no se tuvo amplificación de los productos negativos y no se observó la presencia de dímeros. Sin embargo, se decidió trabajar con la temperatura de 64°C ya que a mayor temperatura es posible obtener mayor especificidad en la amplificación. Finalmente las condiciones de amplificación (figura 2.2) quedaron establecidas como sigue: 1 ciclo a 95°C por 2 min; 35 ciclos a 95°C por 15 segundos y 64°C por 30 segundos; el paso final corresponde al análisis de la curva de desnaturalización (Melt Curve) para detectar productos inespecíficos. En la figura 2.3 se puede observar la gráfica obtenida como resultado del gradiente realizado.

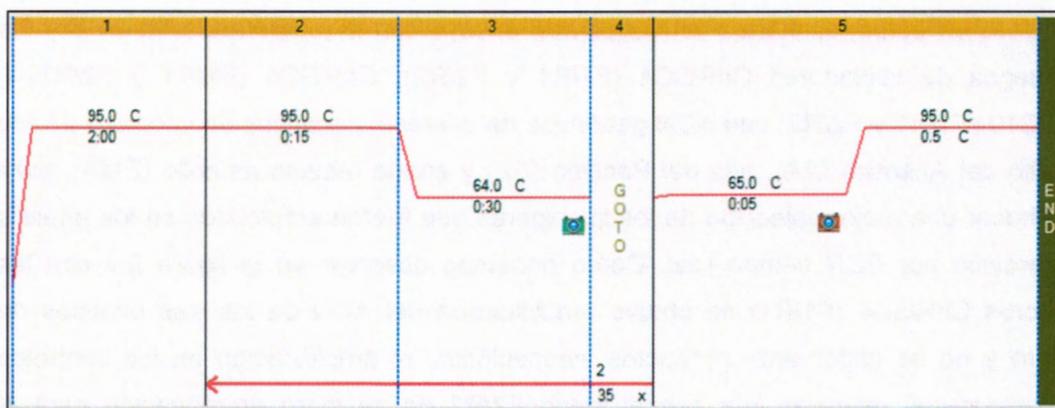


Figura 2.2 Protocolo establecido para la amplificación por PCR en tiempo real.

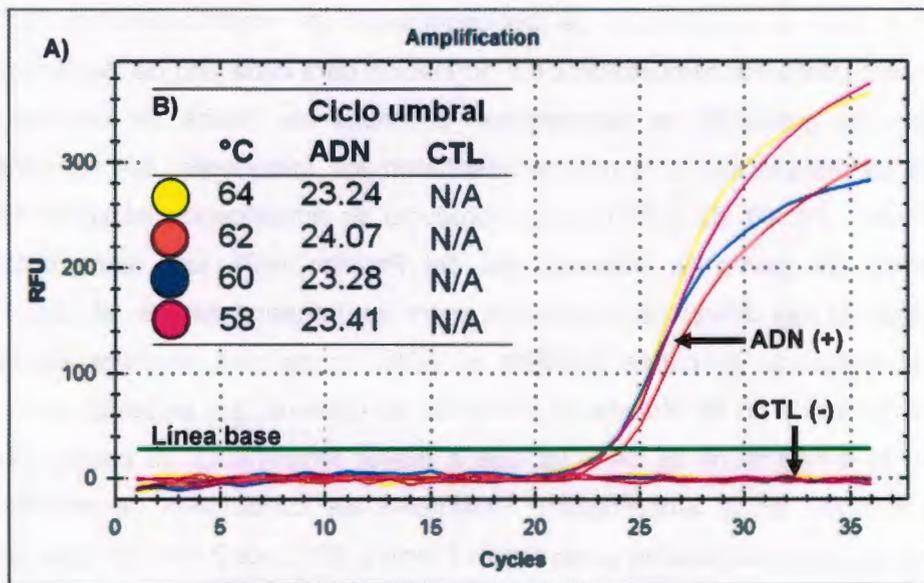


Figura 2.3 Resultado del gradiente realizado para determinar la temperatura óptima de alineamiento de los iniciadores. A). Gráfica de la amplificación por PCR en tiempo real. B). Ciclo umbral (Ct) de cada temperatura probada, los círculos de colores señalan las temperaturas, el Ct y su correspondiente resultado en la gráfica.

Basándose en estos resultados se realizó otro ensayo con la temperatura de 64°C y los seis juegos de iniciadores CnRGC4 (F1/R1 y F2/R2), CnRGC5 (F1/R1 y F2/R2) y CnRGC10 (F1/R1 y F2/R2) con ADN genómico de diferentes ecotipos de cocotero diluido 1:10 alto del Atlántico (AA), alto del Pacífico (AP) y enano malayo amarillo (EMA), para poder hacer una mejor selección de los iniciadores que fueron empleados en los análisis de expresión por PCR tiempo real. Como podemos observar en la figura 2.4 con los iniciadores CnRGC4 (F1/R1) se obtuvo amplificación del ADN de los tres ecotipos de cocotero y no se observaron productos inespecíficos, ni amplificación en los controles (CTL) negativos, mientras que con el juego F2/R2 no se logró amplificación para el ecotipo AP, y para el ecotipo AA el Ct fue muy tardío. En la figura 2.5 observamos que para los iniciadores CnRGC5 (ambos juegos) se obtuvo amplificación en todas las muestras de ADN y en la curva de desnaturalización no se presentaron dímeros, ni amplificación en los negativos. En la figura 2.6 se muestra que para los iniciadores CnRGC10 (ambos juegos) de igual forma se obtuvo amplificación de los tres tipos diferentes de ADN, las curvas de desnaturalización presentaron un sólo pico confirmando la amplificación de un solo producto y no hay amplificación en los controles negativos. En

los tres casos los iniciadores que dieron mejores resultados fueron los del grupo F1/R1, ya que presentaron un Ciclo umbral más temprano. Para llevar a cabo la mezcla de reacción se utilizó 2 μL del ADN, 0.75 μL por cada iniciador (sentido y antisentido) a 0.3 μM , 10 μL de la mezcla SsoFast™ EvaGreen® Supermix y la mezcla se completó con 11.5 μL de agua ultrapura para tener un volumen final de 25 μL en cada tubo.

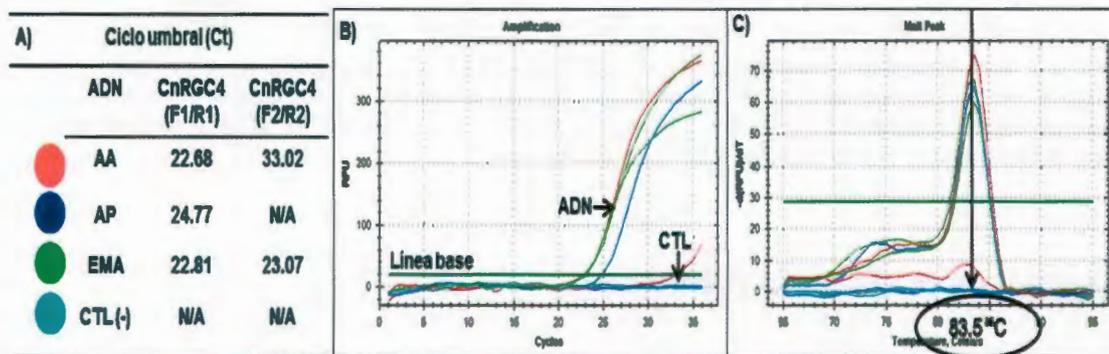


Figura 2.4 Resultados de la amplificación de ADN genómico con los dos juegos de iniciadores CnRGC4. A). Ciclo umbral (Ct) de la amplificación. B). Curvas de amplificación del ADN. C). Curvas de desnaturalización de los productos amplificados. Los círculos de colores señalan cada ecotipo y su correspondiente resultado en las gráficas.

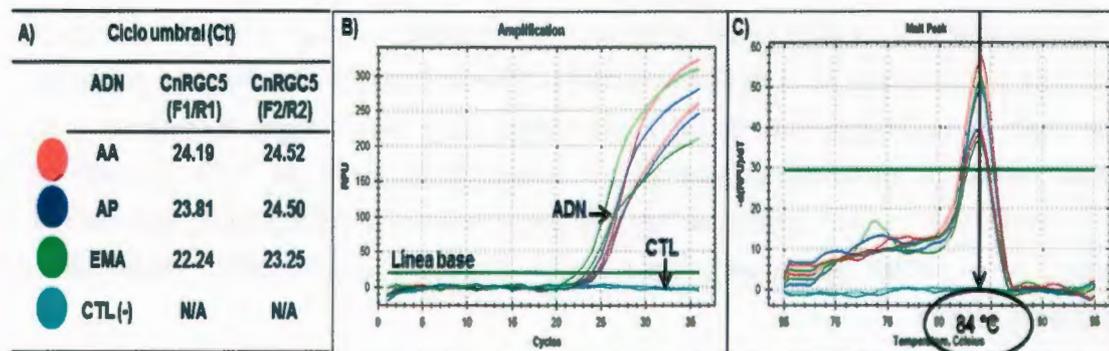


Figura 2.5 Resultados de la amplificación de ADN genómico con los dos juegos de iniciadores CnRGC5. A). Ciclo umbral (Ct) de la amplificación. B). Curvas de amplificación del ADN. C). Curvas de desnaturalización de los productos amplificados. Los círculos de colores señalan cada ecotipo y su correspondiente resultado en las gráficas.

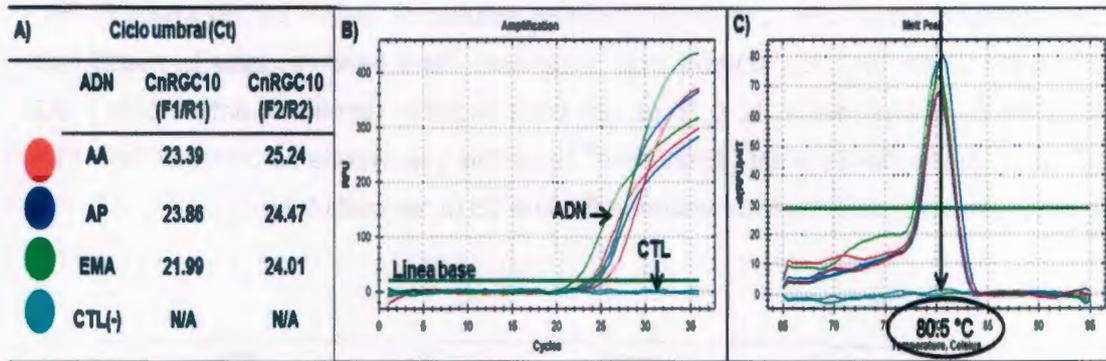


Figura 2.6 Resultados de la amplificación de ADN genómico con los dos juegos de iniciadores CnRGC10. A). Ciclo umbral (Ct) de la amplificación. B). Curvas de amplificación del ADN. C). Curvas de desnaturalización de los productos amplificados. Los círculos de colores señalan cada ecotipo y su correspondiente resultado en las gráficas.

2.3.3 Ensayos de eficiencia y linealidad

Una vez que quedaron establecidas las condiciones para una buena amplificación por PCR en tiempo real, se procedió a realizar ensayos con ADN genómico de palma de cocotero del ecotipo AP; para poder evaluar la eficiencia y linealidad de los iniciadores CnRGC4, CnRGC5 y CnRGC10 en los tres casos del grupo F1/R1 ya que son los que presentaron mejores resultados en ensayos anteriores. La eficiencia y linealidad son parámetros importantes para poder determinar si se puede o no cuantificar la expresión de un gen. La eficiencia de la PCR es un número que muestra el aumento (en veces) en la cantidad de los fragmentos de ADN amplificados que tienen lugar durante un ciclo (Bustin, 2003). La eficiencia se determinó mediante la ejecución de PCR en serie de diluciones de ADN, posteriormente se tomaron los valores de Ct para graficar la linealidad (Peirson *et al.*, 2003; Rutledge y Cote, 2003; Stahlberg *et al.*, 2003; Pfaffl, 2001; Rasmussen, 2001).

En un primer ensayo se realizó una serie de diluciones de ADN genómico (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) y no se logró obtener una buena eficiencia, ni linealidad en la amplificación con ninguno de los iniciadores (CnRGC4, CnRGC5 y CnRGC10), por lo que fue necesario realizar un segundo ensayo. Para el segundo ensayo de igual forma se hizo una serie de diluciones logarítmicas de ADN genómico (5^{-1} , 5^{-2} , 5^{-3} , 5^{-4}) para determinar la eficiencia de

la amplificación. También se pudo determinar que para tener una mejor amplificación es necesario diluir el ADN ya que el ADN del stock no amplifica. Cabe señalar que tanto el primero como el segundo ensayo se realizaron por triplicado. La eficiencia fue calculada a partir de la pendiente de la curva estándar en base a la fórmula: $E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1 \times 100$ (Bustin y Nolan, 2004). La eficiencia de la PCR debe ser de 90-110% aproximadamente, la pendiente ideal de -3.32 y el coeficiente de correlación $R^2 > 0.999$. Diversos factores pueden afectar la eficiencia como el largo del amplicón, la estructura secundaria y el diseño de los iniciadores (Bustin *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en el segundo ensayo para los iniciadores del gen CnRGC4 (figura 2.7) en la curva estándar mostraron un coeficiente de regresión lineal (R^2) de 0.993, una eficiencia (%E) del 90.7% y el valor de la pendiente (y) fue de -3.56. Para el caso de los iniciadores CnRGC5 (figura 2.8) los resultados obtenidos en la curva estándar mostraron un coeficiente de regresión lineal (R^2) de 0.994, una eficiencia (%E) del 94.2% y el valor de la pendiente (y) fue de -3.47. Con los iniciadores CnRGC10 (figura 2.9) los resultados obtenidos en la curva estándar mostraron un coeficiente de regresión lineal (R^2) de 0.994, una eficiencia (%E) del 99.7% y el valor de la pendiente (y) fue de -3.33.

En los tres casos se observó una buena correlación entre las curvas de amplificación de las diluciones logarítmicas (5^{-1} , 5^{-2} , 5^{-3} , 5^{-4}) las cuales dieron un valor de Ct cada 1.5 ciclos aproximadamente y fueron graficadas para obtener la curva estándar. No se tuvo amplificación en los controles negativos (CTL). Estos datos mostraron que los iniciadores si son funcionales para llevar a cabo los ensayos de expresión de los genes estudiados.

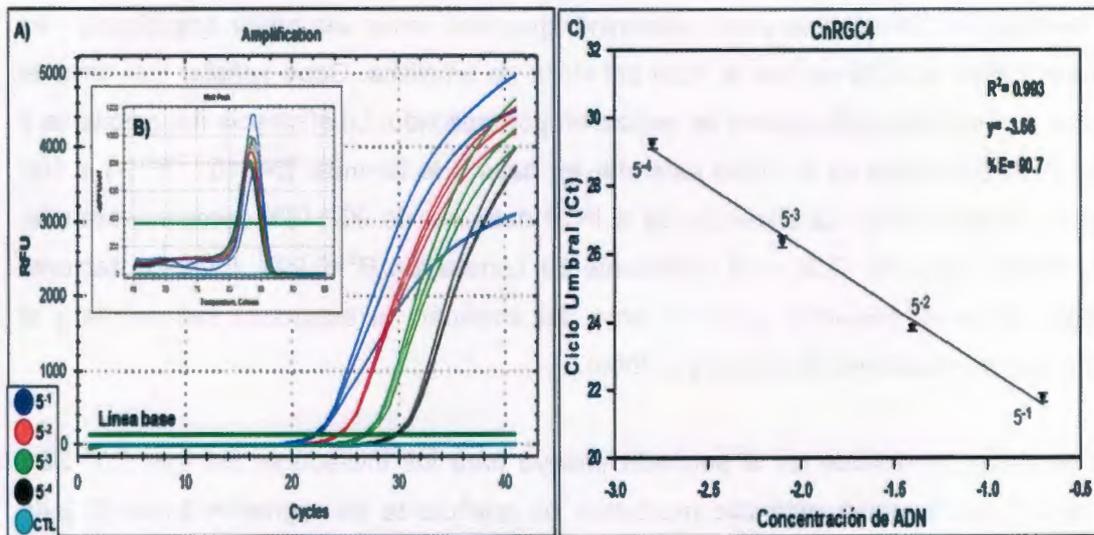


Figura 2.7 Evaluación de la eficiencia y linealidad de los iniciadores CnRGC4. A). Amplificación del ADN con diferentes grados de dilución. B). Curvas de desnaturalización sin presencia de dímeros en los productos amplificados. C). Curva estándar en la que se observan los valores del coeficiente de correlación (R^2) de 0.993, la pendiente (y) de -3.56 y la eficiencia (%E) del 90.7%. Los círculos de colores señalan las diluciones que van de 5⁻¹ a 5⁻⁴ y el control negativo (CTL).

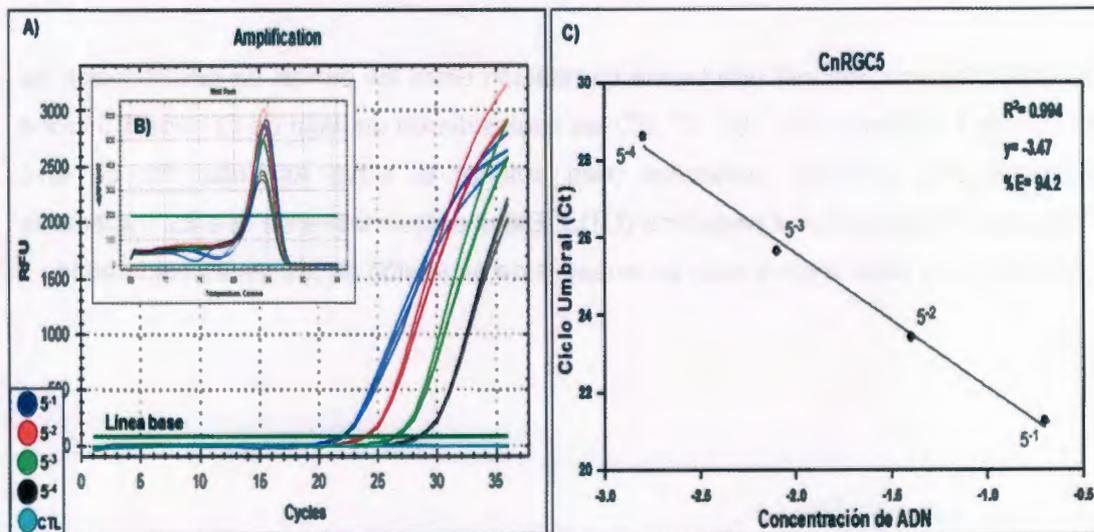


Figura 2.8 Evaluación de la eficiencia y linealidad de los iniciadores CnRGC5. A). Amplificación del ADN con diferentes grados de dilución. B). Curvas de desnaturalización sin presencia de dímeros en los productos amplificados. C). Curva estándar en la que se observan los valores del coeficiente de correlación (R^2) de 0.994, la pendiente (y) de -3.47 y la eficiencia (%E) 94.2%. Los círculos de colores señalan las diluciones que van de 5⁻¹ a 5⁻⁴ y el control negativo (CTL).

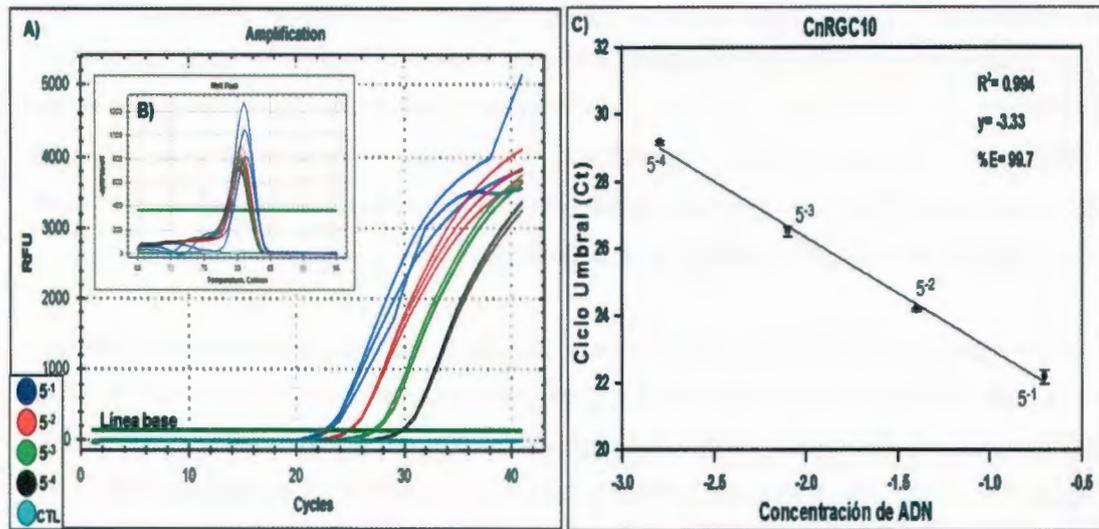


Figura 2.9 Evaluación de la eficiencia y linealidad de los iniciadores CnRGC10. A). Amplificación del ADN con diferentes grados de dilución. B). Curvas de desnaturalización sin presencia de dímeros en los productos amplificados. C). Curva estándar en la que se observan los valores del coeficiente de correlación (R^2) de 0.994, la pendiente (y) de -3.33 y la eficiencia (%E) del 99.7%. Los círculos de colores señalan las diluciones que van de 5^{-1} a 5^{-4} y el control negativo (CTL).

2.4 DISCUSIÓN

El análisis de la expresión génica, al ser un proceso molecular, implica una serie de técnicas, las cuales deben ser estrictamente desarrolladas y optimizadas, puesto que el manejo de la PCR en tiempo real es un proceso muy sensible y requiere de una alta precisión. Este proceso incluye técnicas como la extracción y cuantificación del ARN, la eliminación del ADN contaminante, la síntesis del ADNc y la PCR en tiempo real. La PCR fue considerada como una revolución en la ciencia desde su invención (Deepak, *et al.*, 2007; Schaad y Frederick, 2002). A partir de allí y hasta el día de hoy la PCR ha experimentado grandes avances, dentro de los cuales, la PCR en tiempo real constituye uno de los más importantes. Las aplicaciones de esta técnica abarcan desde la detección temprana de patógenos, estudios de discriminación alélica e identificación de genotipos, cuantificación de ADN o ARN mensajero de una muestra, hasta los estudios de análisis de expresión de genes (Deepak, *et al.*, 2007).

En este capítulo se llevó a cabo la optimización de las condiciones de amplificación por PCR en tiempo real, ya que para proceder con los estudios de expresión de los tres RGC seleccionados, fue necesario realizar una correcta optimización que nos indicara la posibilidad de poder cuantificar la expresión de los genes por PCR en tiempo real. Los criterios más importantes para la optimización son la especificidad, sensibilidad, eficiencia y reproducibilidad de la PCR en tiempo real (Edwards, 2004).

En cocotero, para llevar a cabo el primer estudio realizado sobre la expresión de genes se seleccionaron tres secuencias candidatas a genes de resistencia que se eligieron de entre 162 secuencias ya reportadas (Puch-Hau, no publicado), estas secuencias presentaron homología con genes de resistencia ya caracterizados y que se encuentran reportados en la literatura (Bulgarelli *et al.*, 2010; Du *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2005), las secuencias corresponden al ecotipo alto del Pacífico que se sabe presenta mayor porcentaje de resistencia a la enfermedad del AL y fueron nombradas como *CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10*. Se empleó el programa ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) para los alineamientos y el programa Boxshade v.3.21 para el sombreado de las regiones conservadas que nos permitieron, en base a bibliografía consultada y a partir de regiones no conservadas, diseñar iniciadores específicos con el programa Primer3Plus, con los cuales se llevó a cabo la amplificación de las secuencias.

Una vez diseñados los iniciadores específicos para cada gen, el siguiente paso fue establecer las condiciones óptimas de amplificación para dar un balance entre la eficiencia y la especificidad de la reacción (Yaish *et al.*, 2004). Se realizó una PCR gradiente en la que se probaron cuatro temperaturas de hibridación que fueron de 58, 60, 62 y 64°C. Los resultados obtenidos no mostraron diferencia significativa entre las diferentes temperaturas por lo tanto cualquiera pudiera ser empleada para la PCR, sin embargo se decidió usar la de 64°C ya que se sabe que a mayor temperatura se tiene mayor especificidad en la amplificación. La ausencia de productos inespecíficos se comprobó al realizar la curva de desnaturalización (Melt Curve).

Una vez determinada la temperatura óptima de hibridación, mediante un ensayo de PCR en tiempo real, empleando diferentes ecotipos de cocotero, se logró determinar que, de los dos juegos de iniciadores diseñados para cada uno de los tres genes ambos son buenos ya que cumplen con los parámetros esperados, sin embargo el juego F1/R1 en cada caso es el que dio CTs más tempranos y fueron elegidos para llevar a cabo los ensayos de expresión, ya que había que usar solo un juego.

Antes de proceder con los ensayos de expresión fue necesario un paso importante ya que una reacción de PCR en tiempo real exitosa requiere de una amplificación eficaz y específica del producto. Las reacciones de PCR en tiempo real usando SYBR Green son optimizadas para ser más sensibles y específicas y deben exhibir una buena eficiencia de amplificación sobre un amplio rango dinámico (BIO-RAD, 2006). En nuestro trabajo se realizó una serie de diluciones logarítmicas y la eficiencia se calculó a partir de la pendiente de la curva estándar en base a la fórmula: $E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1 \times 100$ (Bustin y Nolan, 2004). La eficiencia de la PCR debe ser de 90-110% aproximadamente, la pendiente ideal de -3.32 y el coeficiente de correlación $R^2 > 0.999$; aunque diversos factores pueden afectar la eficiencia como el largo del amplicón, la estructura secundaria y el diseño de los iniciadores (Bustin *et al.*, 2009).

Los resultados que obtuvimos mostraron que las curvas estándar tanto de control interno y de los genes diana tenían un amplio rango lineal y se observó una buena linearidad para las diluciones logarítmicas. Para los iniciadores del gen CnRGC4 (figura 2.7) en la curva estándar mostraron un coeficiente de regresión lineal (R^2) de 0.993, una eficiencia (%E) del 90.7% y el valor de la pendiente (y) fue de -3.56. Para el caso de los iniciadores CnRGC5 (figura 2.8) los resultados obtenidos en la curva estándar mostraron un coeficiente de regresión lineal (R^2) de 0.994, una eficiencia (%E) del 94.2% y el valor de la pendiente (y) fue de -3.47. Con los iniciadores CnRGC10 (figura 2.9) los resultados obtenidos en la curva estándar mostraron un coeficiente de regresión lineal (R^2) de 0.994, una eficiencia (%E) del 99.7% y el valor de la pendiente (y) fue de -3.33. En los tres casos se observó una buena correlación entre las curvas de amplificación de las diluciones logarítmicas (5^{-1} , 5^{-2} , 5^{-3} , 5^{-4}) las cuales dieron un valor de Ct cada 1.5 ciclos aproximadamente.

El valor de Ct y el logaritmo de las diluciones obtenido, presentaron un buen coeficiente de correlación y la curva estándar para las amplificaciones se encontró en conformidad con la amplificación exponencial de PCR. Las curvas de desnaturalización presentaron un sólo pico confirmando la amplificación de un solo producto sin componentes indeseables que influyan en los resultados. Estos resultados indicaron que la reacción de PCR tenía una buena especificidad, y no fueron generados dímeros de iniciadores, ni amplificaciones no específicas. La electroforesis en gel de agarosa validó la especificidad al confirmar un solo producto amplificado del tamaño esperado. Además, para las 3 réplicas de amplificación se produjo resultados similares en cada muestra, lo que indica la reproducibilidad y la fiabilidad del procedimiento experimental, de acuerdo a lo reportado en la literatura (BIO-RAD, 2006) y con datos similares a los obtenidos por You-Xiong y colaboradores en 2009. Los datos mostraron que los iniciadores si son funcionales para llevar a cabo los ensayos de expresión de los genes estudiados.

2.5 CONCLUSIONES

1. Se eligieron tres secuencias RGC ya reportadas que presentan homología con genes de resistencia y se logró el diseño de iniciadores específicos para cada gen con las características indicadas en la literatura para la PCR en tiempo real.
2. Se logró identificar la temperatura óptima de alineamiento y evaluar la curva estándar para medir el rendimiento los ensayos de PCR en tiempo real.
3. Los ensayos optimizados para las reacciones de PCR en tiempo real mostraron ser sensibles y específicos y tuvieron una buena eficiencia sobre un amplio rango dinámico.
4. Los iniciadores seleccionados y las condiciones de PCR para la amplificación de *CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10* son adecuados para la cuantificación por PCR en tiempo real.

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashfield T., Ong L., Nobuta K., Schneider C. and Innes R. (2004). Convergent evolution of disease resistance gene specificity in two flowering plant families. *Plant Cell*, 16(2): 309-318.
- Barrow R. (1991) Trip report to Nevis, FAO Project PR 13/2, St. Kitts, April 15-20, 1991. Rome; Food and Agriculture Organization of the UN, unpublished report, pp. 7.
- Beakbane A., Slater C. and Posnette A. (1972). Mycoplasmas in the phloem of coconut, *Cocos nucifera* L., with lethal yellowing disease. *Journal of Horticultural Science*, 47: 265.
- BIO-RAD (2006). Real-Time PCR: Applications Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc. Bulletin 5279.
- Bulgarelli D., Biselli C., Collins N., Consonni G., Stanca A., Schulze P., Valé G. (2010). The CC-NB-LRR-type Rdg2a resistance gene confers immunity to the seed-borne barley leaf stripe pathogen in the absence of hypersensitive cell death. *PLoS ONE*, 5(9): e12599.
- Bustin S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29: 23-39.
- Bustin S. A. (2003). In *A-Z of Quantitative PCR*, I. S. Tsigelny, Editors, La Jolla (USA): International University Line, pp. 7.
- Bustin S. A. and Nolan T. (2004). Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR. In: *Real-Time PCR; An Essential Guide*. K. J. Edwards. *et al.*, editors. Horizon Bioscience. Wymondham, pp. 125-184.
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M. W., Shipley G. L., Vandesompele J. and Wittwer C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4): 611–622.
- Dangl J. L., Jones J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated responses to infection. *Nature*, 411: 826–833.
- Deepak S., Kottapalli K., Rakwal R., Oros G., Rangappa K., Iwahashi H., Masuo Y., Agrawal G. (2007). Real-time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current Genomics*, 8: 234-251.
- Du B., Zhang W. and He G. (2009). Identification and characterization of *Bph14*, a gene conferring resistance to brown planthopper in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52): 22163-22168.

- Edwards K. J. (2004). Performing Real-Time PCR. In: Real-Time PCR; An Essential Guide. K. J. Edwards *et al.*, editors. Horizon Bioscience, Wymondham, pp. 71-84.
- FAO (2009) <http://www.faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Flor H. (1971). The current status of gene for gene concept. Annual Review of Phytopathology, 9: 275–296.
- Granados S. D., López R. G. (2002). Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) en México. Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 8(1): 39-48.
- Harries H. (1995). Coconut. In: J. Smart and D.W. Simmonds. Evolution of crop plants, Second Edition. Logman Scientific & technical. London, pp. 351-357.
- Harrison N. and Oropeza C. (2008) Coconut lethal yellowing. In: NA Harrison, G.P. Rao and C. Marcone (Eds.). Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas. Studium Press LLC, Houston, USA, pp. 219-248.
- Hayashi K, Yoshida H. (2009). Refunctionalization of the ancient rice blast disease resistance gene Pit by the recruitment of a retrotransposon as a promoter. Plant Journal, 57(3): 413-25.
- Jungeun K., Chan J., Bong W., Jae P., Sang K., Raza A., Suk Y., Jisook A. and Cheol G. (2012). A Genome-Wide Comparison of NB-LRR Type of Resistance Gene Analogs (RGA) in the Plant Kingdom. Molecules and Cells, 33: 385-392.
- Kairo M. T., López V. F., Pollard G. V., Hector R. (2001). Biological control of the coconut whitefly, *Aleurodicus pulvinatus*, in Nevis. Biocontrol News and Information, 22(2): 45-50.
- Larkin M., Blackshields G., Brown N., Chenna R., McGettigan P., McWilliam H., Valentin F., Wallace I., Wilm A., Lopez R., Thompson J., Gibson T. and Higgins D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23(21): 2947-2948.
- Liu X., Lin F., Wang L., Pan Q. (2007). The *in silico* map-based cloning of Pi36, a rice coiled-coil nucleotide-binding site leucine-rich repeat gene that confers race-specific resistance to the blast fungus. Genetics, 176(4): 2541-9.
- Martin J.H., Watson G.W. (1998) *Aleurodicus pulvinatus* (Maskell) (Homoptera: *Aleyrodidae*), and its emergence as a pest of coconut in the Caribbean. Journal of Natural History, 32: 85-98.
- McCoy R.E. (1972). Remission of lethal yellowing in coconut palms treated with tetracycline antibiotics. Plant Disease Reporter, 56: 1019-1021.
- McHale L., Tan X., Koehl P. and Michelmore R.W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. Genome Biology, 7: 212.

- Peirson S., Butler J. and Foster R. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(14): e73.
- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): e45.
- Pflieger S., Lefebvre V., Causse M. (2001). The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding* 7: 275-291.
- Pollard G.V. (1995) Duty travel report, St. Kitts and Nevis, 10-13 July 1995. Rome; Food and Agriculture Organization of the UN, unpublished report, pp. 4.
- Puch-Hau C. (2012). Aislamiento e identificación de secuencias análogas a genes de resistencia en cocotero. Tesis de Maestría. Unidad de Biotecnología de cocotero. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Rasmussen R. (2001). In *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*, Meuer S., Wittwer C. and Naka-gawara K., Editors., Heidelberg: Springer Press, pp. 21–34.
- Rutledge R. and Cote C. (2003). Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Research*, 31(16): e93.
- Salanoubat M., Müller-Auer S., Gabel C., Fuchs M., Benes V., Wurmbach E., Drzonek H., Erfle H., Jordan N., Bangert S., Wiedelmann R., Kranz H., Voss H., Holland R., Brandt P., Nyakatura G., Vezzi A., D'Angelo M., Pallavicini A., Toppo S., Simionati B., Conrad A., Hornischer K., Kauer G., Löhnert T., Nordsiek G., Reichelt J., Scharfe M., Schön O., Bargues M., Terol J., Climent J., Navarro P., Collado C., Perez-Perez A., Ottenwälder B., Duchemin D., Cooke R., Laudie M., Berger-Llauro C., Purnelle B., Masuy D., de Haan M., Maarse A., Alcaraz J., Cottet A., Casacuberta E., Monfort A., Argiriou A., Flores M., Liguori R., Vitale D., Mannhaupt G., Haase D., Schoof H., Rudd S., Zaccaria P., Mewes H., Mayer K., Kaul S., Town C., Koo H., Tallon L., Jenkins J., Rooney T., Rizzo M., Walts A., Utterback T., Fujii C., Shea T., Creasy T., Haas B., Maiti R., Wu D., Peterson J., Van Aken S., Pai G., Militscher J., Sellers P., Gill J., Feldblyum T., Preuss D., Lin X., Nierman W., Salzberg S., White O., Venter J., Fraser C., Kaneko T., Nakamura Y., Sato S., Kato T., Asamizu E., Sasamoto S., Kimura T., Idesawa K., Kawashima K., Kishida Y., Kiyokawa C., Kohara M., Matsumoto M., Matsuno A., Muraki A., Nakayama S., Nakazaki N., Shinpo S., Takeuchi C., Wada T., Watanabe A., Yamada M., Yasuda M., Tabata S. (2000). Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814): 820-822.
- Schaad N. and Frederick R. (2002) Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostic. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24: 250-258.

- Shang J., Tao Y., Chen X., Zou Y., Lei C., Wang J., Li X., Zhao X., Zhang M., Lu Z., Xu J., Cheng Z., Wan J., Zhu L. (2009). Identification of a new rice blast resistance gene, *Pid3*, by genomewide comparison of paired nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes and their pseudogene alleles between the two sequenced rice genomes. *Genetics*, 182(4): 1303-11.
- Stahlberg A., Aman P., Ridell B., Mostad P. and Kubista M. (2003). Quantitative Real-Time PCR Method for Detection of B-Lymphocyte Monoclonality by Comparison of κ and λ Immunoglobulin Light Chain Expression. *Clinical Chemistry*, 49(1): 51–59.
- Teulat B., Aldam C., Trehin R., Lebrun P., Barker J., Arnold G., Karp A., Baudouin L., Rognon F. (2000). An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 764–771.
- Thirumalaiah R., Selvaraj M., Rajasekaran R. and Subbarayalu M. (2008). Cloning and characterization of resistance gene analogs from underexploited plant species. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11: 1-11.
- Wan H., Yuan W., Ye Q., Wang R., Ruan M., Li Z., Zhou G., Yao Z., Zhao J., Liu S. and Yang Y. (2012). Analysis of TIR- and non-TIR-NBS-LRR disease resistance gene analogs in pepper: characterization, genetic variation, functional divergence and expression patterns. *BMC Genomics*, 13: 502.
- Yahiaoui N., Srichumpa P., Dudler R., Keller B. (2004). Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *Plant Journal*, 37(4): 528-38.
- Yaish M.W., Sáenz de Miera L.E. and Pérez de la Vega M. (2004). Isolation of a family of resistance gene analogue sequences of the nucleotide binding site (NBS) type from *Lens* species. *Genome*, 47: 650–659.
- You-Xiong Q., Li-Ping X., Jian-Wei L. and Ru-Kai C. (2009). Isolation and Characterization of NBS-LRR Resistance Gene Analogs from Sugarcane. *Acta Agronomica Sinica*, 35: 631–639.
- Yue J., Meyers B., Chen J., Tian D. and Yang S. (2012). Tracing the origin and evolutionary history of plant nucleotide-binding site–leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes. *New Phytologist*, 193: 1049–1063.
- Zhao B., Lin X., Poland J., Trick H., Leach J., Hulbert S. (2005). A maize resistance gene functions against bacterial streak disease in rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 15383–15388.

CAPITULO III

ANÁLISIS DEL EFECTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE RESISTENCIA

3.1 INTRODUCCIÓN

La palma de coco (*Cocos nucifera*) pertenece a la familia *Aracaceae* y se encuentra distribuida en los trópicos. Es particularmente importante en las islas bajas del Pacífico, donde proporciona casi todas las necesidades de la vida: comida, bebida, aceite, medicina, fibra, madera, paja, adornos, combustible, utensilios domésticos, entre otros. Por esta razón, se ha llamado el "árbol de la vida". Hoy en día sigue siendo un cultivo de importancia económica y de subsistencia en muchos pequeños estados insulares del Pacífico (Chan y Elevitch, 2006). En México las áreas productoras de cocotero se dividen en dos grandes regiones costeras, la del Golfo y Caribe: en Tabasco, Veracruz, Campeche, Yucatán y Quintana Roo y la del Pacífico: en Guerrero, Colima, Oaxaca, Michoacán, Sinaloa, Jalisco y Chiapas. El cocotero es uno de los cultivos de mayor importancia económica, cubre una superficie de 100 mil ha de las cuales dependen aproximadamente 50 mil familias que viven directamente del cultivo (CONACOCO, 2008).

Sin embargo, el cultivo del cocotero también presenta problemáticas que pueden ser englobadas en la baja productividad de las plantaciones ya existentes y la disminución de la superficie de cultivo, debido principalmente a escasas prácticas de cultivo, plantaciones viejas, plagas y enfermedades. Entre estas últimas, podemos encontrar las que son causadas por diversos agentes como virus (Rohde *et al.*, 1990), viroides (Hanold y Randles, 1991), protozoos (Parthasarathy *et al.*, 1978), hongos (Joseph *et al.*, 1975), nemátodos (Griffith, 1987) y mollicutas como los fitoplasmas entre los que se encuentra el causante del Amarillamiento Letal, siendo esta enfermedad la más destructiva (Howard y Barrant, 1989; Beakbane *et al.*, 1972; McCoy, 1972). A pesar de la gran importancia de este cultivo y a la diversidad de patógenos que afectan su producción, los mecanismos de defensa han sido poco estudiados, en comparación con otras plantas.

Los genes de resistencia (*R*) son componentes importantes del mecanismo de resistencia genética en las plantas ya que codifican proteínas de resistencia (*R*) que pueden censar la invasión por bacterias, hongos, oomicetos, virus, nemátodos, a través del reconocimiento de moléculas efectoras y son capaces de activar una serie de respuestas inmunes que proveen una resistencia efectiva en la planta hospedera. Entre estos se incluyen a los genes de tipo NBS-LRR que son la clase más abundante en plantas. Durante la última década, varios genes *R* que confieren resistencia a un amplio espectro de patógenos, han sido clonados a partir de diferentes especies de plantas (Wan *et al.*, 2012; Yue *et al.*, 2012). En cocotero se logró el aislamiento de 162 secuencias candidatas a genes de resistencia o RGCs de tipo NBS-LRR en palmas de los ecotipos alto del Pacífico y enano malayo amarillo (ambos resistentes al AL) y alto del Atlántico (susceptible al AL), de las cuales 139 presentaron marco de lectura abierto. Las secuencias aún no han sido caracterizadas (Puch-Hau, no publicado). En base a lo ya reportado se conoce que el ácido salicílico (AS) además de participar en procesos como la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, repuesta a estrés abiótico y termogénesis, también juega un papel primordial en la resistencia a enfermedades (Vlot *et al.*, 2009; Humphreys y Chapple, 2002; Métraux y Raskin, 1993; Raskin, 1992). El AS induce la expresión de proteínas relacionadas con patogénesis como glucanasas y quitinasas (Witmer *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 1998; Busam *et al.*, 1997), sin embargo hay pocos estudios sobre la inducción de genes *R* o RGCs por AS (Wan *et al.*, 2012; You-Xiong *et al.*, 2009).

La expresión génica es un proceso biológico mediante el cual la célula transforma la información codificada en el ADN a proteínas a través de la síntesis de ARN mensajero (ARNm) mediante el proceso de la traducción. La expresión génica de un determinado gen en una célula puede ser cuantificada por la cantidad producida de ARNm del gen en estudio (Rivas, 2010). La PCR en tiempo real se está empleando cada vez más para la cuantificación de la expresión génica, lo que permite un rápido análisis de la expresión génica a partir de pequeñas cantidades de templado inicial, además de que la PCR en tiempo real permite un alto rendimiento y una cuantificación rápida y reproducible, con un excelente rango dinámico y una alta sensibilidad (Peirson *et al.*, 2003).

Con la finalidad de evaluar si la aplicación exógena de AS induce la expresión de los RGCs en cocotero. En el presente capítulo se describe el análisis de expresión, mediante PCR en tiempo real, de tres o RGCs de tipo NBS-LRR (*CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10*) en plántulas *in vitro* tratadas con AS. La colecta de tejidos evaluados (hoja, tallo y raíz) se realizó a diferentes tiempos después del tratamiento (0, 24, 48, 72, 96 y 120 h).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal y tratamiento con ácido salicílico

Para realizar el ensayo se emplearon 36 plántulas de cocotero del ecotipo alto del Pacífico (AP) cultivadas *in vitro*, de aproximadamente 7 meses de edad, y se siguieron los mismos lineamientos usados por Nic-Matos (2012) para llevar a cabo el experimento. El ensayo consistió en 2 tratamientos, el primer tratamiento fue el de las plántulas tratadas con 2.5 mM de AS aplicado al medio de cultivo, el segundo consistió en las plántulas control (sin tratamiento con AS), las cuales permanecieron en el medio de cultivo únicamente. En cuanto al número de plantas por tratamiento, se emplearon 18 plantas para el tratamiento con AS (3 por cada tiempo de cosecha) y 18 plantas sin tratamiento como controles (3 por cada tiempo de cosecha). Los tiempos de cosecha tanto en las plantas con tratamiento, como en las no tratadas con AS, para el posterior estudio de los niveles de expresión de los genes *CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10* fueron de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h. Cabe señalar que el AS fue disuelto con 2 mL de etanol al 96%, sin embargo no fue necesario llevar a cabo un tratamiento con etanol debido a que en ensayos anteriores se pudo observar que el etanol no tiene ningún efecto en la expresión de los genes de interés (datos no publicados). El medio de cultivo empleado fue el Y3, sin sacarosa y sin carbón activado; los tejidos cosechados fueron hoja, tallo y raíz los cuales fueron congelados a -80°C hasta su posterior uso, esto para evitar la degradación del ARN. En la figura 3.1 se presenta un esquema del proceso de tratamiento con AS y el proceso de cosecha y en el cuadro 3.1 se puede apreciar un resumen del experimento realizado.

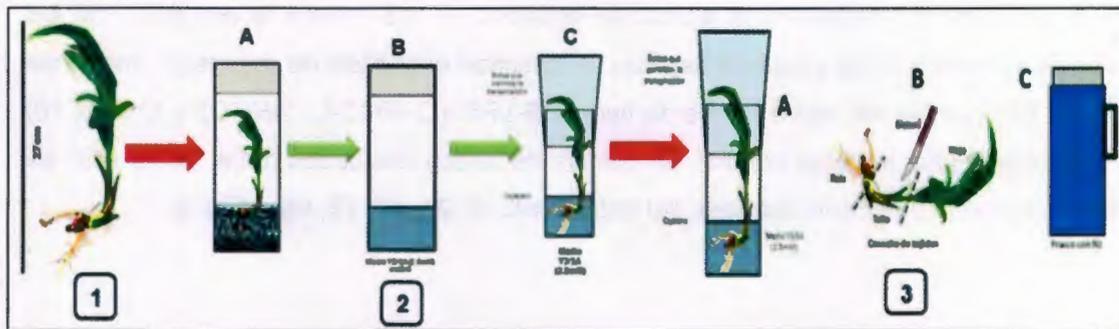


Figura 3.1 Representación esquemática del proceso de tratamiento de las plantas con AS y la cosecha de tejidos. 1). Plántula de cocotero micropropagada. 2). A). Se observa una planta antes de ser sometida al tratamiento con AS. B). Cajetero conteniendo medio Y3 con una concentración de 2.5 mM de AS estéril. C). Aspecto de la planta durante el tiempo sometido al tratamiento con AS. 3). A). Aspecto de la planta hasta antes de ser cosechado. B). Proceso de cosecha de cada uno de los diferentes tejidos. C). Contenedor con nitrógeno líquido en el cual eran puestos los tejidos cosechados antes de ser almacenados a -80°C (Nic-Matos, 2012).

Cuadro 3.1 Condiciones empleadas para el ensayo del tratamiento con AS.

Tiempo del tratamiento (Horas)	No. de plántulas tratadas con AS (2.5 mM)	No. de plántulas controles
0	3	3
24	3	3
48	3	3
72	3	3
96	3	3
120	3	3
Total	18	18

3.2.2 Extracción de ARN total de hoja, tallo y raíz de cocotero

El ARN fue extraído utilizando el método empleado por Herrera (2000), que consiste en el uso del amortiguador de extracción (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0; EDTA 0.2 mM, pH 8.0; SDS 2% y α -monotiolglicerol 0.15%). Se pesó 0.3 gr del tejido que luego se pulverizó con ayuda de nitrógeno líquido y un mortero, después se añadió 1 mL del amortiguador de extracción en el mortero, luego se transfirió 800 μ L de la mezcla a un tubo eppendorf de 2 mL y se agregó fenol-cloroformo (1:1 v/v). Posteriormente el extracto se incubó a 70°C por 5 min, después se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C y se tomó 600 μ L del sobrenadante obtenido al cual se le agregó isopropanol frío en una relación de volumen 1:1. La mezcla se incubó a -20°C por 10 min y se centrifugó a 11,000 rpm por 10 min a

4°C para eliminar el sobrenadante. Finalmente, se lavó la pastilla con 500 μ L de etanol al 70% y luego se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min a 4°C para eliminar el etanol. La pastilla se dejó secar y se resuspendió en agua con inhibidor de ARNasas. El ARN se trató con una nucleasa de ADN (DNasa I) y estas muestras se utilizaron para llevar a cabo la síntesis de ADNc. La concentración del ARN se midió con ayuda del espectrofotómetro NanoDrop 2000 y la calidad se visualizó después de fraccionar el ARN por electroforesis en geles de agarosa al 2% con ayuda del transiluminador UV.

3.2.3 Tratamiento con la Enzima DNasa I

Con el fin de eliminar cualquier ADN contaminante en las muestras de ARN, se llevó a cabo un tratamiento con la enzima DNasa I de Ambion. Se tomaron 20 μ L de ARN total a los que se le agregaron 5 μ L de amortiguador de DNasa 10X, 1 μ L de DNasa I (2 U/ μ L) y 1 μ L de inhibidor de ARNasas (RNasa Out). Luego se dejó incubar 30-60 min a 37°C. Posteriormente se le agregó 5 μ L del inactivador (DNase Inactivation Reagent, Ambión) y se incubó por 2 min a temperatura ambiente; finalmente se centrifugó 1 min a 10,000 rpm y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Las muestras procesadas fueron utilizadas para llevar a cabo la síntesis de ADNc. Antes de realizar la síntesis de la primera cadena (ADNc), se tomaron alícuotas de cada una de las muestras, las cuales quedaron con una concentración final de 100 ng/ μ L. Las muestras stock se almacenaron a -80°C. El ARN extraído, se observó en un gel de agarosa al 2% después de fraccionarlo por electroforesis. Para tal caso, se cargó 2 μ L de cada muestra y se hizo la corrida a 90 Voltios por 30 min. El último paso para cada uno de los protocolos fue la cuantificación del ARN, con la ayuda del equipo Nanodrop 2000.

3.2.4 Síntesis del ADNc (RT-PCR)

Para la síntesis del ADNc se empleó la técnica de RT-PCR con el Kit Omniscript® Reverse Transcription de QIAGEN, en un volumen total de 20 µL que contenía: En la primera mezcla, un volumen variable de ARN (500 ng), 1 µL de hexámero (random primers) y un volumen variable de agua ultrapura para completar 5 µL en cada tubo. En la segunda mezcla, 2 µL de amortiguador 10X, 2 µL de la mezcla de dNTPs (5 mM para cada uno), 1 µL de RNase-OUT (40 unidades/µL), 1 µL de la RT-Polimerasa y 9 µL de agua ultrapura para completar 15 µL por muestra. La mezcla uno se desnaturalizó a 65°C por 5 min y luego se puso en hielo; posteriormente se le agregó 15 µL de la mezcla dos y se incubó a 37°C por 1 h. El ADNc sintetizado se almacenó a -20 y se realizó el análisis de la calidad de cada una de las muestras mediante la amplificación por PCR en tiempo real del gen que codifica la subunidad ribosomal 18S.

3.2.5 Amplificación por PCR en tiempo real

La amplificación se realizó en un termociclador BIO-RAD C1000 con el sistema en tiempo real CFX96® y con la mezcla SsoFast™ EvaGreen® Supermix de Bio-Rad, siguiendo las instrucciones del fabricante; para comprobar la síntesis del ADNc este fue amplificado con los iniciadores del gen 18S ribosomal y posteriormente con los iniciadores específicos de cada gen para analizar la expresión. El protocolo de amplificación se estableció de la siguiente manera: 1 ciclo a 95°C por 2 min; 35 ciclos a 95°C por 15 segundos y gradiente de 58-64°C por 30 segundos. Al final se incluyó el ciclo de desnaturalización o curva de disociación (Melt Curve) para detectar productos inespecíficos (dímeros de iniciadores, amplificaciones no específicas, etc.). Para llevar a cabo la mezcla de reacción se utilizó 2 µL del ADNc, 0.75 µL por cada iniciador (sentido y antisentido) a 0.3 µM, 10 µL de la mezcla SsoFast™ EvaGreen® Supermix y la mezcla se completó con 11.5 µL de agua ultrapura para tener un volumen final de 25 µL en cada tubo. La amplificación de los genes se normalizó con los niveles de expresión del gen que codifica para la subunidad ribosomal 18S. Los cálculos que se realizaron para la normalización fueron en base a lo reportado por Livak y Schittgen (2001) y se expresó en Unidades de Expresión Relativa

(UER). Después de realizar las pruebas de optimización (Capítulo II), en base a los resultados obtenidos se seleccionaron tres juegos de iniciadores, un par (F1/R1) para cada gen (CnRGC4, CnRGC5 y CnRGC10) para llevar a cabo los ensayos de expresión. En el cuadro 3.2 se presentan los iniciadores seleccionados, su tamaño en bases y el tamaño del producto.

Cuadro 3.2 Juegos de iniciadores seleccionados para la amplificación y análisis de expresión.

Iniciador	Secuencia	Tamaño (bases)	Amplificación
CnRGC4	F1 (sentido) 5'-CTTTCGGACATTGGCATTITAGTC-3'	24	278 pb
	R1 (antisentido) 5'-CTAGCAGTTGAAAGCCGTGTTCTGG-3'	25	
	F1 (sentido) 5'-TTGCTTCTCCTTCGACCTTAAAACC-3'	27	
CnRGC5	R1 (antisentido) 5'-TATTAGAGCGAAGATCCACCAAGTC-3'	25	210 pb
	F1 (sentido) 5'-TCCCACCTCTCCTCAGCTGTTTC-3'	23	
CnRGC10	R1 (antisentido) 5'-CCTTGACTGTTTACCAGAAGACCA-3'	24	192 pb

3.2.6 Análisis de expresión de los RGCs por PCR en tiempo real

La normalización se realizó mediante la expresión del gen de la subunidad ribosomal 18S como estándar interno. Los cálculos fueron realizados con base a lo reportado por Livak y Schmittgen (2001), donde el cálculo del delta (Δ) Ct se refiere a la resta del valor umbral (Ct) de la muestra con respecto al valor umbral del gen normalizador (Δ Ct= Ct del gen a estudiar – Ct del gen normalizador). Posteriormente se determina el Δ Ct más alto del gen de interés y se le denomina Δ Ct de la línea base. Este valor es restado a los valores de Δ Ct obtenidos del gen de interés ($\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct del gen de interés – Δ Ct de la línea base), finalmente las unidades de expresión relativa se obtuvieron de la fórmula $UER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los resultados son expresados en Unidades de Expresión Relativa (UER). Los datos representan el promedio \pm desviación estándar de dos muestras biológicas independientes analizadas por triplicado.

3.2.7 Clonación y secuenciación de los productos amplificados

Para realizar la clonación se emplearon los productos de PCR en tiempo real de los tiempos en los que se encontró mayor expresión de los genes analizados. Los productos amplificados, se fraccionaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % y se purificaron empleando el kit de purificación QIAquick (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego fueron ligados dentro del vector pGEM-T Easy (Promega). Para la mezcla de la reacción de ligación fueron empleados, 5 μ L del amortiguador de ligación (2X), 1 μ L de la enzima T4 ADN ligasa (1U/ μ L), 1 μ L del vector pGEM-T Easy (50 ng/ μ L), 3 μ L del producto purificado de PCR para un volumen final de 10 μ L. Esta mezcla fue incubada por una hora a temperatura ambiente (25°C). Por último fue puesto en refrigeración (4°C) por 16 h. Después de la incubación, se tomaron 4 μ L del producto ligado y se llevó a cabo la transformación de las células competentes de *Escherichia coli* mediante un choque térmico a 42°C por 45 segundos. Posteriormente se crecieron en 1 mL de medio líquido LB (37°C a 200 rpm por 1 h). Luego, éstas colonias fueron sembradas en cajas Petri conteniendo medio sólido LB con ampicilina (100 mg/L) como antibiótico de selección de colonias transformadas, IPTG (0.5 mM) como inductor de la expresión del gen LacZ y X-GAL (80 mg/L) como sustrato de la β -galactosidasa para indicar la expresión de la misma enzima mediante la observación de colonias blancas (transformadas con el inserto de interés) y azules (transformadas con el plásmido sin el inserto de interés). Para determinar si estas colonias blancas contenían el fragmento, se realizó una reacción de PCR, empleando iniciadores M13, los cuales amplifican una región dentro del plásmido en la cual se inserta el fragmento de interés, estos iniciadores poseen un tamaño del amplicón de aproximadamente 200 pb. Posteriormente las colonias positivas, fueron crecidas en 5 mL de medio líquido con ampicilina (100 mg/L) e incubadas a 37°C y 200 rpm durante toda la noche (16 h aproximadamente) con el objetivo de multiplicar la cantidad de plásmido recombinante. Luego, se tomaron 2 mL del cultivo para realizar la subsecuente extracción del plásmido mediante el kit comercial Miniprep QIAprep (QIAGEN). El plásmido extraído fue cuantificado con la ayuda del marcador de masas High Mass (Invitrogen), para poder determinar la concentración requerida para la secuenciación. El proceso de secuenciación fue realizado por Davis Sequencing (USA).

3.2.8 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

Las secuencias obtenidas fueron analizadas por medio del programa BLASTX (Altschul *et al.*, 1990) para determinar su porcentaje de identidad con genes de resistencia ya reportados en otras especies de plantas, con base a las accesiones del Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov), así como también para determinar los valores de E (probabilidad de que el alineamiento BLAST no haya ocurrido al azar). El alineamiento de las secuencias con genes de resistencia, fue hecho con la finalidad de comprobar que existe un porcentaje de identidad suficientemente alto entre las secuencias comparadas, y también para saber que la expresión es la correspondiente a los genes de interés.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Extracción del ARN de las plántulas de cocotero

La extracción del ARN total se realizó siguiendo el protocolo de Herrera (2000). Para la extracción se empleó el tejido de las plántulas tratadas con ácido salicílico y los controles sin tratamiento, de las cuales se tomó 0.3 g del tejido (hoja, tallo y raíz). El tejido se pulverizó en nitrógeno líquido en condiciones estériles. El ARN extraído se trató con la enzima DNasa I (Ambión®) para eliminar el ADN genómico. Cabe señalar que de igual forma se realizó una PCR tiempo real para confirmar la eliminación del ADN, con los iniciadores específicos para el gen 18S ribosomal; en todas las muestras con tratamiento no se obtuvo amplificación, por lo tanto se concluyó que las muestras son aptas para la síntesis del ADN complementario. Las muestras de ARN se fraccionaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Los resultados se presentan en la figura 3.2.

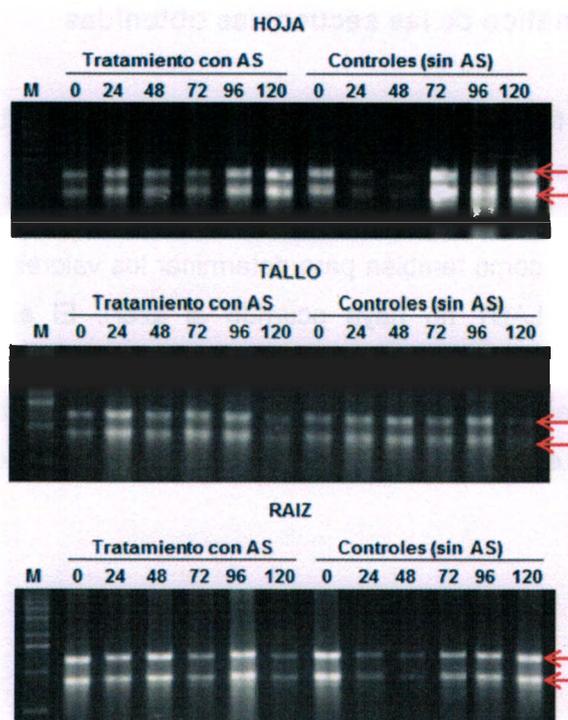


Figura 3.2 Productos de la extracción de ARN de hoja, tallo y raíz de las plantas tratadas con AS y los controles sin tratamiento. M: marcador de 1 kb, 0 a 120: horas posteriores al tratamiento. Las flechas rojas señalan las subunidades 28S y 18S del ARN.

3.3.2 Síntesis y amplificación del ADNc

La síntesis del ADN complementario se llevó a cabo a partir de las muestras del ARN que fueron tratadas con la enzima DNasa I (hoja, tallo y raíz), las cuales fueron cuantificadas y se emplearon 500 ng por muestra de ARN. Para la síntesis del ADNc se empleó la transcriptasa reversa Omniscript® siguiendo las instrucciones del fabricante y el ADNc sintetizado se empleó para realizar ensayos de PCR tiempo real con los iniciadores que resultaron funcionales luego de los ensayos de optimización. Para poder verificar la viabilidad del ADNc se realizó una PCR tiempo real con los iniciadores 18S. En la figura 3.3 se presentan las gráficas resultantes de la amplificación que demuestra la calidad del ADNc sintetizado.

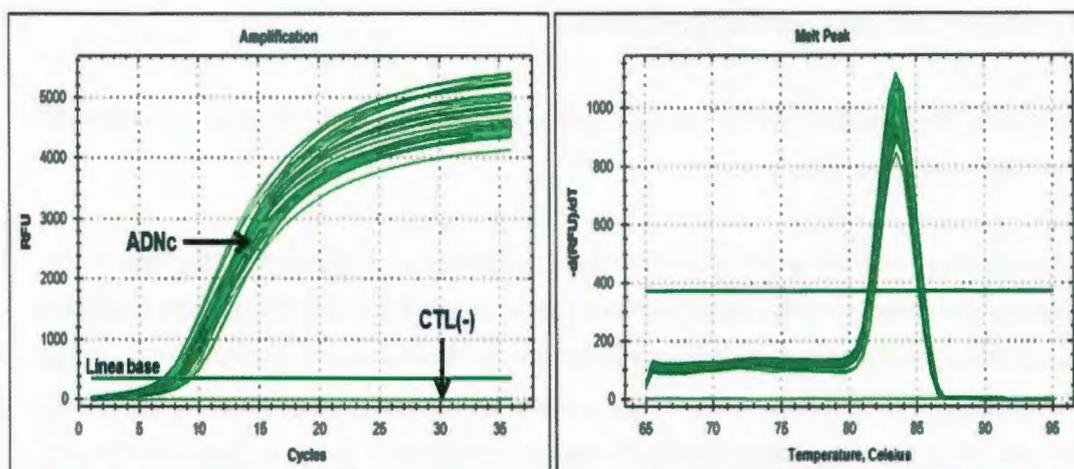


Figura 3.3 Imagen representativa de las gráficas de la amplificación por PCR tiempo real de las muestras de ADNc con el iniciador 18S. El ensayo se realizó en los tejidos de hoja, tallo y raíz y se muestran también las curvas de disociación.

3.3.3 Análisis de expresión de los genes candidatos por PCR en tiempo real

Para llevar a cabo los ensayos de expresión se empleó el ADNc recién sintetizado, y se trabajó con los tejidos de hoja, tallo y raíz de las plántulas tratadas con AS y los controles sin tratamiento. Para poder analizar la expresión de los genes candidatos *CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10* se realizó PCR tiempo real con las condiciones de temperaturas ya establecidas y para ello se empleó una mezcla de reacción para cada gen con 2 μL del ADNc, 0.75 μL por cada iniciador (sentido y antisentido) a 0.3 μM , 10 μL de la mezcla SsoFast™ EvaGreen® Supermix y la mezcla se completó con 11.5 μL de agua ultrapura para tener un volumen final de 25 μL en cada tubo. Para el caso del gen de referencia se empleó el 18S ribosomal y la mezcla de reacción fue de 2 μL del ADNc, 1 μL de cada iniciador (sentido y antisentido) a 0.3 μM , 10 μL de la mezcla SsoFast™ EvaGreen® Supermix y la mezcla se completó con 11 μL de agua ultrapura para tener un volumen final de 25 μL en cada tubo.

3.3.3.1 Análisis del gen candidato *CnRGC4*

Los resultados del análisis por PCR tiempo real para este candidato a gen de resistencia se presentan a continuación.

En el análisis de la expresión del gen candidato *CnRGC4* en el tejido de hoja (figura 3.4-A), podemos observar un nivel de expresión basal constitutivo de este gen en todos los tiempos del tratamiento control, mientras que en los tratamientos con ácido salicílico (AS) se observó que se fue dando un incremento gradual en el nivel de expresión de las 0 a las 72 h, a las 96 h se observaron bajos niveles de expresión y fue a las 120 h post-tratamiento donde el nivel de expresión alcanzó el pico máximo de ~1.5 veces más que el control.

En el análisis de la expresión del gen candidato *CnRGC4* en el tejido de tallo (figura 3.4-B), podemos observar niveles expresión basal constitutiva en todos los tiempos del tratamiento control. En las plántulas tratadas con AS se pudo observar niveles de expresión de manera basal a las 0, 48, 72 y 96 h post-tratamiento y a las 120 h se observó un incremento en la expresión de este gen, pero fue a las 24 h posteriores al tratamiento en donde el nivel de expresión alcanzó el pico máximo de ~2 veces más que el control.

En el análisis de la expresión del gen candidato *CnRGC4* en el tejido de raíz (figura 3.4-C), se observa que este gen presentó expresión constitutiva de manera basal en todos los tiempos del tratamiento control y para el caso del tratamiento con AS los niveles de expresión se incrementaron gradualmente de las 0 a las 48 h, tiempo donde el nivel de expresión alcanzó el pico máximo de ~2.7 veces más que el control, los niveles fueron menores a las 72 h, pero de nuevo fueron incrementando ligeramente hasta las 120 h post-tratamiento.

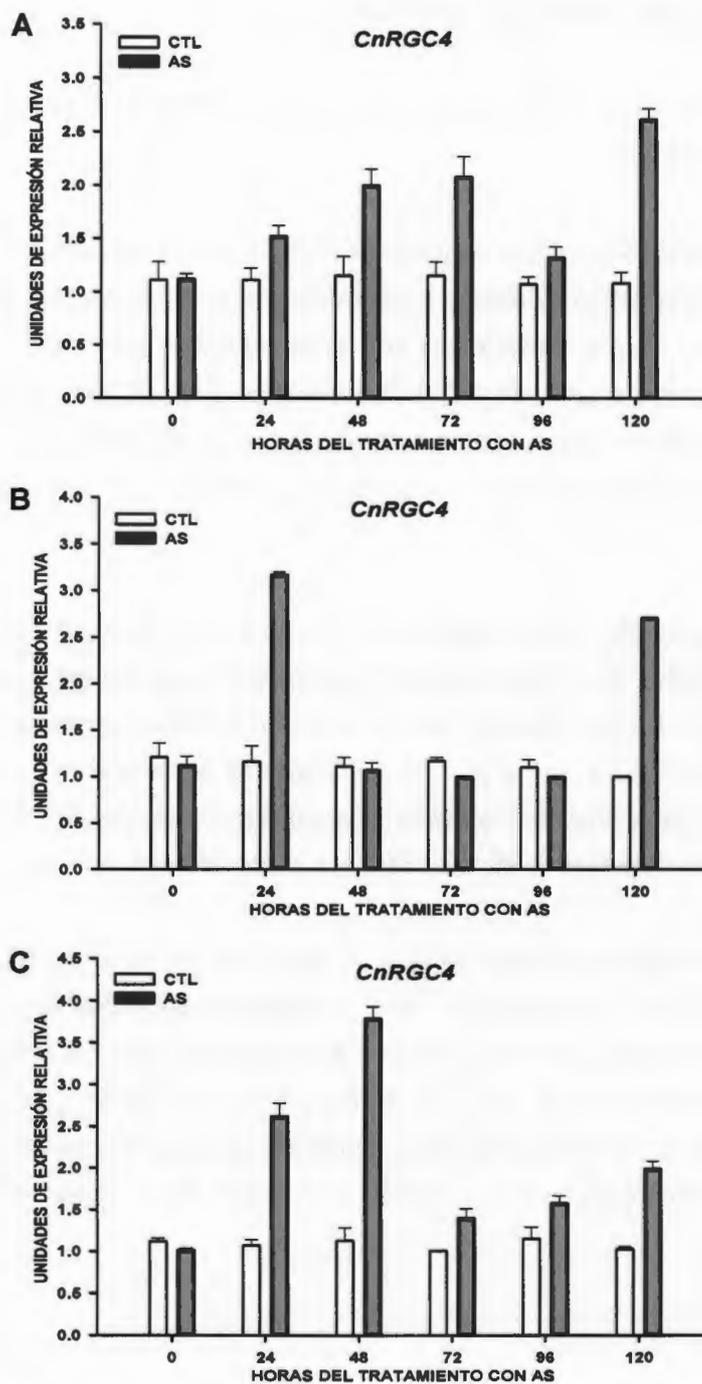


Figura 3.4 Análisis del efecto del AS en la expresión del Candidato a Gen de Resistencia *CnRGC4* en cocotero. A). Tejido de hoja, B). Tejido de tallo, C). Tejido de raíz. Las barras en blanco corresponden al tratamiento control (sin AS) y las barras en gris corresponden al tratamiento con AS.

3.3.3.2 Análisis del gen candidato *CnRGC5*

Los resultados del análisis por PCR tiempo real para este candidato a gen de resistencia se presentan a continuación.

En el análisis de la expresión del gen candidato *CnRGC5* en el tejido de hoja (figura 3.5-A), se observó que la expresión se mantuvo de manera constitutiva a bajos niveles en los tratamientos controles. En los tratamientos con ácido salicílico (AS) se pudo observar niveles de expresión basal a las 0, 24 y 72 h, sin embargo a las 48 y 96 h se observó un incremento en el nivel de los transcritos de este gen, pero fue hasta las 120 h posteriores al tratamiento donde el nivel de expresión alcanzó el pico máximo de ~2.4 veces más que el control.

En el análisis de la expresión del gen candidato *CnRGC5* en el tejido de tallo (figura 3.5-B), se observaron niveles de expresión basal constitutiva en todos los tiempos de los tratamientos control. En los tratamientos con AS se pudo observar que se dio un marcado incremento en la expresión del gen a las 120 h posteriores al tratamiento, pero fue en el tiempo de 24 h en donde el nivel de expresión alcanzó el pico máximo de ~7.7 veces más que el control, mientras que a las 0, 48, 72 y 96 h los niveles de expresión fueron basales.

En el análisis de la expresión del gen candidato *CnRGC5* en el tejido de raíz (figura 3.5-C), se mostraron niveles de expresión basal constitutiva en todos los tiempos del tratamiento control analizados y para los tiempos del tratamiento con AS también se pudo observar expresión basal a las 0, 72 y 120 h. En los tiempos de 48 y 96 h se dio un incremento en el nivel de los transcritos del gen, pero fue en el tiempo de 24 h posteriores al tratamiento donde se alcanzó el pico máximo en el nivel de expresión de ~1.4 veces más que el control.

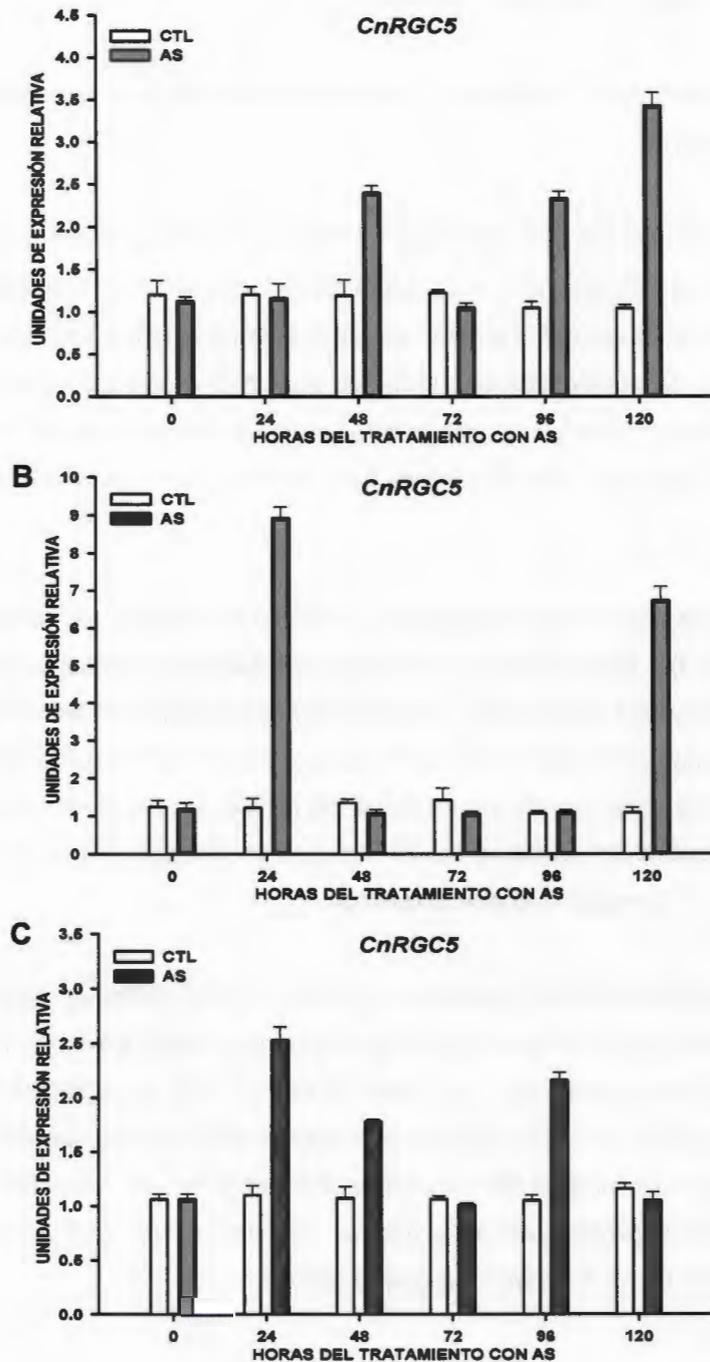


Figura 3.5 Análisis del efecto del AS en la expresión del Candidato a Gen de Resistencia *CnRGC5* en cocotero. A). Tejido de hoja, B).Tejido de tallo, C). Tejido de raíz. Las barras en blanco corresponden al tratamiento control (sin AS) y las barras en gris corresponden al tratamiento con AS.

3.3.3.3 Análisis del gen candidato *CnRGC10*

Los resultados del análisis por PCR tiempo real para este candidato a gen de resistencia se presentan a continuación.

En el análisis de la expresión del gen candidato *CnRGC10* en el tejido de hoja (figura 3.6-A), se pudo observar que este gen está expresado de manera basal en todos los tiempos muestreados del tratamiento control. También se encontró que la expresión del gen en los tiempos del tratamiento con ácido salicílico (AS) fue constitutiva, sin embargo, a las 24 h se observó un incremento en el nivel de expresión del gen, pero fue a las 48 h posteriores al tratamiento con AS en donde se alcanzó el pico máximo de ~1.7 veces más que el control.

En el análisis de la expresión del gen candidato *CnRGC10* en el tejido de tallo (figura 3.6-B), se observó que en los tratamientos control hay una expresión basal constitutiva de este gen en todos los tiempos analizados. En las plántulas tratadas con ácido salicílico de igual forma se pudo observar niveles de expresión basal a las 0, 48 y 96 h de tratamiento, sin embargo, también se encontró incrementos en los niveles de expresión del gen a las 24, 72 y 120 h post-tratamiento; siendo a las 24 h donde se alcanzó el pico máximo en el nivel de transcritos de ~1.2 veces más que el control.

En el análisis de la expresión del gen candidato *CnRGC10* en el tejido de raíz (figura 3.6-C), se observó que este gen se está expresando de manera basal en todos los tiempos del tratamiento control analizados. En los tratamientos con AS se encontró niveles de expresión basal los tiempos de 0, 72 y 96 h posteriores al tratamiento y también se pudo observar incrementos en los niveles de transcritos del gen a las 24, 48 y 120 h. El pico máximo en el nivel de expresión de este gen se alcanzó a las 48 h posteriores al tratamiento con AS y fue de ~2.2 veces más que el control.

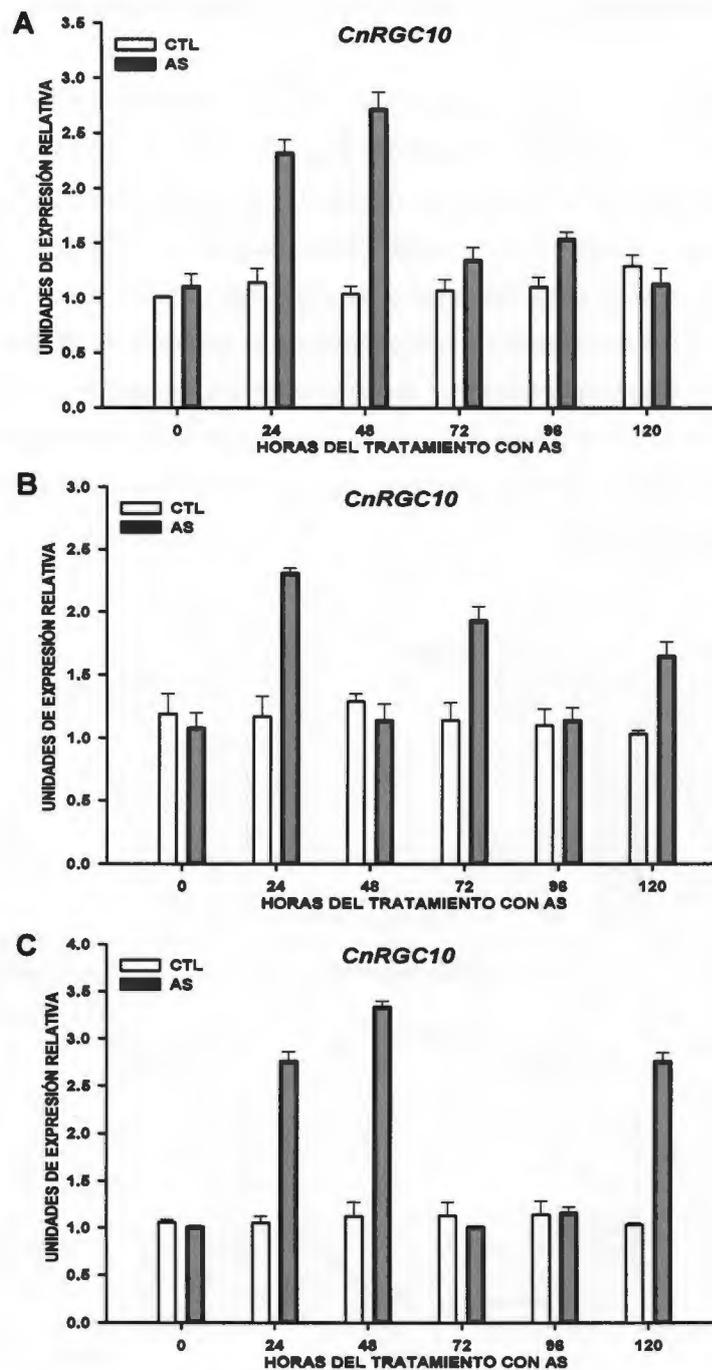


Figura 3.6 Análisis del efecto del AS en la expresión del Candidato a Gen de Resistencia *CnRGC10* en cocotero. A). Tejido de hoja, B). Tejido de tallo, C). Tejido de raíz. Las barras en blanco corresponden al tratamiento control (sin AS) y las barras en gris corresponden al tratamiento con AS.

3.3.3.4 Patrones de expresión de los RGCs en los tejidos analizados

Los resultados del análisis de la expresión génica por PCR en tiempo real de los RGCs se graficaron de otra manera para definir el patrón de expresión. En la figura 3.7-A se presenta el perfil de expresión de los tres genes analizados por tejido y se puede observar que en hoja el perfil de expresión de los tres genes analizados fue diferente, en tallo el perfil de expresión fue similar para los tres y en raíz fue similar para *CnRGC4* y *CnRGC10*. En la figura 3.7-B se presenta el porcentaje de incremento en la expresión de cada gen y fue posible observar que *CnRGC4* alcanzó la mayor expresión en el tejido de raíz, seguido de tallo y hoja, la expresión de *CnRGC5* fue mayor en tallo, seguido de hoja y raíz y para el caso de *CnRGC10* este presentó mayor incremento de expresión en el tejido de raíz, seguido de hoja y tallo.

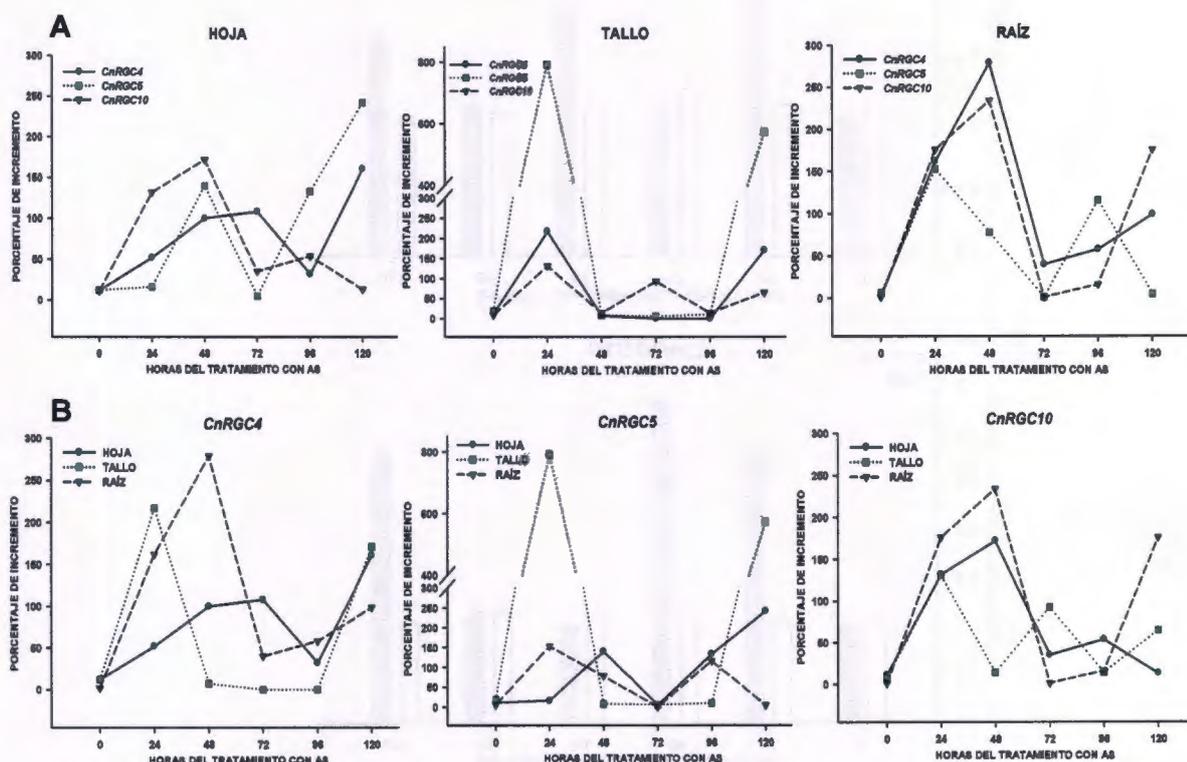


Figura 3.7 Análisis comparativo del efecto del AS en la expresión de los tres RGCs de cocotero. A). Perfiles de expresión de los tres RGCs analizados por tejido, B). Porcentaje de incremento en la expresión en hoja, tallo y raíz de cada RGC analizado.

3.3.4 Clonación y análisis de las secuencias obtenidas

Los productos de PCR en tiempo real fueron clonados y enviados a secuenciar por duplicado (a y b) con la finalidad de comprobar que lo que se estaba amplificando correspondía a los genes de interés. Las secuencias obtenidas fueron alineadas por medio del programa BLASTX (Altschul *et al.*, 1990), para poder comprobar que existe un porcentaje de identidad lo suficientemente alto entre las secuencias RGC amplificadas y otras secuencias ya reportadas, comparando con la base de datos del Gen Bank. Los resultados confirmaron que los productos amplificados corresponden a los genes de interés y en el cuadro 3.3 se muestran el porcentaje de identidad que presentaron los genes estudiados, la proteína con la que presentó mayor identidad y el porcentaje de identidad con la secuencia original de cocotero de las que fueron diseñados los iniciadores para el análisis de expresión de cada gen. El valor de E nos indica que los alineamientos no ocurrieron al azar.

Cuadro 3.3 Resultados de la identidad encontrada entre las secuencias RGC de cocotero y las secuencias del Gen Bank usando el programa BlastX.

Secuencia RGC	Tamaño (pb)	Proteína	% de cobertura	Valor de E	% de identidad	% de identidad con RGCs de cocotero
CnRGC4a	279	CC-NBS-LRR <i>Populus trichocarpa</i>	100	8e-22	47	100
CnRGC4b	295	RPM1 (NBS-LRR) <i>Vitis vinifera</i>	97	8e-23	46	100
CnRGC5a	205	NBS-LRR <i>Musa acuminata</i>	92	1e-20	70	98
CnRGC5b	205	NBS-LRR <i>Musa acuminata</i>	92	1e-20	70	98
CnRGC10a	152	NBS-LRR <i>Nicotiana tabacum</i>	86	5e-10	57	98
CnRGC10b	150	NBS-LRR <i>Nicotiana tabacum</i>	98	3e-11	57	99

3.4 DISCUSIÓN

En todos los organismos vivos las células regulan sus actividades mediante la activación o desactivación de la expresión de sus genes. La expresión genética es generalmente proporcional al número de copias de ARN mensajero (ARNm) de un gen determinado (McPherson *et al.*, 2008). La PCR en tiempo real puede generar amplicones muy pequeños (desde 60 pb) lo que la hace ideal para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica (Bustin, 2002). Una característica importante de PCR en tiempo real es su amplio rango dinámico; esto implica que un amplio nivel de expresión de los genes a estudiarse y en los genes normalizadores puede analizarse con similar sensibilidad y especificidad (Vinueza-Burgos, 2009; Dorak, 2008). La cuantificación de los niveles de expresión de genes puede dar pistas valiosas acerca de la función del gen. Por ejemplo, puede detectar una alteración en los niveles de expresión génica en respuesta a estímulos biológicos específicos. El uso de PCR tiempo real ofrece varias ventajas como la cantidad relativamente pequeña de muestra requerida para el análisis y la capacidad rápida y precisa para reproducir los datos, además de la capacidad para el análisis de más de un gen a la vez (Fraga *et al.*, 2008). En estudios previos ha sido reportado el aislamiento de candidatos a genes de resistencia (RGC) en diferentes especies de plantas (Lee *et al.*, 2003), entre las cuales se incluye al cocotero (Puch-Hau, 2012) y múltiples estudios se han hecho en monocotiledóneas y dicotiledóneas que han demostrado que el ácido salicílico (AS) desempeña un papel fundamental como molécula señal en la respuesta SAR y en la resistencia ante el ataque de patógenos (Le Henanff *et al.*, 2009; Vlot *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 1994).

En este estudio se reporta el primer análisis de la expresión de tres RGCs en plántulas *in vitro* de cocotero tratadas con ácido salicílico (AS) a una concentración establecida en estudios anteriores de 2.5 mM aplicado al medio de cultivo (Narváez, 2010); el estudio de expresión fue realizado empleando iniciadores específicos diseñados a partir de tres secuencias candidatas de genes de resistencia aisladas del ecotipo de cocotero alto del Pacífico (Puch-Hau, 2012) los cuales se denominaron *CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado con el fin de confirmar la fiabilidad de los resultados. Como gen de referencia se empleó el 18S ribosomal y los valores de Ct se utilizaron para comparar los diferentes grados en los niveles de expresión.

El análisis de los niveles de expresión de los RGCs por PCR tiempo real, se realizó en hoja, tallo y raíz a partir de ADNc sintetizado del ARN extraído de dichos tejidos; los genes se evaluaron a diferentes tiempos de cosecha 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h post-tratamiento; el ensayo incluyó como controles plántulas sin tratamiento con ácido salicílico (AS). En el análisis de los RGCs en los tejidos de hoja, tallo y raíz de cocotero, se observó que estos RGCs se encuentran constitutivamente expresados en plantas sin tratamiento con AS; lo cual coincide con lo reportado para la mayoría de los genes de resistencia que ya han sido clonados, que se caracterizan por una expresión constitutiva y en bajos niveles (Liu *et al.*, 2007). Posterior al tratamiento se encontró que el AS tuvo efectos en la expresión de los genes incrementando los niveles de transcritos; estos resultados son similares a lo reportado en otros estudios de expresión de RGCs (Wan *et al.*, 2012; You-Xiong *et al.*, 2009). Para el gen *CnRGC4* los niveles más altos se dieron a las 120 h en hoja, 24 h en tallo y 48 h en raíz. En el análisis del gen *CnRGC5* se alcanzaron los niveles más altos a las 120 h en hoja, 24 h en tallo y 24 h en raíz. En el caso del gen *CnRGC10* este alcanzó los niveles más altos a las 48 h en hoja, 24 h en tallo y 48 h en raíz. En *Arabidopsis*, se sabe que la expresión de algunos, pero no todos los genes de tipo NBS-LRR se ve afectada por el tratamiento con AS y la respuesta es variable según la línea (Tan *et al.*, 2007), pero en caña de azúcar y chile dulce se ha visto que el AS puede inducir la expresión de genes tipo NBS-LRR luego de tratamiento con AS (Wan *et al.*, 2012; You-Xiong *et al.*, 2009). Sin embargo, se necesitan de más estudios para comprender plenamente el papel de estos RGCs en las plantas de cocotero.

En general estos tres RGCs mostraron patrones similares de expresión (constitutiva y en bajos niveles) en los diferentes tejidos analizados en las plantas no tratadas y a pesar de la expresión variable de los genes en las plantas tratadas, fue posible observar claramente picos altos en el nivel de los transcritos después del tratamiento, lo que podría sugerir que estos genes son dependientes de la vía de ácido salicílico. Estos resultados concuerdan con el papel postulado de las proteínas NBS-LRR que actúan como receptores preformados que reconocen un patógeno en una correlación gen por gen entre la enfermedad y la resistencia en las plantas (Tan *et al.*, 2007). Estos genes candidatos pudieran estar actuando como una barrera preformada capaz de activarse al reconocer los genes *Avr* del patógeno, tal y como se reporta en los RGCs que pueden expresarse constitutivamente a un nivel muy bajo antes de la sensibilización externa (Aswati y

Thomas, 2007). De igual forma algunos estudios reportan que las moléculas señal (como el AS) no solo funcionan como una señal crítica para la regulación río abajo en eventos de resistencia, sino que también pueden sobre regular la expresión de los genes *R* (Wan *et al.*, 2012; You-Xiong *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Shirano *et al.*, 2002). Los resultados en la expresión de los RGCs, también presentan cierta similitud con lo reportado sobre el gen *NPR1* que ahora se sabe que es un regulador maestro de SAR al ser receptor de la señal de AS (Wu *et al.*, 2012) y cuyo estudio en cocotero fue a los mismos tiempos (de 0 a 120 h) y se encontró un cambio en los niveles de transcritos del gen luego de la aplicación de AS a las 120 h en las plantas tratadas y también fue encontrada una expresión basal en todos los tiempos de las plantas control (Nic-Matos, 2012).

3.5 CONCLUSIONES

1. Las secuencias representativas de los clados *CnRGC4*, *CnRGC5*, y *CnRGC10*, se expresan de manera constitutiva y en bajos niveles en plántulas de cocotero que no han sido tratadas con AS.
2. Después del tratamiento con ácido salicílico se indujo la expresión de los candidatos a genes de resistencia *CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10* en los tejidos de hoja, tallo y raíz de plántulas de cocotero cultivadas *in vitro*.
3. Las secuencias RGC analizadas mostraron un perfil de expresión diferente en el tejido de hoja, en tallo el perfil de expresión fue similar para los tres genes y en raíz fue similar para dos genes.

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E. and Lipman D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410.
- Aswati N., Thomas G., (2007). Isolation, characterization and expression studies of resistance gene candidates (RGC) from *Zingiber* spp. *Theoretical and Applied Genetics*, 116: 123–134.
- Beakbane A., Slater C. and Posnette, A. (1972). Mycoplasmas in the phloem of coconut, *Cocos nucifera* L., with lethal yellowing disease. *Journal of Horticultural Science*, 47: 265.
- Busam G., Kassemeyer H. and Matern U. (1997). Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiology*, 115: 1029-1038.
- Bustin S. A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29: 23-39.
- Cao H., Bowling S., Gordon A., Dong X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 6(11): 1583-1592.
- Chan E. and Elevitch C. R (2006). *Cocos nucifera* (coconut) *Arecaceae* (palm family). Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. [www. Traditionaltree.org](http://www.Traditionaltree.org).
- CONACOCO (2008). Consejo Nacional del cocotero. <http://www.conacoco.com.mx>.
- Dorak M.T. (2008) Real-Time PCR. <http://www.dorakmt.tripod.com/genetics/realttime>
- Fraga D., Meulia T. and Fenster S. (2008). Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. Unit 10.3.
- Griffith R. (1987). Red ring disease of coconut palm. *Plant Disease*, 71: 193-196.
- Hanold D. and Randles J. (1991). Coconut cadang-cadang disease and its viroid agent. *Plant Disease*, 75: 330-335.
- Herrera I. L. (2000). RT-PCR en el diagnóstico de la tristeza de los cítricos (CVT). Tesis de Doctorado. Centro de Investigación de Estudios avanzados del IPN, Unidad Irapuato, México.
- Howard F. and Barrant C. (1989). Question and answers about lethal yellowing disease. *Principes*, 33: 163-171.
- Humphreys J. and Chapple C. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 224-229.

- Joseph T. and Radha K. (1975). Role of *Phytophthora palmivora* in but rot of coconut. Plant Disease Report, 59: 1014-1017.
- Kang M., Park K. and Choi D. (1998). Coordinated expression of defense-related genes by TMV infection or salicylic acid treatment in tobacco. Molecules and Cells, 31: 388-392.
- Lee S., Seo J., Rodriguez-Lanetty M. and Lee D. (2003). Comparative analysis of superfamilies of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species. Molecular Genetics and Genomics, 269(1): 101-108.
- Le Henanff G., Heitz T., Mestre P., Mutterer J., Walter B., Chong J. (2009). Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. BMC Plant Biology, 9: 54.
- Liu X., Lin F., Wang L., Pan Q. (2007). The *in silico* map-based cloning of *Pi36*, a rice coiled-coil nucleotide-binding site leucine-rich repeat gene that confers race-specific resistance to the blast fungus. Genetics, 176: 2541-2549.
- Livak K. J. and Schmittgen T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta}$ Ct Method. METHODS, 25: 402-408.
- McCoy R.E. (1972). Remission of lethal yellowing in coconut palms treated with tetracycline antibiotics. Plant Disease Reporter, 56: 1019-1021.
- McPherson M. J., Hames B. D. and Taylor G. R. (2008). PCR a Practical Approach. First Edition edn. Oxford University Press Oxford.
- Métraux J. and Raskin I. (1993). Role of phenolics in plant disease resistance. In Biotechnology in Plant Disease Control. I. Chet, editor. John Wiley & Sons, New York, 11: 191-209.
- Narváez C. M. (2010). Inducción de SAR en plantas de cocotero infectadas con *Phytophthora capsici*. Tesis de Maestría. Unidad de Biotecnología de cocotero. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Nic-Matos J. (2012). Estudio de la expresión del gen *CnNPR1* en plantas de cocotero tratadas con ácido salicílico Tesis de Maestría. Unidad de Biotecnología de cocotero. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Parthasarathy M., Van Slobbe W. and Soudant C. (1978). Hartrot or fatal wilt of palms 1. Coconuts (*Cocos nucifera*). Principes, 22: 3-14.
- Puch-Hau C. (2012). Aislamiento e identificación de secuencias análogas a genes de resistencia en cocotero. Tesis de Maestría. Unidad de Biotecnología de cocotero. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

- Peirson S., Butler J. and Foster R. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(14): e73.
- Raskin I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43: 439-463.
- Rivas R. F. (2010). Análisis de la expresión del gen *PR-1*, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*. Tesis de licenciatura. Departamento de ciencias de la vida, Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército.
- Rohde W., Randles J., Langridge P. and Hanold D. (1990). Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. *Virology*, 176: 648-51.
- Shirano Y., Kachroo P., Shah J., Klessig D. (2002) A gain-of-function mutation in an *Arabidopsis* toll interleukin1 receptor-nucleotide binding site-leucine-rich repeat type R gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *Plant Cell*, 14(31): 49-62.
- Tan X., Meyers B., Kozik A., West M., Morgante M., St Clair D., Bent F. and Michelmore R. (2007). Global expression analysis of nucleotide binding site leucine rich repeat-encoding and related genes in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 7:56.
- Tian A., Luo G., Wang Y., Zhang J., Gai J., Chen S. (2004). Isolation and characterization of a *Pti1* homologue from soybean. *Journal of Experimental Botany*, 396: 535-537.
- Vinueza-Burgos C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *REDVET, Revista electronica*, 10(2): 13 p.
- Vlot A. C., Dempsey D. A., Klessig D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*. 47: 177-206.
- Wan H., Yuan W., Ye Q., Wang R., Ruan M., Li Z., Zhou G., Yao Z., Zhao J., Liu S. and Yang Y. (2012). Analysis of TIR- and non-TIR-NBS-LRR disease resistance gene analogous in pepper: characterization, genetic variation, functional divergence and expression patterns. *BMC Genomics*, 13: 502.
- Wang B., Wang Y., Wang Q., Luo G., Zhang Z., He C., He S., Zhang J., Gai J., Chen S. (2004). Characterization of an NBS-LRR resistance gene homologue from soybean. *Journal of Plant Physiology*, 161: 815-822.
- Wang B., Zhang Z., Li X., Wang Y., He C., Zhang J., Chen S. (2003). Cloning and analysis of a disease resistance gene homolog from soybean. *Acta Botanica Sinica*, 45: 864-870.

- Witmer X., Nonogaki H., Beers E.P., Bradford K.J. and Welbaum G.E. (2003). Characterization of chitinase activity and gene expression in muskmelon seeds. *Seed Science Research*, 13: 167–178.
- Wu Y., Zhang D., Chu J., Boyle P., Wang Y., Brindle I., De Luca V., and Després C. (2012). The *Arabidopsis* NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports*, 1: 639–647.
- Xiao S., Brown E., Brearley C., Turner J. (2003). Enhanced transcription of the *Arabidopsis* disease resistance genes *RPW8.1* and *RPW8.2* via a salicylic acid-dependent amplification circuit is required for hypersensitive cell death. *Plant Cell*, 15: 33–45.
- You-Xiong Q., Li-Ping X., Jian-Wei L. and Ru-Kai C. (2009). Isolation and Characterization of NBS-LRR Resistance Gene Analogs from Sugarcane. *Acta Agronomica Sinica*, 35: 631–639.
- Yue J., Meyers B., Chen J., Tian D. and Yang S. (2012). Tracing the origin and evolutionary history of plant nucleotide-binding site–leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes. *New Phytologist*, 193: 1049–1063.

CAPITULO IV

DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Las plantas se defienden contra el ataque de patógenos mediante la estimulación de múltiples rutas de señalización (Zhao *et al.*, 2008). La respuesta de defensa generada mediante la inducción de estas rutas puede ser específica contra un patógeno en particular como es el caso para la resistencia mediada por genes *R* o general contra un amplio espectro de patógenos. En estudios previos ha sido reportado el aislamiento de candidatos a genes de resistencia (RGCs) en diferentes especies de plantas (Lee *et al.*, 2003), entre las cuales se incluye al cocotero (Puch-Hau, 2012) y múltiples estudios se han hecho en monocotiledóneas y dicotiledóneas que han demostrado que el ácido salicílico (AS) desempeña un papel fundamental como molécula señal en la respuesta SAR y en la resistencia ante el ataque de patógenos (Le Henanff *et al.*, 2009; Vlot *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 1994).

La eficiencia de las proteínas *R* en conferir inmunidad a través de las fronteras del género de plantas ha llevado a los investigadores a buscar nuevas variedades de genes *R* en los cultivos o sus parientes silvestres e introducirlos en los cultivos de interés (Dennis *et al.*, 2008). Desde el primer gen *R* que se clonó de planta y que participó en una interacción planta-patógeno (Martin *et al.*, 1993) el estudio de los genes *R* es uno de los temas fundamentales de la ciencia de las plantas en la actualidad (Liu *et al.*, 2007). La clonación y caracterización de los genes *R* no sólo pueden facilitar la comprensión del mecanismo molecular en la interacción entre el huésped y el patógeno, sino que también puede proporcionar oportunidades para el mejoramiento de cultivos resistentes a enfermedades (Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2003).

La expresión génica es un proceso biológico mediante el cual la célula transforma la información codificada en el ADN a proteínas a través de la producción del ARN mensajero (ARNm) mediante el proceso de la traducción. La expresión génica de un determinado gen en una célula puede ser cuantificada por la cantidad producida de ARNm del gen en estudio (Rivas, 2010). La PCR en tiempo real se está usando cada vez más para la cuantificación de la expresión génica lo que permite un rápido análisis de la expresión génica a partir de pequeñas cantidades de templado inicial, además de que la PCR en tiempo real permite un alto rendimiento y una cuantificación rápida y reproducible, con un excelente rango dinámico y una alta sensibilidad (Peirson *et al.*, 2003). En años recientes la clase más abundante en plantas los genes *R* de tipo NBS-LRR han sido extensamente investigados en diferentes especies de plantas (Wan *et al.*, 2012) entre ellas el cocotero (Puch-Hau, 2012) y se ha visto que en caña de azúcar (You-Xiong *et al.*, 2009) y chile dulce (Wan *et al.*, 2012) se induce la expresión de los genes tipo NBS-LRR luego del tratamiento con ácido salicílico.

En cocotero se empleó una estrategia similar y este es el primer estudio que reporta el análisis de la expresión de tres RGCs (*CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10*) en plántulas *in vitro* tratadas con AS. El análisis de los niveles de expresión de los RGCs se realizó por PCR en tiempo real, y se analizaron en hoja, tallo y raíz a partir de ADNc sintetizado del ARN extraído de dichos tejidos; los genes fueron evaluados a diferentes tiempos en 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h post-tratamiento; el ensayo incluyó como controles plántulas sin tratamiento con AS. La amplificación de los genes se normalizó con los niveles de expresión del gen que codifica para la subunidad ribosomal 18S (Kumar *et al.*, 2013; Garg *et al.*, 2010; Jian *et al.*, 2006) y los cálculos que se realizaron para la normalización fueron en base a lo reportado por Livak y Schittgen (2001) y se expresó en Unidades de Expresión Relativa (UER).

En el análisis de los RGCs en los tejidos de hoja, tallo y raíz de cocotero, se observó que estos genes se encuentran constitutivamente expresados en plantas sin tratamiento con AS; lo cual coincide con lo reportado para la mayoría de los genes de resistencia que ya han sido clonados, que se caracterizan por una expresión constitutiva y en bajos niveles (Liu *et al.*, 2007). Posterior al tratamiento se encontró que el AS tuvo efectos en la expresión de los genes incrementando los niveles de transcritos; estos resultados son

similares a lo reportado en otros estudios de expresión de RGCs (Wan *et al.*, 2012; You-Xiong *et al.*, 2009). Los resultados podrían sugerir que estos RGCs son dependientes de la vía de ácido salicílico y concuerdan con el papel postulado de las proteínas NBS-LRR que actúan como receptores preformados que reconocen un patógeno en una correlación gen por gen entre la enfermedad y la resistencia en las plantas (Tan *et al.*, 2007). Estos genes candidatos pudieran estar actuando como una barrera preformada capaz de activarse al reconocer los genes *Avr* del patógeno (Aswati y Thomas, 2007).

En los últimos años se ha incrementado el número de genes de resistencia que han sido aislados de plantas y a pesar del potencial de estos en la agricultura, poco se conoce acerca de los mecanismos que regulan su expresión (Li *et al.*, 2011). Después del tratamiento con AS, ocurrieron cambios en los niveles de expresión de los RGCs evaluados, los cuales mostraron patrones diferentes de expresión entre los tejidos y tiempos analizados. Los niveles de expresión de los RGCs no fueron iguales en los tres tejidos para un mismo RGC, sin embargo, algunos patrones si fueron similares entre los diferentes RGCs en los tejidos de tallo y raíz. Estos resultados nos indican que cada uno de los genes responde de una manera diferente al AS y que los picos de expresión observados en diferentes tiempos del tratamiento podrían estar relacionados con los mecanismos de regulación de cada uno de los RGCs. Estudios recientes indican que los miRNA juegan un papel importante en la regulación de los transcriptos que codifican para la proteína N, un receptor inmune NBS-LRR que confiere resistencia al virus del mosaico del tabaco; por lo tanto, se propone que este mecanismo de regulación de genes de resistencia a patógenos esta conservado en plantas (Li *et al.*, 2011), sin embargo este es un campo que en cocotero aún no ha sido explorado.

Este trabajo de investigación es un paso más que contribuye al entendimiento de los mecanismos de defensa del cocotero que aún son poco conocidos. Los RGCs proveen información valiosa de secuencias para aplicar el enfoque de genes candidatos y clonar genes *R* completos (Pflieger *et al.*, 2001). Esta estrategia ha revelado ser muy útil como primer paso hacia la identificación de genes de resistencia, que puede ser de gran utilidad para el desarrollo biotecnológico de nuevas variedades de cocotero que sean resistentes ante las principales enfermedades que afectan la producción y causan pérdidas importantes en este cultivo.

4.2 CONCLUSIONES GENERALES

1. Empleando iniciadores específicos se logró establecer las condiciones óptimas de amplificación de ADN por PCR en tiempo real y cuantificar la expresión de los tres candidatos a genes de resistencia (RGCs) estudiados.
2. El ácido salicílico indujo la expresión de los candidatos a genes de resistencia *CnRGC4*, *CnRGC5* y *CnRGC10* en los tejidos de hoja, tallo y raíz de plántulas de cocotero cultivadas *in vitro*.
3. Este es el primer estudio en el cual se reporta el análisis de expresión por PCR en tiempo real de RGCs en plántulas de cocotero tratadas con ácido salicílico.

4.3 PERSPECTIVAS

Hasta ahora en cocotero se ha logrado aislar, identificar y analizar la expresión de secuencias candidatas a genes de resistencia. Los RGCs analizados en este estudio pudieran estar jugando un rol importante en la defensa de este cultivo, activados por la vía del ácido salicílico. Adicionalmente en otro trabajo, será necesario continuar con la validación funcional de estos genes sometiendo las plántulas ante algún tipo de patógeno o también por transformación genética ya sea sobre expresando o silenciando al gen de interés; aunque esto último, en el caso de cocotero puede tardar varios años. Así mismo será importante evaluar los mecanismos que regulan la expresión de estos genes RGC, ya que dichos mecanismos aun son desconocidos.

Las secuencias de RGCs con las que actualmente contamos, proveen una fuente muy importante para la clonación de genes de resistencia, ya que las secuencias que han presentado los mejores resultados en cuanto a los análisis son candidatos para el aislamiento del gen completo por medio de la técnica del RACE (amplificación rápida de los extremos de ADNc) y para realizar ensayos de interacción proteína-proteína para comprobar que estas proteínas tipo no-TIR-NBS-LRR interactúan con proteínas de avirulencia y de esta manera tener más evidencia acerca de su función.

Las secuencias NBS-LRR pueden proveer una herramienta molecular para el mapeo genético y la clonación posicional de genes de resistencia en cocotero. Otra alternativa también sería emplear el uso de marcadores moleculares para mejoramiento asistido en esta especie y poder seleccionar individuos con características que le confieran resistencia a enfermedades. La posibilidad de contar con genes de resistencia, serán aspectos importantes para conocer más sobre la interacción planta-patógeno en este cultivo, lo que permitirá el desarrollo de mejores estrategias de mejoramiento. El desarrollo de un juego de marcadores moleculares basados en secuencias NBS es de gran importancia para la identificación de genotipos resistentes y susceptibles a ciertas enfermedades que lo afectan. Se espera que los resultados obtenidos en este estudio puedan de alguna manera contribuir al desarrollo biotecnológico del cocotero.

4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aswati N., Thomas G., (2007). Isolation, characterization and expression studies of resistance gene candidates (RGC) from *Zingiber* spp. Theoretical and Applied Genetics 116: 123–134.
- Cao H., Bowling S., Gordon A., Dong X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. Plant Cell, 6(11): 1583-1592.
- Dennis E., Ellis J., Green A., Llewellyn D., Morell M., Tabe L. and Peacock W. (2008). Genetic contributions to agricultural sustainability. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 363: 591-609.
- Garg R., Sahoo A., Tyagi A., Jain M. (2010). Validation of internal control genes for quantitative gene expression studies in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Biochemical and Biophysical Research Communications, 396(2): 283–288.
- Jain M., Nijhawan A., Tyagi A., Khurana J. (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communications, 345(2): 646–651.
- Kumar K., Muthamilarasan M., Prasad M. (2013). Reference genes for quantitative real-time PCR analysis in the model plant foxtail millet (*Setaria italica* L.) subjected to abiotic stress conditions. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 115(1): 13-22.
- Lee S., Seo J., Rodriguez-Lanetty M. and Lee D. (2003). Comparative analysis of superfamilies of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species. Molecular Genetics and Genomics, 269(1): 101-108.
- Le Henanff G., Heitz T., Mestre P., Mutterer J., Walter B., Chong J. (2009). Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. BMC Plant Biology, 9:54.
- Li F., Pignatta D., Bendix C., Brunkard J., Cohn M., Tung J., Sun H., Kumar P. and Baker B. (2011). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(5): 1790-1795.
- Liu X., Lin F., Wang L., Pan Q. (2007). The *in silico* map-based cloning of *Pi36*, a rice coiled-coil nucleotide-binding site leucine-rich repeat gene that confers race-specific resistance to the blast fungus. Genetics, 176: 2541–2549.
- Livak K. J. and Schmittgen T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta}$ Ct Method. METHODS, 25: 402–408.

- Martin G., Brommonschenkel S., Chunwongse J., Frary A., Ganai M., Spivey R., Wu T., Earle E., Tanksley S. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262: 1432–1435.
- Peirson S., Butler J. and Foster R. (2003). Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research*, 31(14): e73.
- Pflieger S., Lefebvre V., Causse M. (2001). The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding*, 7: 275-291.
- Puch-Hau C. (2012). Aislamiento e identificación de secuencias análogas a genes de resistencia en cocotero. Tesis de Maestría. Unidad de Biotecnología de cocotero. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
- Rivas R. F. (2010). Análisis de la expresión del gen *PR-1*, mediante la técnica de PCR en tiempo real (RT-PCR), en tomate (*Solanum lycopersicum*) infectado con *Phytophthora infestans*. Tesis de licenciatura. Departamento de ciencias de la vida, Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército.
- Tan X., Meyers B., Kozik A., West M., Morgante M., St Clair D., Bent F., and Michelmore R. (2007). Global expression analysis of nucleotide binding site leucine rich repeat-encoding and related genes in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 7: 56.
- Vlot A. C., Dempsey D. A., Klessig D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 177-206.
- Wan H., Yuan W., Ye Q., Wang R., Ruan M., Li Z., Zhou G., Yao Z., Zhao J., Liu S. and Yang Y. (2012). Analysis of TIR- and non-TIR-NBS-LRR disease resistance gene analogous in pepper: characterization, genetic variation, functional divergence and expression patterns. *BMC Genomics*, 13: 502.
- Wang B., Wang Y., Wang Q., Luo G., Zhang Z., He C., He S., Zhang J., Gai J., Chen S. (2004). Characterization of an NBS-LRR resistance gene homologue from soybean. *Journal of Plant Physiology*, 161: 815–822.
- Wang B., Zhang Z., Li X., Wang Y., He C., Zhang J., Chen S. (2003). Cloning and analysis of a disease resistance gene homolog from soybean. *Acta Botanica Sinica*, 45: 864–870.
- You-Xiong Q., Li-Ping X., Jian-Wei L. and Ru-Kai C. (2009). Isolation and Characterization of NBS-LRR Resistance Gene Analogs from Sugarcane. *Acta Agronomica Sinica*, 35: 631–639.
- Zhao J., Huang X., Chen Y., Chen Y. and Huang X. (2008). Molecular cloning and Characterization of an Ortholog of NPR1 Gene from Dongguan Dajiao (*Musa* spp.ABB). *Plant Molecular Biology Reporter*, 27(3): 243-249.

