



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE PLANTAS DE TABACO
(*Nicotiana tabacum*) TRANSFORMADAS CON EL
GEN *MaRAR1* DE PLÁTANO (*Musa acuminata*)**

Tesis que presenta:

MERLY ADILENE MARTIN COCOM

Opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Mayo 2014





RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado: "Generación y caracterización molecular de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con el gen *MaRAR1* de plátano (*Musa acuminata*)" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Santy Peraza Echeverría y la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, dentro de la opción Biotecnología perteneciente al programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC

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 periodo 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 en este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto en la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en tenor de lo expuesto en la presente Declaración



Merly Adilene Martín Cocom

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis el Dr. Santy Peraza Echeverría y la Dra. Virginia A. Herrera Valencia, por la oportunidad de realizar esta Tesis de Maestría trabajando en sus proyectos, por compartirme sus conocimientos, consejos, y paciencia estos dos años. Además por brindarme su confianza, apoyo y constante estímulo sobre todo en los momentos difíciles. Agradezco sobretodo la amistad y esos momentos alegres que compartimos y de enseñarme e introducirme en el mundo de la ciencia de la manera más humana posible.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. Santy Peraza Echeverría, Dra. Virginia A. Herrera Valencia, Dr. Víctor Manuel Suárez Solís y al Dr. Luis C. Rodríguez Zapata, por la revisión, sus valiosos consejos, comentarios y sugerencias durante mis evaluaciones.

A mi comité de revisión de tesis, al Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández, Dr. Jorge H. Ramírez Prado y al Dr. Juan Tun Garrido. Por emplear parte de su tiempo para la revisión de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 265356) otorgada para los estudios de maestría, así como al financiamiento del proyecto de CONACYT Ciencia Básica 106289 otorgado para la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., por la formación académica y sus facilidades para llevar a cabo este proyecto. A la Unidad de Biotecnología por el espacio y equipos proporcionados.

Al M. en C. Miguel Ángel Vallejo Reyna por su gran ayuda técnica en el laboratorio. Tu motivación positiva y voluntad por enseñarme todos los días, he tenido la suerte de aprender contigo durante la tesis. Gracias por confiar en mí y por brindarme tu amistad que es muy valiosa para mí.

A la Q.B.A Ileana Cecilia Borges Argáez por su apoyo técnico y atención brindada para la realización de este trabajo, sin duda tus consejos fueron muy valiosos.

Sin duda, donde más tiempo he estado ha sido en el laboratorio, gracias a todos los que están y a los que estuvieron. Especialmente a:

Alejandra, Miguel Ángel, Shirley, Margarita y Paty por compartir muchas cosas conmigo, por su apoyo, por esas sonrisas y cariño diario. Ángeles por tu amistad y estar siempre dispuesta a ayudarme cuando lo requería. A Daniela, Rodrigo, Melissa, Ernesto, Any y Maru, por todos esos momentos agradables dentro y fuera del laboratorio y por su amistad.

A mis padres, Augusto y Elia por ser mi gran motivación, por todo el amor que me dan y su gran apoyo incondicional, por compartir mis alegrías y porque siempre están ahí para alentarme en los momentos difíciles.

A mis hermanas Diana y Soky, por su gran amor, apoyo, consejos. Simplemente gracias por ser parte de mi vida y por ser las mejores hermanas.

Daniel por permitirme conocerte, por tu amor, comprensión y sobre todo por tu gran paciencia. Siempre alentándome y que mis días fueran más alegres. Gracias por hacerme feliz.

Finalmente, quisiera agradecer a todas esas personas que me apoyaron de cierta forma para que este trabajo fuera posible.

DEDICADA:

A mis padres Augusto y Elia con todo mi cariño y mi amor para ustedes que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A mis hermanas Diana y Sokí, por apoyarme incondicionalmente, por sus consejos y ayuda, las quiero mucho.

A Daniel por todo el apoyo que me brindas, tu amor, por alentarme en los momentos difíciles y hacer de mi vida más alegre. Te amo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO I.....	7
1.1 ANTECEDENTES GENERALES	7
1.1.1 Origen e historia del plátano	7
1.1.2 Biología y clasificación taxonómica del plátano.....	8
1.1.3 Cultivo y economía	9
1.1.4 Importancia del plátano en México.....	12
1.1.5 Problemáticas en la producción de plátano.....	13
1.1.5.1 Sigatoka negra, <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	14
1.1.5.2 Sigatoka negra en México	16
1.1.6 Biotecnología aplicada en plátano	16
1.1.7 Mecanismos moleculares de resistencia de las plantas en respuesta al ataque de patógenos	18
1.1.8 Respuestas de defensa inducidas en plantas	21
1.1.9 Señalización tras el reconocimiento.....	22
1.1.10 La proteína RAR1 y su participación en la resistencia contra patógenos ..	22
1.1.11 Sobre-expresión de <i>RAR1</i> en plantas transgénicas y su efecto en la resistencia contra patógenos	25
1.1.12 RAR1 y su interacción con otras proteínas co-chaperonas	26
1.1.13 RAR1 en plátano.....	28
1.1.14 Tabaco como planta modelo.....	29
1.2 HIPÓTESIS	31
1.3 OBJETIVOS	31
1.3.1 Objetivo general.....	31
1.3.2 Objetivos particulares.....	31
1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	33
1.5 BIBLIOGRAFÍA.....	34
CAPÍTULO II.....	41
2.1 INTRODUCCIÓN.....	41
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	43

2.2.1 Análisis in silico.....	43
2.2.1.1 Obtención de secuencias homólogas a MaRAR1 de plátano en otras especies de plantas.....	43
2.2.1.2 Alineamiento múltiple de secuencias tipo RAR1 de diferentes especies de plantas	43
2.2.1.3 Modelaje por homología de la estructura tridimensional de la secuencia tipo RAR1 de plátano	43
2.2.2 Elaboración del pC35SMa para la transformación genética de tabaco.....	44
2.2.2.1 Multiplicación de los plásmidos pGRAR1 y pC35NOS.....	44
2.2.2.2 Subclonación de <i>MaRAR1</i> en pCAMBIA 2200 para dar lugar a pC35SMa	45
2.2.3 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el pC35SMa	47
2.2.3.1 PCR múltiple para la comprobación de la transformación de <i>A. tumefaciens</i>	47
2.2.4 Transformación de plantas de tabaco mediante <i>A. tumefaciens</i> con el plásmido pC35SMa	48
2.2.6 Extracción de ADN de plantas de tabaco.....	50
2.2.7 Detección por PCR de la presencia del transgén <i>MaRAR1</i> en líneas de tabaco transformadas con pC35SMa.....	50
2.2.8 Germinación de semillas de la generación T ₁ de <i>Nicotiana tabacum</i>	51
2.2.9 Southern blot	51
2.2.9.1 Digestión con la enzima EcoRI.....	51
2.2.9.2 Southern blotting	52
2.2.9.3 Marcaje de la sonda de ADN.....	52
2.2.9.4 Prehibridación e hibridación	52
2.2.9.5 Detección quimioluminiscente	53
2.2.10 Extracción de ARN en plantas de tabaco.....	53
2.2.11 Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría.....	54
2.2.12 Síntesis de ADN complementario.....	54
2.2.13 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	55
2.3 RESULTADOS	56
2.3.1 Alineamiento múltiple de <i>MaRAR1</i> de plátano con proteínas RAR1 de otras plantas.....	57

2.3.2 Modelaje por homología de la estructura tridimensional de MaRAR1 de plátano.....	58
2.3.3 Subclonación del gen <i>MaRAR1</i> en pCAMBIA2200 para dar lugar a pC35SMA.....	60
2.3.4 Análisis de colonias de <i>A. tumefaciens</i> transformadas con pC35SMA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	61
2.3.5 Generación de plantas de tabaco transformadas con el plásmido pC35SMA	62
2.3.6. Evaluación de la presencia del transgén en plantas de tabaco transgénicas de la generación T ₀	63
2.3.7 Germinación de semillas de la generación T ₁ de tabaco transgénicas.....	64
2.3.8. Evaluación de la presencia del transgén en plantas de tabaco transgénicas de la generación T ₁	65
2.3.9 Expresión de MaRAR1 en plantas transgénicas de tabaco.....	66
2. 4 DISCUSIÓN.....	68
2. 5 CONCLUSIONES.....	75
2. 6 PERSPECTIVAS	77
2. 7 BIBLIOGRAFÍA.....	79
ANEXOS.....	85
ANEXO 1	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. 1. Estructura morfológica de la planta de plátano.....	9
Figura 1. 2. Producción en millones de toneladas de principales países productores de plátano.....	11
Figura 1. 3. Mapa de las zonas productoras de plátano en México.....	13
Figura 1. 4. Síntomas causados por Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>) en plantas de plátano (<i>Musa sp</i>).....	14
Figura 1. 5. Ciclo de vida del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i> , agente causal de la Sigatoka negra.....	15
Figura 1. 6. Modelo de evolución de la resistencia a microorganismos en plantas.....	20
Figura 1. 7. Estructura tridimensional del dominio CHORD II de RAR1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
Figura 1. 8. Ruta de activación de RAR1 a partir de estudios de pérdida de función. .	24
Figura 1. 9. Aumento de la resistencia basal en plantas transgénicas de arroz ante <i>Magnaporthe oryzae</i>	25
Figura 1. 10. Estructura cristalina de la interacción de HSP90-SGT1-RAR1.....	28
Figura 2. 1. Plásmido pCAMBIA2200.....	46
Figura 2. 2. Alineamiento por el programa CLUSTAL X de la secuencia MaRAR1 de plátano con secuencias RAR1 de otras especies de plantas	58
Figura 2. 3. Modelaje tridimensional por homología del dominio CHORD II de la proteína MaRAR1 de plátano.....	59
Figura 2. 4. Obtención del pC35Sma	60
Figura 2. 5. Electroforesis de la PCR múltiple de <i>A. tumefaciens</i>	61
Figura 2. 6. Distintas fases de regeneración de tabaco.....	62
Figura 2. 7. Plantas de tabaco transgénicas	63
Figura 2. 8. Germinación de semillas de la generación T ₁ de plantas de tabaco transformadas con el gen <i>MaRAR1</i>	64
Figura 2. 9. Análisis de PCR de las plántulas transgénicas de la generación T ₁ de <i>N. tabacum</i> cv. petit havana SR1 (L-MA1(2) a L-MA4(6)).....	65
Figura 2. 10. Southern blot de cuatro líneas transgénicas de tabaco (generación T ₁) que contienen al gen <i>MaRAR1</i> de plátano.....	66

Figura 2. 11. Amplificación por medio de RT-PCR del gen EF1 α en las líneas transgénicas de la generación T ₁ de tabaco	67
---	----

Figura 2. 12. Amplificación por medio de RT-PCR del gen <i>MaRAR1</i> en las líneas transgénicas de tabaco.....	67
---	----

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2. 1. Oligonucleótidos específicos de los genes <i>MaRAR1</i> de plátano y <i>VirG</i> de <i>A. tumefaciens</i>	48
--	----

Cuadro 2. 2. Medios de cultivo para la transformación genética de <i>Nicotiana tabacum</i> con <i>A. tumefaciens</i>	50
--	----

Resumen

El plátano es uno de los frutos tropicales más importantes del mundo; su cultivo constituye un alimento básico en numerosos países en desarrollo y genera ingresos a la canasta familiar. Sin embargo, la producción y la calidad del fruto del plátano son afectadas por enfermedades como la Sigatoka negra, ocasionando grandes pérdidas económicas. Una alternativa con gran potencial para el combate de esta enfermedad en armonía con el ambiente es la de desarrollar plantas de plátano resistentes a través de mejoramiento genético. La disponibilidad de la secuencia genómica de plátano abre enormes posibilidades para el descubrimiento de genes que participan en la defensa contra patógenos de la planta. Uno de esos genes es el de la co-chaperona RAR1, identificada en cebada y requerida para generar resistencia contra el hongo *Blumeria graminis*. En un trabajo previo de nuestro laboratorio, se aisló y caracterizó el ADN complementario de un gen *RAR1* de plátano que fue nombrado como *MaRAR1*. El objetivo del presente trabajo fue generar plantas transgénicas de tabaco que expresen de manera constitutiva el gen *MaRAR1* con la perspectiva de utilizarlas en el futuro como modelo de estudio para hacer análisis funcionales de este gen. Primero se caracterizó la secuencia de aminoácidos de la proteína MaRAR1, y se encontró que los dominios CHORD I y CHORD II se encuentran altamente conservados. Además, se realizó el modelo tridimensional por homología de la proteína de MaRAR1. Se obtuvo una construcción de expresión con el promotor 35S, el gen *MaRAR1* y el terminador NOS, la cual se utilizó para transformar tabaco mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Se obtuvieron cuatro líneas transgénicas de tabaco: L-MA1, L-MA2, L-MA3 y L-MA4. Se comprobó la integración del transgén en el genoma de las plantas transgénicas de tabaco de la generación T₀ y T₁ por medio de PCR. Se determinó el número de copias de las diferentes líneas mediante Southern blot, siendo la línea L-MA1(2) la que presentó el mayor número de inserciones con al menos cuatro copias del transgén. Además, se realizó el análisis de expresión a través de RT-PCR, y se comprobó que las cuatro líneas transgénicas obtenidas presentaron transcripción del transgén. Se logró la generación T₂ de las cuatro diferentes líneas transgénicas de tabaco con *MaRAR1*, mismas que se encuentran disponibles para utilizar en estudios posteriores para evaluar su funcionalidad en la resistencia de plantas contra patógenos como bacterias y hongos y determinar su potencial uso biotecnológico.

Abstract

Banana is one of the most important tropical fruits in the world, since it is a staple food in many developing countries and generates revenues for the local economy. However, production and fruit quality of bananas are affected by diseases such as black Sigatoka, causing great economic losses. A promising option for battling this disease is the development of disease resistant banana through genetic improvement. The availability of the banana genome sequence opens up vast possibilities for the discovery of genes involved in defense against plant pathogens. One such gene is the one encoding the co-chaperone RAR1, identified in barley and required to generate resistance against *Blumeria graminis* fungus. In a previous study from our laboratory, a cDNA of a banana RAR1 gene, *MaRAR1*, was isolated and characterized. The aim of the present study was to generate transgenic tobacco plants which constitutively express the *MaRAR1* gene with the prospect of future functional analysis of this gene. First, the amino acid sequence of the protein MaRAR1 was characterized, finding that the CHORD I and CHORD II domains were highly conserved. An expression construct was obtained with the 35S promoter, *MaRAR1* gene and the NOS terminator, which was then used to transform tobacco plants through *Agrobacterium tumefaciens*. Four transgenic lines of tobacco were obtained: L-MA1, L-MA2, L-MA3 and L-MA4. Integration of the transgene was verified in the genome of T₀ and T₁ transgenic tobacco plants by PCR. The number of transgene copies was determined by Southern blot, with the L-MA1(2) line having the highest number with at least four copies of the transgene. Furthermore, the analysis of transgene expression was carried out by RT-PCR, and it was found that all four transgenic lines obtained showed transgene transcription. The T₂ generation was obtained for all the different transgenic lines of tobacco, and they are available to use in future studies to assess *MaRAR1* function in conferring resistance against pathogens such as bacteria and fungi, as well as to assess its potential biotechnological value.

INTRODUCCIÓN

El plátano (*Musa acuminata*) es uno de los frutos tropicales más importante del mundo, es considerado un producto básico y de exportación, fuente de empleo e ingresos en numerosos países en desarrollo. En México, se cultiva principalmente en los estados de Chiapas, Veracruz, Tabasco y Oaxaca (SAGARPA, 2013). El plátano constituye una de las bases de la alimentación humana al proporcionar una fuente importante de vitaminas y minerales. Sin embargo, la producción del plátano es limitada por muchas enfermedades, como la Sigatoka negra (SN) causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* que ocasiona necrosis en las hojas, madurez precos de los frutos y en etapas avanzadas la muerte de la planta. Los cultivares de plátano más importantes y más extensamente cultivados, son susceptibles a esta enfermedad; tal es el caso del cultivar 'Enano Gigante'. El uso de fungicidas químicos es la forma más común de controlar esta enfermedad, lo cual significa entre un 30 a un 40% de los costos de producción, además de producir trastornos a los ecosistemas, a la salud humana y la aparición de cepas resistentes que demandan cambios constantes del fungicida que se está aplicando (Orozco-Santos y Orozco-Romero, 2004). Por tanto, es de suma importancia desarrollar proyectos de investigación que busquen el desarrollo de la resistencia contra la SN en plátano y esto se podría lograr a través de la ingeniería genética. En este sentido, la utilización de genes que participan en la defensa contra patógenos, como por ejemplo *RAR1*, representaría una opción que ayude a reducir las pérdidas producidas por estos patógenos. Además, esta tecnología permitiría mantener las características organolépticas que hacen interesante a un cultivar determinado.

Las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos moleculares de reconocimiento de patógenos y de activación de la respuesta de resistencia (Malnoy *et al.*, 2006). Los genes de resistencia a enfermedades en plantas (genes R) codifican para proteínas que detectan patógenos y desencadenan una señal de alerta mediante transducción de señales, las cuales activan un número de respuestas tempranas que conducen a la producción de un amplio espectro de moléculas de defensa. Los genes R codifican para proteínas que detectan patógenos mediante el reconocimiento de moléculas efectoras, desencadenando rutas de transducción de señales que activan la expresión de genes relacionados con patogénesis (genes PR). A menudo las proteínas R requieren de otras proteínas para llevar a cabo su actividad; ejemplo de lo anterior es

la proteína RAR1, identificada en cebada y requerida para generar resistencia contra el hongo *Blumeria graminis* (Shirasu *et al.*, 1999). En estudios de mutación genética de *rar1* en *Arabidopsis thaliana*, se observó un aumento de la susceptibilidad a patógenos virulentos, por lo que se sugirió que RAR1 juega un papel importante en la defensa basal de *A. thaliana* (Holt *et al.*, 2005). En el 2008 Wang y colaboradores sobre-expresaron al gen *OsRAR1* en plantas de arroz, y observaron que al ser inoculadas con el hongo *Magnaporthe oryzae* el daño ocasionado por el patógeno era menor en las líneas transgénicas de arroz en comparación con las silvestres. En un trabajo previo de nuestro laboratorio, Canul (2010) aisló y caracterizó el ADN complementario de un gen tipo *RAR1* a partir de una variedad de plátano resistente a SN, el cual fue nombrado como *MaRAR1*.

Los métodos de biología molecular ofrecen la posibilidad de clonar y caracterizar genes relacionados con la defensa de las plantas, así como su posterior introducción en diferentes cultivares por transformación genética. En años recientes la ingeniería genética en plátano ha avanzado significativamente: ya se cuentan con protocolos de transformación genética, clonación de genes, y la reciente publicación del genoma de plátano. Sin embargo, el plátano es una planta que requiere de más tiempo para su regeneración y por tanto su estudio, por lo que el uso de plantas modelo como tabaco acelerarían este proceso. Tabaco es una planta que se ha usado como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes para el estudio funcional de genes involucrados en estrés biótico y abiótico. Por todo lo anterior, en el presente trabajo el objetivo fue generar y caracterizar molecularmente plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con el gen *MaRAR1* de plátano (*Musa acuminata*). Lo anterior permitirá el estudio funcional del gen *MaRAR1* en tabaco, que podría ser considerado como un potencial para generar plantas de plátano u otras plantas de importancia comercial con resistencia a plagas como hongos, nemátodos, etc.

CAPÍTULO I

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Origen e historia del plátano

El género *Musa* es un taxón con más de 50 millones de años y se han diversificado en gran parte de la gran región del sudeste asiático. Las especies *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* se separaron hace aproximadamente 4.6 millones de años (ENV/JM/MONO, 2009). El centro de origen de este grupo es en el sureste de Asia, abarcando un área de la India hasta Polinesia, en la cual las plantas del género *M. acuminata* y *M. balbisiana* se distribuyen principalmente en los márgenes de los bosques tropicales (Simmonds, 1962; Manzo *et al.*, 2005; Heslop-Harrison y Schwarzacher, 2007).

Las referencias más antiguas relativas al cultivo del plátano proceden de la India, entre los años 500-600 antes de Cristo. Otra referencia encontrada en los escritos del budismo Jataka, hacia el año 350 antes de Cristo, sugiere la existencia, hace 2000 años, de una fruta tan grande como "colmillo de elefante". Al África fue llevado desde la India, a través de Arabia, y luego rumbo al sur, atravesando Etiopía hasta el norte de Uganda aproximadamente en el año 1300 D.C. El plátano fue llevado a las Islas Canarias por los Portugueses después de 1402 (ENV/JM/MONO, 2009; Vázquez *et al.*, 2005). Se tiene la creencia de que fueron los árabes quienes inicialmente llevaron plantas de plátano a España y de allí fue traído a América por los padres dominicos (INIBAP, 1995; Palencia *et al.*, 2006).

La mayoría de los plátanos comestibles tienen origen en dos especies silvestre: *M. acuminata* (genoma AA) y *M. balbisiana* (genoma BB); mediante la selección humana para darle vigor y tamaño a la fruta ocasionaron que por poliploidía e hibridación se generaran las variedades cultivadas (Ploetz *et al.*, 2007; ENV/JM/MONO, 2009). Los cultivares diploides pueden pertenecer al grupo de genoma AA o AB, mientras que los cultivares triploides se dividen en tres grupos genómicos: AAA, AAB y ABB (<http://www.promusa.org>). Los cultivares comestibles poseen nombres comunes como banano, plátano, guineo. El grupo genómico AAA de los cultivares triploides comestibles presentan tres juegos de cromosomas, derivado originalmente de *M. acuminata* a través de la domesticación humana. Este grupo genómico ha diversificado originalmente en el sudeste asiático a través de la hibridación entre

diploides y gametos haploides de los cultivares AA y subespecies silvestres de *M. acuminata*. Debido a que los cultivares AA eran a menudo el producto de un evento de hibridación entre diferentes subespecies de *M. acuminata*, esto creó incompatibilidad cromosómica dando lugar a errores durante la meiosis con un polen haploide generando frutos sin el desarrollo de semillas o polinización y fecundación (Simmonds, 1962; Heslop-Harrison y Schwarzacher, 2007; <http://www.promusa.org>).

1.1.2 Biología y clasificación taxonómica del plátano

El plátano pertenece a la Familia botánica Musaceae, que a su vez alberga a los géneros *Musa* y *Ensete*. Existen aproximadamente 50 especies dentro del género *Musa*, la cual se divide en cuatro secciones: *Callimusa*, *Rhodochlamys*, *Australimusa* y *Eumusa* (Heslop-Harrison y Schwarzacher, 2007). La sección *Eumusa*, es la más ampliamente representada comercial y geográficamente y contiene las dos principales especies *M. acuminata* y *M. balbisiana*, las cuales dan origen a la gran mayoría de los plátanos comestibles (Roux *et al.*, 2008).

Los plátanos son plantas monocotiledóneas, herbáceas grandes, polipliodes y perennes pero monocárpicas adaptadas a regiones tropicales y subtropicales. Se pueden distinguir tres partes importantes de la planta: el cormo con hijuelos y el sistema radical, el pseudotallo con el sistema foliar y el racimo o inflorescencia (Fig. 1.1). El tallo subterráneo (cormo, rizoma) tiene internodos cortos. El punto terminal de crecimiento del cormo produce hojas en una sucesión en espiral. Las hojas normales consisten de una vaina, un peciolo y una lámina. Las vainas son casi circulares y empacadas en el pseudotallo no leñoso (Manzo *et al.*, 2005). El peciolo es de 30-90 cm de longitud. En una planta saludable, las hojas más antiguas son empujadas a un lado hasta que caen hacia abajo y secan. El pseudotallo de la planta de plátano produce un brote de flores una vez durante su ciclo de vida y muere después de haber dado sus frutos, pero el cormo sigue vivo y produce nuevos hijuelos. La inflorescencia se desarrolla en una etapa determinada de desarrollo de la planta, por lo general después de producir unas 25-50 hojas. Aproximadamente un mes después de producirse esa cantidad de hojas, emerge en la hoja superior la inflorescencia colgando hacia abajo, la cual es una panícula compuesta por un tallo grueso con racimos de flores en espiral. Cada racimo tiene de 12 a 20 flores en dos filas, cubiertas por una gran bráctea púrpura. Los primeros 5 a 15 racimos de flores que emergen son

funcionalmente femeninas y dan crecimiento a los frutos, mientras que las flores subsecuentes son masculinas. El fruto del plátano es una baya, que contiene muchos óvulos pero sin semilla dentro de las variedades cultivadas. Los frutos se desarrollan por partenocarpia (sin fecundar). El racimo crece hacia abajo, y los frutos hacia arriba. El racimo de frutos es generalmente llamado "mano" y un fruto "dedo", este último puede variar de cultivar a cultivar de acuerdo a su tamaño, forma, color, textura y sabor (Roux *et al.*, 2008).

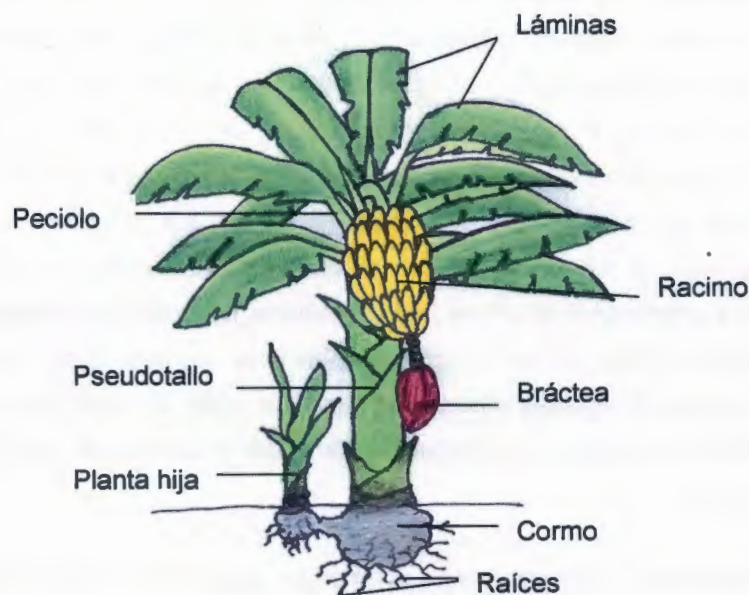


Figura 1. 1. Estructura morfológica de la planta de plátano (Dibujo: Virginia Herrera).

1.1.3 Cultivo y economía

Los plátanos de postre y de cocción son uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, se cultivan en más de 130 países a lo largo de las regiones tropicales y en algunas regiones subtropicales de Asia, África, América Latina, el Caribe y el Pacífico. La producción mundial es difícil de determinar porque las plantas son a menudo producidas localmente en pequeñas parcelas (por ejemplo, los huertos familiares) y los frutos se consumen localmente. Las variedades más importantes desde el punto de vista económico pertenecen a la sección *Eumusa* (Augstburger *et al.*, 2002; Roux *et al.*, 2008).

Los plátanos desarrollan una masa de pulpa comestible sin necesidad de la polinización, los óvulos se atrofian pronto, pero pueden reconocerse en la pulpa comestible. Las zonas tropicales son óptimas para el desarrollo del cultivo del plátano, debido a que son húmedas y cálidas. El plátano requiere para su normal crecimiento y buena producción de 120 a 150 mm de lluvia mensual o 1.800 mm anuales, bien distribuidas, necesita temperaturas relativamente altas, entre 21 y 29° C, con una media de 27° C, su mínima absoluta es de 15° C y su máxima de 37° C, exposiciones a temperaturas mayores o menores causan deterioro y lentitud en el desarrollo del fruto y daños en el mismo. Para el crecimiento y desarrollo normal del plátano se necesita que el suelo tenga disponibles, en cantidades óptimas y balanceadas, ciertos elementos nutritivos como el nitrógeno, potasio y azufre; de lo contrario se deben suministrar a partir de fuentes alternativas orgánicas y químicas. La siembra se lleva a cabo en hoyos de 60 cm de profundidad a una distancia de 3 a 3.5 m en cuadro, colocando dos plantitas por hoyo. Las plantas se cortan cuando han alcanzado su completo desarrollo y empiezan a amarillear, con frecuencia, se anticipa la recolección y se dejan madurar los frutos suspendiéndolos en un local cerrado, seco y cálido, conservado en la oscuridad. Apenas recogido el fruto, se corta la planta por el pie, dejando a los hijuelos sanos y vigorosos en la base (Palencia *et al.*, 2006; <http://www.siap.gob.mx>).

El plátano es el cuarto cultivo más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz. Además de ser considerado un producto básico y de exportación, constituye una importante fuente de empleo e ingresos en numerosos países en desarrollo. El plátano como fruta tropical se considera el segundo más importante por su consumo mundial, así como por su contenido de fuentes de carbono, almidón, vitaminas y minerales (Manzo *et al.*, 2005).

Los plátanos proporcionan un alimento básico para millones de personas, particularmente en África (con un consumo de 400 kg por persona por año) y Asia. Los plátanos son cultivados por todos los trópicos húmedos y subtropicales en las Américas, África y Asia (representando un tercio de su producción), extendiéndose dentro de Europa (Islas Canarias) y Australia (Queensland), en donde es apreciado por su sabor, gran valor nutritivo y por su disponibilidad durante todo el año (Heslop-Harrison y Schwarzacher, 2007).

De acuerdo a la FAO, en el 2011 se estima que a nivel mundial el plátano se cultiva en una superficie de un poco más de 10 millones de hectáreas y se producen aproximadamente 106 millones de toneladas de fruta por año, de las cuales un poco más de 10% es exportable y las ganancias del comercio de exportación de esta fruta se estima en \$8,000 millones de dólares al año. En la figura 1.2 se observan los principales países productores de plátano, los cuales son: India, Filipinas, Brasil, Ecuador, Colombia, Indonesia y China entre otros. México está considerado dentro de los 10 países más importantes (FAO, 2013).

Alrededor del 87% de todos los plátanos cultivados en el mundo son producidos por agricultores en pequeña escala para consumo doméstico o para los mercados locales y regionales, mientras el 13% restantes, principalmente plátanos de postre, son para el comercio internacional (Roux *et al.*, 2008).

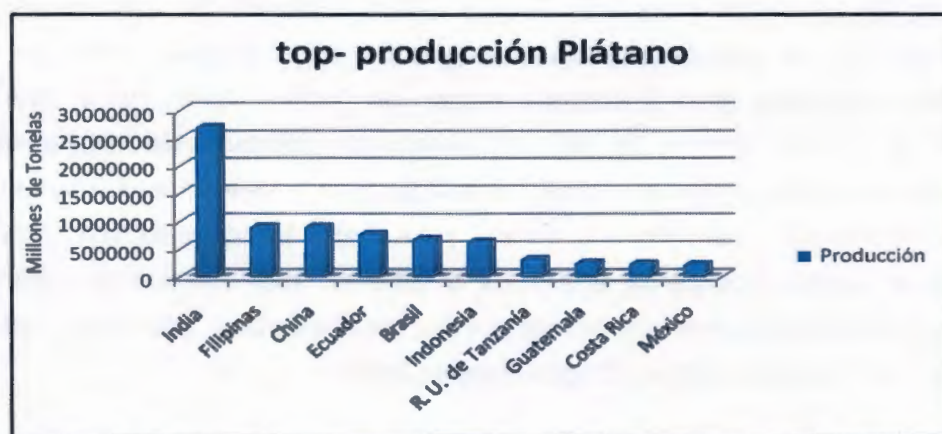


Figura 1. 2. Producción en millones de toneladas de principales países productores de plátano (Fuente: FAOSTAT, 2011).

1.1.4 Importancia del plátano en México

A nivel mundial, México ocupa el décimo lugar en producción de plátano (FAOSTAT, 2013; Fig. 1.2), lo que significa una gran fuente generadora de trabajo, ya que la actividad permite contar con 100 mil empleos directos en el campo y 150 mil empleos indirectos, además que la producción anual representa el 1.4 por ciento del valor de la producción agrícola nacional, que equivale a más de 4 mil 500 millones de pesos al año (SAGARPA, 2009).

Según datos del Servicio de Información de Agroalimentaria y Pesca (SIAP) de la SAGARPA, en 2011 se cultivaron en México alrededor de 77,303 hectáreas de plátano, de la cual se obtuvo una producción de 2,138, 686 toneladas de fruta, donde el 95% se destinó al consumo nacional y un 5% restante a la exportación. Las áreas productoras se localizan en las regiones tropicales de la costa del Golfo de México y Océano Pacífico. Los principales estados productores son Chiapas, Veracruz, Tabasco, Nayarit, Colima, Michoacán, Oaxaca, Jalisco y Guerrero (Fig. 1.3), los cuales se agrupan en tres regiones productoras: Región del Golfo de México que ocupa el 43% de la superficie nacional cultivada, Región del Pacífico Centro con el 24% y Región del Pacífico Sur con un 30%. En México las variedades de plátano más importantes que se cultivan son: AAA ('Enano Gigante' y Valery), AAB (Manzano, Macho y Dominico), ABB (Pera o Cuadrado) y AA (Dátil). Siendo el cultivar 'Enano gigante' el principal ocupando el 75% de la superficie total cultivada de plátano, seguida por el Macho con el 14%, Manzano 4.5%, Dominico y Dátil 2.8%, Pera 1.8% y el Valery 0.4% (Orozco-Santos y Orozco-Romero, 2004).



Figura 1. 3. Mapa de las zonas productoras de plátano en México (Manzo *et al.*, 2005).

1.1.5 Problemáticas en la producción de plátano

El plátano es afectado por diversas enfermedades y plagas que afectan su rendimiento y calidad del fruto (Orozco-Santos y Orozco-Romero, 2004). Entre las enfermedades que causan severos daños en las plantaciones plataneras se encuentran el mal de Panamá causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, y la ocasionada por el virus BBTV (Banana bunchy top virus) del plátano; una plaga importante es el nemátodo perforador de plátano *Radopholus similis*. La Sigatoka negra (debido al color pardo oscuro o negro de las rayas y manchas) causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* (forma imperfecta *Pseudocercospora fijiensis*), es la enfermedad más destructiva y devastadora de las hojas de plátano a escala mundial (Marín *et al.*, 2003).

1.1.5.1 Sigatoka negra, *Mycosphaerella fijiensis*

El rayado negro de la hoja o Sigatoka negra (SN), causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, es la enfermedad del follaje más destructiva del plátano. Este patógeno se caracteriza por causar infecciones y manchas foliares que reducen el área fotosintética de las plantas, causando la madurez prematura de los frutos y como consecuencia la disminución de la producción de fruta en un 38% (Fig. 1.4). *M. fijiensis* se encuentra ampliamente distribuido en la mayoría de los países productores del mundo, incluyendo las regiones plataneras de México. Esta enfermedad se detectó por primera vez en 1963 en las islas Fiji (Manzo *et al.*, 2005).

Una de las principales fuentes de diseminación de este hongo es a través del viento, la lluvia y rocío de agua, permitiendo a las esporas (ascosporas y conidios) viajar hasta el sitio donde se inocularán. *M. fijiensis* presenta en su ciclo de vida (Fig. 1.5), un estado perfecto que es la fase ascógena o sexual que se caracteriza por la formación de peritecios, espermagonios y ascosporas, y un estado imperfecto que es la fase conídica o asexual, la cual es reconocida porque los conidios son hialinos, obclavados a cilíndricos, rectos o ligeramente curvos, 6 a 9 septos, delgados en el ápice y más anchos en la base con una cicatriz en el hilum basal del conidio (Manzo *et al.*, 2005).



Figura 1. 4. Síntomas causados por Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plantas de plátano (*Musa sp*) (Churchill, 2010).

El patógeno establece una relación biotrófica durante 3 a 4 semanas después de la penetración por el estoma antes de la aparición de síntomas necróticos. Sin embargo, conforme la biomasa del hongo va aumentando y demandando más nutrientes se convierte en patógeno necrótico al provocar la muerte celular de las hojas, llegando a sobrevivir en las partes muertas del huésped. Este comportamiento dual define a *M. fijiensis* como patógeno hemibiótrofo (Manzo *et al.*, 2005).

El desarrollo de la enfermedad es favorecido cuando existe alta humedad y altas precipitaciones, mientras que las temperaturas menores 20° C y periodos secos inhiben el crecimiento del hongo (Manzo *et al.*, 2005).



Figura 1. 5. Ciclo de vida del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra. Infección en la hoja de *Musa* spp. causada por *M. fijiensis* (Imagen tomada y modificada de Churchill, 2010).

1.1.5.2 Sigatoka negra en México

En México esta enfermedad se identificó por primera vez en el Sureste del país en 1981, donde el primer reporte oficial del hongo causante de la SN afectando plantaciones comerciales del plátano fue en los estados de Chiapas y Tabasco. Sin embargo, la enfermedad fue observada por primera vez en el área de Tapachula (Chiapas) a finales de 1980. Posteriormente la SN se diseminó hacia los estados de Veracruz y Oaxaca, y ahora esta enfermedad se encuentra en todas las áreas productoras de plátano en la República Mexicana (Orozco *et al.*, 2002).

La presencia de SN en México ocasionó graves pérdidas en todas las regiones productoras de plátano, modificando el manejo de las plantaciones, principalmente los programas de aspersión de fungicidas. Esto trajo como consecuencia un incremento en los costos de producción del cultivo. Actualmente, el combate de la enfermedad en las regiones plataneras del país, depende básicamente del uso de productos químicos (fungicidas), ya que es la medida más viable y efectiva para reducir los daños de la enfermedad, aunque también es apoyada con otras prácticas de cultivo como el deshoje, deshije, densidad de la plantación, drenaje, control de malezas y fertilización (Manzo *et al.*, 2005). En México el costo de la aplicación de fungicidas representa del 30 al 40% de los costos de producción, lo que significa que anualmente se gastan alrededor de 500 millones de pesos (43.5 millones de dólares) para el control de la SN (Orozco-Santos y Orozco-Romero, 2004). Ya que el combate químico es la opción más viable para el control de SN en los cultivares de plátano más comerciales en México, esto ha originado que además del incremento en los costos de producción del cultivo, se estén presentando problemas de contaminación ambiental, de salud humana y de resistencia a fungicidas, debido a la gran cantidad de productos químicos que se depositan en las plantaciones de plátano (Orozco-Santos y Orozco-Romero, 2004).

1.1.6 Biotecnología aplicada en plátano

Con la finalidad de contar con cultivos de plátano resistentes a enfermedades, se ha recurrido a las técnicas tradicionales de cruza entre variedades resistentes. El Programa de mejoramiento de banano y plátano de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), han liberado híbridos (Ej. FHIA-01, FHIA-18, FHIA-21 y

FHIA 25), los cuales cuentan con excelentes características de racimo y planta y son resistentes o tolerantes a la SN y/o amarilla, así como al Mal de Panamá. En general tienen un adecuado rango de adaptación a condiciones de suelo y clima, y aunque algunos de ellos no son perfectos en sus características de calidad de fruto (sabor, olor, consistencia etc.) o duración de vida de anaquel, pueden ser cultivados y aprovechados a su máximo potencial si se usan las prácticas agronómicas adecuadas; sin embargo, este proceso se ve obstaculizado debido a su largo tiempo de generación y porque las variedades cultivadas son triplodes estériles ya que no producen semillas (Rosales y Pocasangre, 2002; Gómez *et al.*, 2004).

Este tipo de mejoramiento no ha sido posible de aplicar a los cultivares comerciales (Ej. 'Enano Gigante') debido a que son poliploides estériles. Por lo que la biotecnología a través de la transformación genética representa una alternativa atractiva para generar variedades de plátano resistentes a patógenos y plagas (Crouch *et al.*, 1998; Pua, 2007). La disponibilidad de los genes responsables de características útiles es importante para el esclarecimiento de los mecanismos que regulan el crecimiento y desarrollo, las respuestas de las plantas a estreses bióticos y abióticos a nivel molecular, y para el mejoramiento del plátano mediante ingeniería genética. Durante los últimos años, varios intentos se han hecho para clonar y caracterizar genes en plátano. Varios genes han sido aislados de la fruta de plátano y su identidad ha sido determinada putativamente por homología de secuencia con las secuencias genéticas publicadas y depositadas en la base de datos GenBank (Pua, 2007).

En los últimos años se han caracterizado varios genes relacionados con la defensa hacia patógenos en plantas de plátano. Estos incluyen β -1,3-glucanasas, quitinasas, polifenol oxidasa (PPO) y polipéptidos ricos en cisteína (MLP), los cuáles pueden inhibir el crecimiento micelial de algunos hongos fitopatógenos y activar mecanismos de defensa en las plantas, en el control de enfermedades causadas por hongos fundamentalmente (Pua, 2007).

El cultivo de tejidos se utiliza para el intercambio de germoplasma, conservación y multiplicación rápida de plantas (Crouch *et al.*, 1998). La propagación *in vitro* tiene muchas ventajas, tales como tasas más altas de la multiplicación en condiciones asépticas (libres de plagas y enfermedades) de material de siembra y la pequeña cantidad de espacio necesario para multiplicar numerosas plantas. Existen técnicas de micropropagación de plátano que se desarrollaron durante las últimas décadas y ahora

están bien establecidas (Crouch *et al.*, 1998). Los ápices y meristemos se originan de los retoños que son los explantes comunes que se utilizan para la micropropagación del plátano. Las plantas de plátano también puede ser regeneradas a partir de células cultivadas a través de embriogénesis somática (SE) (ENV/JM/MONO, 2009). Utilizando el sistema bien establecido para el cultivo de tejidos, se han hecho intentos para transformar plátanos en diferentes laboratorios en los últimos años. La primera transformación por *A. tumefaciens* se logró utilizando meristemos del cultivo de tejidos de plantas de Cavendish AAA ('Enano Gigante') (May *et al.*, 1995; ENV/JM/MONO, 2009). Además, se han generado plantas transgénicas utilizando el bombardeo de partículas (May *et al.*, 1995;).

Sági *et al.* (1994) fueron los primeros en reportar el éxito de la transferencia del gen que codifica para una β -glucuronidasa utilizando electroporación en protoplastos aislados a partir de células embriogénicas de plátano cv. 'Bluggoe'. Al año siguiente, el mismo grupo de investigación reportó una transformación y la producción de plantas transgénicas de plátano usando bombardeo de partículas en células de suspensión embriogénicas.

Recientemente, un avance importante fue la publicación en el 2012 de la secuencia del genoma de *M. acuminata* (DH-Pahang), la cual consta de 472.2 Mega bases (Mb) en la cual se identificaron 36, 542 genes (D'Hont *et al.*, 2012). Con ello resulta más fácil la búsqueda de genes involucrados en respuesta a enfermedades de manera dirigida y sistemática, de tal forma que permitan realizar mejoramiento genético en este cultivo mediante el uso de técnicas de ingeniería genética y biología molecular.

1.1.7 Mecanismos moleculares de resistencia de las plantas en respuesta al ataque de patógenos

Los nutrientes sintetizados por la plantas atraen a todo tipo de organismos. Para evitar ser atacadas, las plantas han desarrollado mecanismos sofisticados para protegerse contra los agentes patógenos. Estos incluyen tanto barreras físicas (Ej. Ceras, cutícula, estructura de pared celular) y químicas preformadas (Ej. Exudados fungicidas, compuestos fenólicos) como barreras físicas (Ej. defensas estructurales de la pared celular, capas de abscisión) y bioquímicas inducibles (Respuesta Hipersensible, Resistencia Sistémica Adquirida, Respuesta Sistémica Inducible).

Las plantas, como los animales, han ido evolucionando y adquiriendo inmunidad para contrarrestar ataques por patógenos microbianos (Weigel *et al.*, 2005). Las plantas, a

diferencia de los animales, no poseen células especializadas para la protección contra patógenos invasores. En su lugar, cada célula de la planta debe ser capaz de percibir a los agentes patógenos y montar una efectiva respuesta de defensa (Rochon *et al.*, 2006). Las plantas usan una inmunidad innata en sofisticados sistemas de vigilancia para el reconocimiento de patógenos (Elmore *et al.*, 2011). Una parte del sistema integral utiliza el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés), mediante receptores de reconocimiento de patógenos (PRR, por sus siglas en inglés), en la superficie de la célula de la planta, la cual es llamada Inmunidad Activada por PAMPs (PTI, por sus siglas en inglés). Sin embargo, hay patógenos que producen efectores para inhibir la PTI, pero las plantas, a su vez, pueden percibir esos efectores a través de otros receptores nombrados de Resistencia (R), que son normalmente proteínas que contienen repeticiones ricas en leucina con dominios de unión a nucleótidos (NB-LRR, por sus siglas en inglés), los cuales pueden llevar a cabo una segunda parte de la defensa llamada Inmunidad Activada por Efectores (ETI, por sus siglas en inglés) (Boller y Yang, 2009; Elmore *et al.*, 2011).

Los PAMPs (tales como flagelina y lipopolisacáridos), son estructuras conservadas y abundantes, típicas de todas las clases de patógenos. Tales patrones parecen estar ausentes en los organismos huéspedes eucariontes pero son indispensables para el estilo de vida de los microorganismos. La activación mediada por PAMPs mediante los PRR, transmite la información codificada por la unión a través de la membrana plasmática, iniciando una cascada de señalización en el huésped que culmina con la activación de las respuestas inmunes (Fig. 1.6) (Chisholm *et al.*, 2006; Bent y Mackey, 2007; Castro y García, 2009).

Los patógenos posteriormente pueden modificar o suprimir sus efectores reconocidos para evitar la obtención de defensa por parte de la planta, con riesgo a la pérdida de esos efectores (Chisholm *et al.*, 2006; Bent y Mackey, 2007).

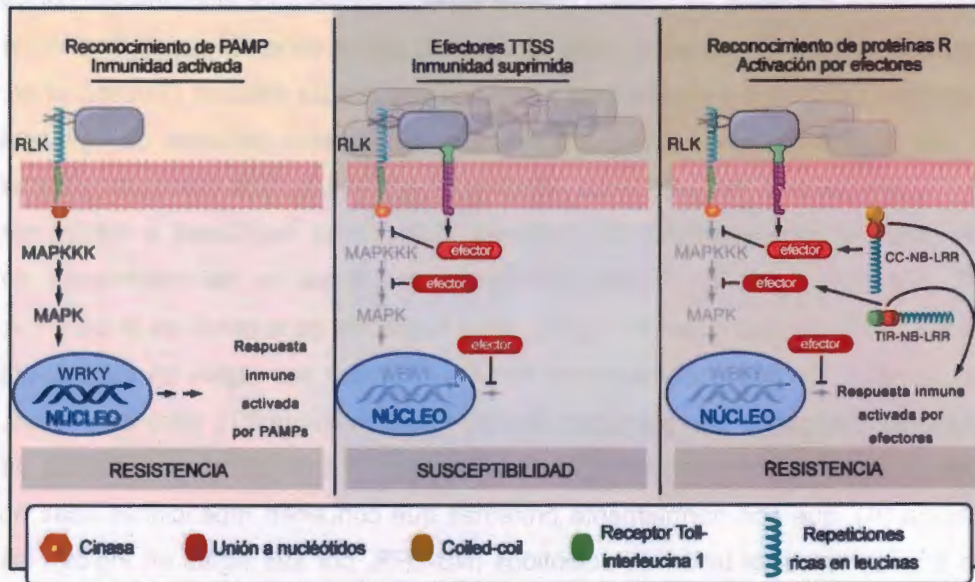


Figura 1. 6. Modelo de evolución de la resistencia a microorganismos en plantas. De izquierda a derecha, el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por receptores tipo cinasas (RLKs) que generan una ruta de señalización de cinasas hasta activar los factores de transcripción WRKY que activan la inmunidad dirigida por PAMPs. El patógeno desarrolla proteínas efectoras que suprimen la ruta de señalización por cinasas. Los huéspedes (plantas) producen proteínas R que reconocen a los efectores y activan la respuesta inmune (Imagen tomada y modificada de Chisholm *et al.*, 2006).

La especificidad en las interacciones planta-patógeno depende tanto del genotipo de la planta como del patógeno. Durante el proceso evolutivo, una vez que los patógenos adquirieron la capacidad de suprimir las defensas primarias, las plantas desarrollaron un mecanismo especializado para detectarlos, entre éstos está un sistema de reconocimiento genético del patógeno, controlado por los genes de resistencia del huésped. En este sistema de resistencia denominado gen-por-gen, los genes R de la planta confieren resistencia al patógeno que contiene, a su vez, los genes correspondientes de avirulencia (*avr*), llamados así, porque su presencia previene el desarrollo de la enfermedad (Ojito y Portal, 2010).

1.1.8 Respuestas de defensa inducidas en plantas

El genoma de cada planta codifica cientos de proteínas R, esto permite a la planta reconocer a un determinado patógeno quien genera moléculas avr o efectores (Mou *et al.*, 2003; Weigel *et al.*, 2005; Rochon *et al.*, 2006). Durante la infección se pueden activar los genes de resistencia R que pueden funcionar para impedir el desarrollo del patógeno. Sin embargo, cuando un patógeno infecta una planta y se genera una muerte rápida de células y la síntesis de compuestos antimicrobianos en el sitio de infección, se restringe el crecimiento del patógeno el cual se torna avirulento. Como resultado ocurre una necrosis visible llamada respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés), que implica la expresión localizada de proteínas relacionadas a patogénesis (PR, por sus siglas en inglés) y causa una muerte celular programada (PCD, por sus siglas en inglés) en el huésped. Esta etapa del proceso de infección es acompañada por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el superóxido (O_2^-), que participa tanto en la muerte del patógeno como en el refuerzo de la pared a través de cambios químicos (Dangl y Jones, 2001; Gudesblat, 2007; Austin *et al.*, 2002).

Con la respuesta hipersensible se forma una zona de células muertas alrededor del sitio de infección, ocurre síntesis de ácido salicílico y una acumulación de agentes antimicrobianos, como las proteínas PR (quitinasas y glucanasas) y fitoalexinas (Hammond y Parker, 2003), también se da un desbalance del Ca^{2+} citosólico en el disparo de los mecanismos de defensa y en la mediación del establecimiento de la inmunidad sistémica (Gechev *et al.*, 2006; Cortés *et al.*, 2010). Además de la HR que bloquea el crecimiento local de un patógeno que infecta, se puede conducir a una respuesta de defensa secundaria en partes no infectadas y distantes de la planta para conferir resistencia a una variedad de patógenos avirulentos. Esta respuesta es llamada Resistencia Sistémica Adquirida (conocida como SAR, por sus siglas en inglés) que es desencadenada por patógenos biótrosos. SAR ofrece una resistencia de larga duración en toda la planta a infecciones posteriores para una amplia gama de agentes patógenos. El establecimiento de SAR es asociado con niveles elevados de ácido salicílico (conocido por sus siglas en inglés como SA) tanto en el sitio de la infección como en los tejidos sistémicos (Mou *et al.*, 2003).

Se ha mostrado que el SA induce la expresión concertada de los genes PR, que codifican proteínas pequeñas que son secretadas por las células o dirigidos hacia la vacuola. Algunas proteínas PR están presentes en tejidos específicos durante ciertos

periodos de desarrollo. Esta característica indica que también tienen importancia en los procesos fisiológicos de la planta sana (Meller, 1994).

1.1.9 Señalización tras el reconocimiento

Como ya se ha mencionado, tras el reconocimiento de patógenos, las plantas responden activando mecanismos altamente conservados que utilizan componentes comunes de un número limitado de rutas de señalización. La caracterización de las resistencias mediadas por genes *R* en tomate, cebada o *Arabidopsis*, ha proporcionado datos genéticos muy valiosos para determinar la organización de esta respuesta, así como las interconexiones entre diferentes rutas de señalización. Así se han identificado genes necesarios para el correcto funcionamiento de múltiples genes *R*. Por ejemplo, el análisis genético de la interacción entre cebada y el hongo *Erysiphe graminis* sp. *hordei* reveló el papel fundamental del gen *RAR1*, en la resistencia mediada por el gen *Mla-12*. Esta resistencia va acompañada de una acumulación bifásica de H_2O_2 . Un primer estallido oxidativo se da a nivel local en el sitio de penetración del hongo. Mientras que el segundo se da a nivel de toda la célula coincidiendo con una HR (Torp y Jørgensen, 1986; Shirasu *et al.*, 1999). Los mutantes *rar1* fallan en el proceso de acumulación de ROS, así como en desencadenar una respuesta hipersensible, sugiriendo un papel para *RAR1* como potenciador de la acumulación de H_2O_2 promoviendo de esta forma la HR (Shirasu *et al.*, 1999). La mutación de *rar1* compromete por esto el reconocimiento de diferentes hongos, situando a *RAR1* como punto de convergencia de las señalizaciones mediadas por diferentes proteínas *R* (Hammond y Parker, 2003).

1.1.10 La proteína RAR1 y su participación en la resistencia contra patógenos

El análisis genético de plantas mutantes ha permitido el descubrimiento de varios genes involucrados en las interacciones planta-microbio. Entre éstos se encuentran el gen *RAR1* (Required for *Mla12* Resistance) de cebada (*Hordeum vulgare*), el cual es esencial para la función de un grupo de genes de resistencia de la clase CC-NBS-LRR y que están etiquetados con el nombre *Mla* (Torp y Jørgensen, 1986). El gen *RAR1* (*HvRar1*) fue inicialmente identificado en un cultivar de cebada que contiene un alelo

del gen de resistencia MLA, la cual es necesaria para la mediación de genes *R* para la enfermedad del óidio (Fu *et al.*, 2009; Shirasu, 2009). Se ha identificado una sola copia de *RAR1* en el genoma de arroz (*OsRAR1*), cebada (*HvRAR1*), *Arabidopsis* (*AtRAR1*), soya (*GmRAR1*) y tabaco (*NbRAR1*) (Bhaskar *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2009).

Las proteínas RAR1 de las plantas se caracterizan por la presencia de dos módulos unidos a Zinc llamados dominios ricos en repeticiones de histidina y cisteínas (CHORD I y II), donde cada módulo consta de 60 aminoácidos, por lo general dispuestos en tándem, que se encuentran en casi todos los eucariotas (Shirasu *et al.*, 1999, Heise *et al.*, 2007). Además de los dominios CHORD que permiten la interacción proteína-proteína, las proteínas RAR1 de las plantas contienen un motivo CCCH que posee tres cisteínas y una histidina, el cual, su función es aún desconocida (Fu *et al.*, 2009). El arreglo tridimensional del dominio CHORD II en *A. thaliana* consta de cinco estructuras β -plegada en la región amino terminal y una estructura de α -hélice en el extremo carboxilo terminal (Fig. 1.7) (Zhang *et al.*, 2010).



Figura 1. 7. Estructura tridimensional del dominio CHORD II de RAR1 de *Arabidopsis thaliana* donde se observan las 5 estructuras β -Plegadas y la α -hélice características de este dominio (Zhang *et al.*, 2010).

El gen *RAR1* juega un papel importante en la defensa basal en plantas: las mutaciones en *rar1* aumentan la susceptibilidad a patógenos virulentos en *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2008). En plantas de cebada, los mutantes *rar1* fallan en el proceso de

acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o en desencadenar una respuesta hipersensible (Shirasu *et al.*, 1999).

El silenciamiento del gen *RAR1* homólogo a *chp* en *Caenorhabditis elegans* por RNA de interferencia (RNAi) produjo esterilidad y malformaciones embrionarias, demostrando de esta forma que *RAR1* está involucrado en el desarrollo en animales (Shirasu *et al.*, 1999). Estudios similares se llevaron a cabo con el gen *GmRAR1* en soya mostrando también alteración morfológica en las plantas, y el silenciamiento tanto de *GmRAR1* como de un gen llamado *SGT1* (involucrado en la defensa en plantas) afectó la resistencia contra la bacteria *Pseudomonas syringae*, así como la activación del SAR, lo que sugiere que además de estar relacionado con el desarrollo, este gen también está involucrado en la defensa de la planta (Fu *et al.*, 2009). En *Nicotiana bentamiana*, un gen *R* que codifica para la proteína N que participa en la resistencia contra el virus del mosaico de tabaco, también mostró que requiere la participación de *RAR1* para conferir esta resistencia (Liu *et al.*, 2002).

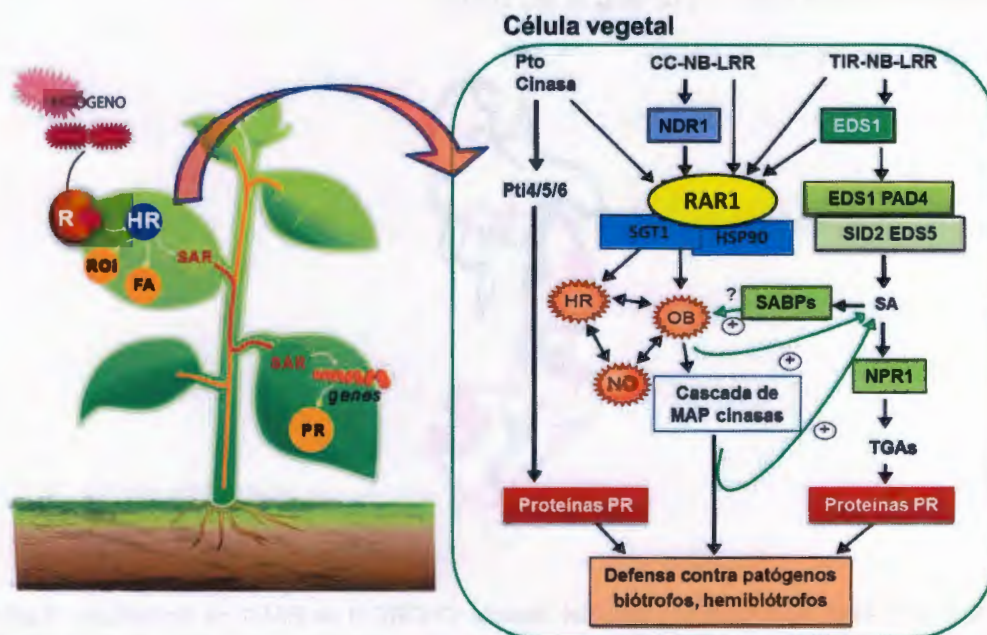


Figura 1. 8. Ruta de activación de *RAR1* a partir de estudios de pérdida de función. Ante la presencia de un patógeno, la planta detecta por medio de las proteínas NB-LRR productos de dicho microorganismo y desencadena rutas de transducción que activan respuestas tempranas que conducen a la expresión de genes de defensa. *RAR1*, es un punto de convergencia clave para que se produzca ROS y por lo tanto la HR. Los niveles de SA aumentan, produciendo un cambio en el potencial REDOX, induciendo SAR, que a su vez promueve la transcripción de genes de defensa (Imagen modificada de Hammond y Parker, 2003).

Como hemos estado viendo, la resistencia a enfermedades en plantas requiere de la activación de rutas de señalización de defensa para prevenir la propagación de la infección (Heise *et al.*, 2007), y los genes R en plantas desencadenan la respuesta inmune en respuesta al ataque de un patógeno. Las evidencias que hemos estado presentando indican que *RAR1* es un punto de convergencia en una vía de señalización mediada por múltiples genes R (Fig 1.8) (Azevedo *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003).

1.1.11 Sobre-expresión de RAR1 en plantas transgénicas y su efecto en la resistencia contra patógenos

Hasta el momento no hay muchos estudios acerca de la sobre-expresión del gen *RAR1*. Wang y colaboradores en el año 2008, analizaron la sobre-expresión de *OsRar1* en plantas de arroz, encontrando que aumentó significativamente la resistencia basal a una raza específica de *Magnaporthe oryzae* en las dos plantas transgénicas examinadas (Fig. 1. 9), en comparación de los controles, donde se pudieron observar los síntomas de la enfermedad con una mayor área dañada.

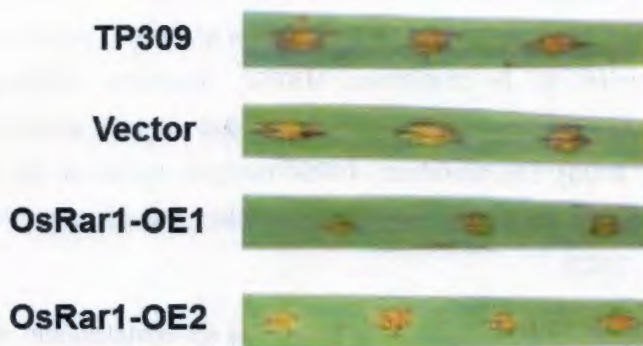


Figura 1. 9. Aumento de la resistencia basal en plantas transgénicas de arroz ante *Magnaporthe oryzae*. Se observan lesiones en hojas de los controles después de 5 días de la inoculación con el patógeno, mientras que en las plantas donde se sobre-expresan *OsRAR1* la lesión fue inhibida (Wang *et al.*, 2008).

Un dato interesante es que en 2006 le otorgaron a Sainz y Salmeron una patente referente a moléculas de ácidos nucleicos aislados de *Oryza sativa* (arroz), que constan de secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas RAR1 involucradas en la resistencia (patente No. US7098378B2). Esto nos indica el potencial biotecnológico de este tipo de secuencias para la obtención de plantas resistentes a enfermedades.

1.1.12 RAR1 y su interacción con otras proteínas co-chaperonas

Las chaperonas son un grupo numeroso de familias de proteínas no relacionadas cuya función es estabilizar las proteínas no plegadas, desplegarlas para su translocación a través de membranas o para su degradación, y/o ayudarlas para su correcto plegamiento y ensamblaje. Las plantas también codifican múltiples isoformas de co-chaperonas, que son proteínas que pueden asistir a otras chaperonas. Tanto plantas como animales requieren de la actividad de proteínas que contengan dominios de unión a nucleótidos (NB, por sus siglas en inglés) y dominios ricos en repeticiones de leucina (LRR) para un adecuado funcionamiento del sistema inmunológico. HSP90 y SGT1 otras co-chaperonas, que ya se han demostrado no sólo ser importantes para la regulación de las proteínas NB-LRR en plantas (proteínas NLR en animales), sino también en la regulación de la función de NLR en los animales (Hubert *et al.*, 2009). La pérdida de la función de la chaperona HSP90 citosólica conduce a la rápida degradación de muchas proteínas R, por lo que conduce a la susceptibilidad en las plantas (Holt *et al.*, 2005). Las proteínas HSP90 también participan en la respuesta de las plantas a estreses abióticos, incluyendo el calor, la sequía y tolerancia a la salinidad (Fu *et al.*, 2009).

Los análisis estructurales de la HSP90 a través de su cristalización o por medio de mutaciones han puesto en manifiesto que esta proteína alberga un dominio ATPasa en su N-terminal con la capacidad de unirse a nucleótidos y agentes químicos. HSP90 se distingue de muchas otras chaperonas moleculares debido a que la mayoría de sus sustratos conocidos hasta la fecha son proteínas de transducción de señales, tales como receptores de hormonas esteroideas y las cinasas de señalización. El papel importante de la HSP90 es la del plegamiento de proteínas, pero también desempeña un papel clave en las redes de transducción de señales, control del ciclo celular, la degradación de proteínas y tráfico de proteínas (Wang *et al.*, 2004). Aunque HSP90 se

expresa constitutivamente en la mayoría de los organismos, su expresión aumenta en respuesta al estrés tanto en procariotas como en eucariotas. La expresión de HSP90 en *Arabidopsis* está regulada por el desarrollo y responde al calor, frío, estrés salino, metales pesados y fitohormonas. Por ejemplo, la sobre-expresión de genes de la familia HSP90 en plantas de tabaco aumentó la tolerancia a condiciones de estrés salino y sequía (Song *et al.*, 2009). Tanto RAR1 como SGT1 interactúan con la co-chaperona HSP90 involucrada en el plegamiento, ensamblaje y transporte de proteínas (Wang *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2009).

Por otra parte SGT1, fue identificada originalmente como un componente esencial del ciclo celular de levaduras (Kitagawa *et al.*, 1999). La evidencia reciente muestra que SGT1 regula positivamente la acumulación de la proteína Rx de papa (que induce resistencia al virus X de papa) en plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* (Azevedo *et al.*, 2006). Un rasgo característico de la proteína SGT1 es la presencia de tres dominios conservados: un dominio tetratricopéptido (TPR), un motivo CS (CHORD SGT1), y una secuencia de SGT1 específicos (SGS). Los motivos TPR consisten de 34 aminoácidos degenerados repetidos y se encuentran en las proteínas implicadas en el control del ciclo celular, la biogénesis del ARN, y la respuesta de choque térmico (Fu *et al.*, 2009).

Como se mencionó anteriormente RAR1, es una proteína requerida para la inmunidad innata en plantas. RAR1 interactúa con SGT1 y HSP90, y el complejo molecular de las co-chaperonas HSP90-SGT1-RAR1 tiene diversas funciones biológicas y celulares en plantas. Estas tres proteínas juegan un papel importante en la Inmunidad Desencadena por Efectores (ETI) y en la regulación de la estabilidad de las proteínas de resistencia NB-LRR (Shang *et al.*, 2006; Hubert *et al.*, 2009). Estas tres proteínas pueden interactuar de forma independiente entre sí; el dominio de CS de SGT1b interacciona con el dominio de CHORD II de RAR1, pero también puede interactuar con el dominio N-terminal de la ATPasa de HSP90 (Fig. 1.10). La mutación del SGT1b puede suprimir a *rar1* para algunas funciones de las proteínas NB-LRR. Sin embargo, la relación entre RAR1 y HSP90 es menos clara (Hubert *et al.*, 2009). En tabaco tanto RAR1 como SGT1 están asociados con el señalosoma COP9 y con los componentes del complejo SCF (Skp1/cullin/F-box protein) tipo E3 ubiquitin ligasa, el cual está involucrado en la degradación proteica mediada por el señalosoma COP9 (Liu *et al.*, 2002).

Zhang y colaboradores en 2010 presentaron un estudio de la estructura cristalográfica del complejo RAR1, HSP90 y SGT1. Para este estudio tomaron como referencia las secuencias del dominio ATPasa de HSP90 de cebada y el dominio CHORD II de RAR1 y el dominio CS de SGT1 de *A. thaliana* (Fig. 1.10), que proporciona un marco para la comprensión de la naturaleza de los complejos HSP90-RAR1-SGT1. El análisis estructural y bioquímico mostró la arquitectura del complejo HSP90, RAR1 y SGT1, el cual recluta a los receptores NLR, y sugiere que las proteínas de dominio CHORD, al igual que otras co-chaperonas como HSP90 participan en el reclutamiento de receptores, y manipulan los elementos estructurales que controlan el ciclo de conformación de la ATPasa de la chaperona.

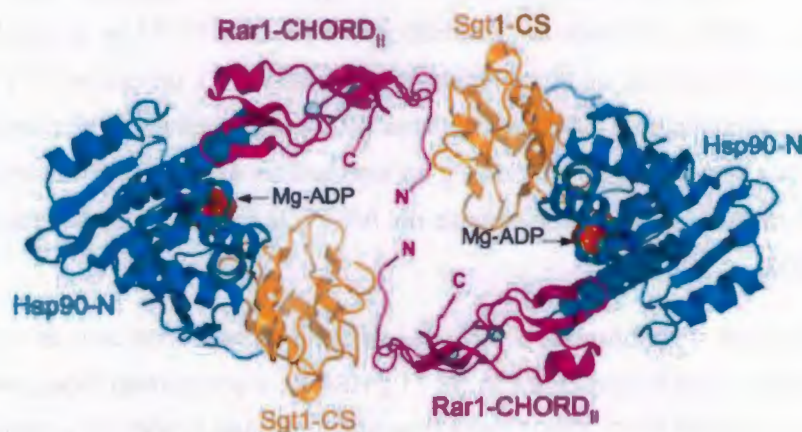


Figura 1. 10. Estructura cristalina de la interacción de HSP90-SGT1-RAR1. Montaje del dominio HSP90 (azul), dominio SGT1-CS (oro), y dominio RAR1-CHORD II (morado). Mg₂-ADP ligado en el sitio de unión de nucleótido del dominio HSP90. Los átomos de zinc estructurales se muestran como esferas grises (Zhang *et al.*, 2010).

1.1. 13 RAR1 en plátano

En un estudio reciente realizado por Canul (2010) se logró clonar un gen tipo *RAR1* de plátano variedad 'Tuu Gia', la cual presenta resistencia al hongo *M. fijiensis*. La secuencia del ADNc que contiene el marco de lectura abierto presentó una longitud de 648 pb. La expresión del gen, nombrado *MaRAR1*, mostró estar presente en los tejidos de hoja, bráctea y flor de una planta adulta de plátano, así como en el tejido foliar de una planta de plátano cultivada *in vitro*. Dentro del mismo estudio se realizó

un dendrograma de similitud, donde la secuencia *MaRAR1* se agrupó con secuencias tipo RAR1 de plantas monocotiledóneas.

1.1.14 Tabaco como planta modelo

Nicotiana tabacum o planta de tabaco, es una dicotiledónea que pertenece a la gran familia de las solanáceas, y es importante como cultivo agronómico. Los primeros logros en la ingeniería genética de plantas se basan principalmente en el trabajo con el tabaco esto probablemente se debe a que el tabaco fue la primera especie de planta en ser regenerada *in vitro* y a que los primeros reportes sobre la transformación genética de plantas se llevaron a cabo en esta especie (Vain, 2007). Esta planta se ha empleado en estudios sobre la producción de proteínas recombinantes y anticuerpos, que tienen una aplicación en la medicina y la industria. Por otra parte, el tabaco ha sido encontrado para ser un sistema muy versátil para todos los aspectos de la investigación de estrés biótico y abiótico. La planta de tabaco es utilizada experimentalmente como planta modelo para la transformación genética y cultivo *in vitro* por ser más fácilmente transformable y tener una morfología y fisiología más semejante a la de cultivos agronómicos; también puede facilitar el análisis funcional de genes involucrados en la resistencia y ayudar a determinar la conservación de rutas de señalización entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Se cuentan con protocolos bien establecidos para la transformación y regeneración de esta planta, la cual presenta un ciclo de vida corto. Tanto *Nicotiana bentamiana* y *N. tabacum* han sido usadas como especies modelo para las ciencias en plantas por más de 20 años (Clemente, 2006). Por ejemplo, en un estudio de sobre-expresión en *N. tabacum* del gen *PTO* de tomate bajo el control del promotor 35S, se observó que las plantas transgénicas desarrollaron resistencia contra la bacteria *P. syringae* pv. *Tabaci* (Thilmony *et al.*, 1995). En otro estudio donde se expresa de manera constitutiva el gen *NPR1* de *Arabidopsis thaliana* en plantas de tabaco, se mostró un aumento en la resistencia al nemátodo de la raíz *Meloidogyne incognita* (Priya *et al.*, 2011). La sobre-expresión de la endoquitinasa *CHIT₃₃* en tabaco no sólo muestra una mayor resistencia de este al hongo *Rhizoctonia solani* si no también su tolerancia al estrés salino y a metales pesados (Dana *et al.*, 2006). Tabaco también ha sido usado para el estudio de factores de transcripción, tal es el caso de WRKY27 de chile, donde plantas de tabaco que la sobre-expresan exhibieron resistencia a la infección de la bacteria

Ralstonia solanacearum en comparación con la de las plantas de tipo silvestre (Dang *et al.*, 2014). Por otra parte, las plantas de tabaco donde sobre-expresaron el gen *AlSAP* de *Aeluropus littoralis* mostraron un aumento en la tolerancia ante el estrés abiótico, tales como la salinidad, la sequía, y congelación (Ben *et al.*, 2010). En otro trabajo, se muestra que la sobre-expresión del gen *ZmSO* de maíz en tabaco aumenta su tolerancia ante metales pesados (Xia *et al.*, 2012).

Como se ha mencionado en apartados anteriores, en tabaco (*Nicotiana bentamiana*) se ha caracterizado un gen *RAR1* (*NbRAR1*). Tabaco contiene un gen *R* que codifica para la proteína N que participa en la resistencia contra el virus del mosaico de tabaco; también se ha mostrado que se requiere de la participación de *RAR1* para conferir esta resistencia (Liu *et al.*, 2002). También se ha observado que en tabaco *RAR1* está asociado con el señalosoma COP9 y con los componentes del complejo SCF (Skp1/cullin/F-box protein) tipo E3 ubiquitin ligasa, el cual está involucrado en la degradación proteica mediada por el señalosoma COP9 (Liu *et al.*, 2002).

En la presente tesis se usó tabaco como planta modelo para generar líneas transgénicas con el gen *MaRAR1* de plátano. Tomando en cuenta que plátano es una monocotiledónea y tabaco dicotiledónea, y la divergencia entre monocotiledóneas y dicotiledóneas se estima que fue alrededor de 200 millones de años (Wolfe *et al.*, 1989), se puede decir que ambas plantas se encuentran evolutivamente lejanas; sin embargo a pesar de tantos millones de años de divergencia, en ambas especies se mantiene el gen *RAR1*. Es muy interesante que las secuencias de *RAR1* en tabaco y plátano presenten un 67% de identidad (a nivel aminoácidos), por lo cual podría predecirse que la función de la proteína de *RAR1* se mantiene. Por otra parte, se espera que el gen endógeno *RAR1* de tabaco no afecte la sobre-expresión de *MaRAR1* en esta planta: en estudios de la sobre-expresión del gen *NPR1* de *A. thaliana* (Priya *et al.*, 2011) en tabaco que también contiene un gen endógeno *NPR1* (Liu *et al.*, 202), en este caso las plantas transgénicas con *AtNPR1* mostraron un desarrollo normal y una mayor resistencia contra la infección del nemátodo *Meloidogyne incognita* en comparación con la tipo silvestre (Priya *et al.*, 2011).

1.2 HIPÓTESIS

La transformación de *Nicotiana tabacum* con el gen *MaRAR1* de *Musa acuminata*, permitirá obtener plantas transgénicas que expresen este gen.

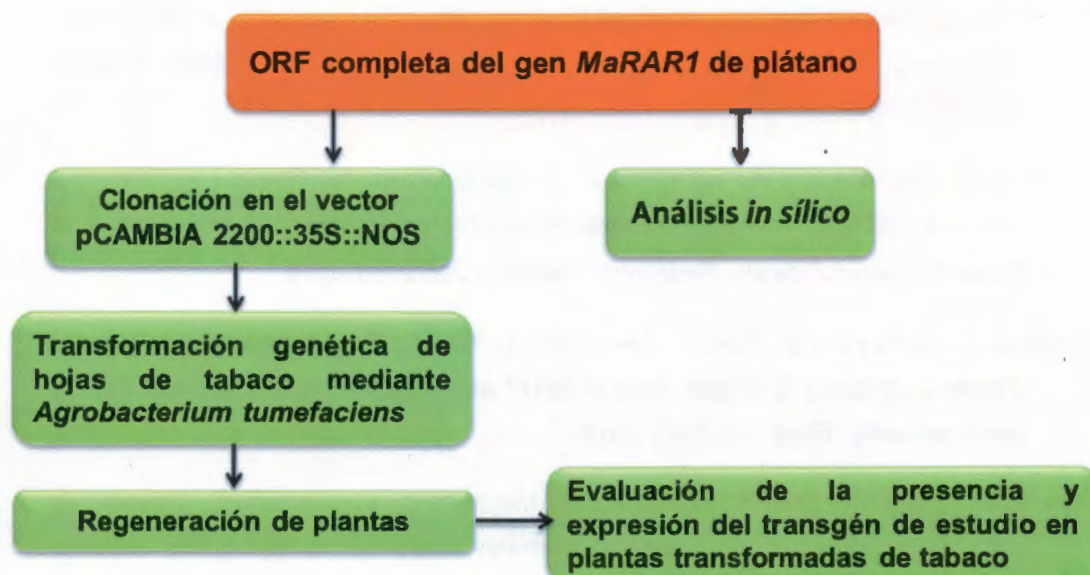
1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Generar y caracterizar molecularmente plantas de tabaco transformadas con el gen *MaRAR1* de plátano.

1.3.2 Objetivos particulares

1. Analizar la estructura terciaria de la proteína *MaRAR1* de plátano.
2. Determinar la integración del gen *MaRAR1* de plátano en el genoma de plantas de tabaco transformadas con este gen.
3. Evaluar la expresión de *MaRAR1* en plantas transgénicas de tabaco.

1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1.5 BIBLIOGRAFÍA

- Augstburger F., Berger J., Censkowsky U., Heid P., Milz J., Streit C. (2002). II Parte Especializada: Producción Orgánica de Banano. Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico (Banana). Asociación Naturland 2ª edición. Alemania.
- Austin M. J., Muskett P., Kahn K., Feys B. J., Jones J. D. G., Parker J. E., (2002). Regulatory Role of *SGT1* in Early *R* Gene-Mediated Plant Defenses. *Science* 295:2077-2080.
- Azevedo C., Sadanandom A., Kitagawa K., Freialdenhoven A., Shirasu K., Schulze-Lefert P. (2002). The RAR1 Interactor SGT1, an Essential Component of R Gene-Triggered Disease Resistance. *Science* 295:2073-2076.
- Azevedo C., Betsuyaku S., Peart J., Takahashi A., Noël L., Sadanandom A., Casais C., Parker J., Shirasu K. (2006). Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *EMBO* 25:2007-2016.
- Ben S. R., Zouari N., Ben R. W., Azaza J., Meynard D., Guiderdoni E., Hassairi A. (2010). Improved drought and salt stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing a novel A20/AN1 zinc-finger "A/SAP" gene isolated from the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. *Plant Molecular Biology* 72:171-190.
- Bent A. F., Mackey D. (2007). Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual Reviews Phytopathology* 45:399-436.
- Bhaskar P. B., Raasch J. A., Kramer L. C, Neumann P., Wielgus S. M., Austin P. S., Jiang J. (2008). *Sgt1*, but not *Rar1*, is essential for the *RB*-mediated broad-spectrum resistance to potato late blight. *Plant Biology* 8:1-8.
- Boller T. Yang H. S. (2009). Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science* 324:742-743.
- Canul T. E. (2010). Caracterización del ADN complementario de un gen tipo *RAR1* en un cultivar de *Musa acuminata*. Tesis de licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. Pp.34-39.

- Castro M. E., García P. E. (2009). La inmunidad innata en las plantas: una batalla molecular entre receptores y estimuladores. *Biológicas* 11:43-47.
- Chisholm S., Coaker G., Day B., Staskawicz B. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124:803-814.
- Churchill C. A. (2010). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology* 12:307-328.
- Clemente T. (2006) *Nicotiana (Nicotiana tobaccum, Nicotiana benthamiana)*. *Methods Molecular Biology* 343:143-154.
- Cortés R. M. A., Hernández G. A., López G. R., Salgado G. R. (2010). La búsqueda de genes de resistencia como una alternativa para la selección de portainjertos de aguacate con tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*. *Biológicas* 12:143-150.
- Crouch J. H. (1998). Perspectives on the Application of Biotechnology to Assist the Genetic Enhancement of Plantain and Banana (*Musa* spp.). *Electronic Journal of Biotechnology* 1:12-22.
- Dana M. M., Pintor-Toro J. A., Cubero B. (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology* 142:722-730.
- Dang F., Wang Y., She J., Lei Y., Liu Z., Eulgem T., Lai Y., Lin J., Yu L., Lei D., Guan D., Li X., Yuan Q., He S. (2014). Overexpression of *CaWRKY27*, a subgroup IIe WRKY transcription factor of *Capsicum annuum*, positively regulates tobacco resistance to *Ralstonia solanacearum* infection. *Physiologia Plantarum* 150:397-411.
- Dangl J. L., Jones J. D. G. (2001). Plant Pathogens and Integrated Defense Responses to Infection. *Nature* 411:826-833.
- D'Hont A., Denoeud F., MarcAury J., Baurens F. C., Carreel F., Garsmeur O., Noel B., Bocs S., Droc G., Rouard M., Da Silva C., Jabbari K., Cardi C., Poulain J., Souquet M., Labadie K., Jourda C., Lengelle J., Rodier-Goud M., Alberti A., Bernard M., Correa M., Ayyampalayam S., Mckain M. R., Leebens-Mack J.,

- Burgess D., Freeling M., Mbéguié D., Chabannes M., Wicker T., Panaud O., Barbosa J., Hribova E., Heslop-Harrison P., Habas R., Rivallan R., Francois P., Poiron C., Kilian A., Burthia D., Jenny C., Bakry F., Brown S., Guignon V., Kema G., Dita M., Waalwijk C., Joseph S., Dievert A., Jaillon O., Leclercq J., Argout X., Lyons E., Almeida A., Jeridi M., Dolezel J., Roux N., Risterucci A. M., Weissenbach J., Ruiz M., Glaszmann J. C., Quétier F., N. Yahiaoui., P. Wincker. (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* 488:213-217.
- Elmore J. M., Lin Z.J. D., Coaker G. (2011). Plant NB-LRR signaling: upstreams and downstreams. *Current Opinion in Plant Biology* 14:365-371.
- Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology. (2009). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 48. Consensus Document on the Biology of Bananas and Plantains (*Musa* spp.). <http://www.oecd.org/biotrack>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fecha de consulta: Noviembre 2014, acceso en <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Fu D. Q., Ghabrial S., Kachroo A. (2009). *GmRAR1* and *GmSGT1* Are required for basal, *R* gene-mediated and systemic acquired resistance in soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:86-95.
- Gechev T. S., Van B. F., Stone J. M., Denev II, Laloi C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* 28:1091-1101.
- Gómez L. M. A., González J. A., Ortiz J. L., Aguilar M. E., Sandoval J. (2004).). Logros y perspectivas de la transformación genética en banano. *ACORBAT* pp. 79-83.
- Gudesblat G. E. (2007). Señalización en la interacción entre bacterias fitopatógenas y su hospedador. *Química Viva* 6:36-47.
- Hammond K. K. E., Parker J. E. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14:177-193.

- Heslop-Harrison H. J. S., Schwarzacher T. (2007). Domestication, Genomics and the Future for Banana. *Annals of Botany* 100:1073-1084.
- Heise C. T., Le Duff C. S., Boter M., Casais C., Airey J. E., Leech A. P., Amigues B., Guerois R., Moore G. R., Shirasu K., Kleanthous C. (2007). Biochemical Characterization of RAR1 Cysteine- and Histidine-Rich Domains (CHORDs): A Novel Class of Zinc-Dependent Protein-Protein Interaction Modules. *Biochemistry* 46:1612-1623.
- Holt B. F., Belkhadir Y., Dangl J. L. (2005). Antagonistic Control of Disease Resistance Protein Stability in the Plant Immune System. *Science* 309:929-932.
- Hubert D. A., Hea Y., McNulty B. C., Tornero P., Dangla J. L. (2009). Specific *Arabidopsis* HSP90.2 Alleles Recapitulate RAR1 Cochaperone Function in Plant NB-LRR Disease Resistance Protein Regulation. *Proceeding of National Academy of Sciences* 106:9556-9563.
- Infoagro. El cultivo del plátano (2ª parte)
http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/platano2.htm
- INIBAP. 1996. Focus Paper 1: Banana and plantain: the Earliest Fruit Crops? in Annual Report 1995. INIBAP, Montpellier, France. Pp. 6-8.
- Kitagawa K., Skowrya D., Ellegde S. J., Harper J. W., Hieter P. (1999). SGT1 encodes an Essential Component of the Yeast Kinetochore Assembly Pathway and a Novel Subunit of the SCF ubiquitin Ligase Complex. *Molecular Cell* 4:21-33.
- Liu Y., Schiff M., Marathe R., Dinesh-Kumar S. P. (2002). Tobacco *RAR1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* Like Genes are Required for N-mediated Resistance to Tobacco mosaic virus. *Plant Journal* 30:415-429.
- Liu Y., Schiff, M., Serino G., Deng X. W., Dinesh-Kumar S. P. (2002). Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the *N* gene-mediated resistance response to *Tobacco mosaic virus*. *Plant Cell* 14:1483-1496.
- Malnoy M., Reynold J., Borejsza E., Aldwinckle H. (2006). Activation of the pathogen inducible *Gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apple (*Malus x domestica*). *Transgenic Research* 15:83-93.

- Manzo S. G., Guzmán G. S., Rodríguez García C. M., James A., Orozco S. M. (2005). Biología de *Micosphaerella Fijensis* morelet y su interacción con *Musa* Spp. Revista Mexicana de Fitopatología 23:87-96.
- Marín D. H., Romero R. A., Guzmán M., Sutton T. B. (2003). Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. Plant Disease 87:208-222.
- May D. G., Afza R., Manso H.S., Wiecko A., Novak F.J., Amizen C. J. (1995). Generation of Transgenic Banana (*Musa acuminta*) Plants Via *Agrobacterium*-Mediated Trasnformation. Biotechnology 13:486-492.
- Meller Y. (1994). Proteínas que defienden las plantas. Mundo Científico 14:582-583.
- Mou Z., Fan W., Dong X. (2003). Inducers of plant Systemic Acquired Resistance Regulate NPR1 Function through Redox Changes. Cell 113:935-944.
- Ojito R. K. Portal O. (2010). Introducción al sistema inmune en plantas. Biotecnología Vegetal 10:3-19.
- Orozco S. M., Farías L. J., Manzo S. G., Guzmán G. S. (2002). Manejo integrado de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijensis*) del banano en el trópico seco de México. Asociación de Bananeros de Colombia AUGURA pp. 119-124.
- Orozco-Santos M., Orozco-Romero J. (2004). La Sigatoka negra en bananos y plátanos: el caso de México. XVI Reunión Internacional Acorbat pp.70-78.
- Palencia C. G. E., Gómez S. R., Martín S. J. E. (2006). Manejo sostenible del cultivo del plátano. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Pp. 7-18
- Ploetz R. C., Kay K. A., Daniells J., Nelson S. C. (2007). Banana and plantain an overview with emphasis on Pacific island cultivars. Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. www.tradictionaltree.org.
- Priya B. D., Somasekhar N., Prasad J. S., Kirti P. B. (2011). Transgenic tobacco plants constitutively expressing *Arabidopsis NPR1* show enhanced resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Biomed Central, Research Notes 4:231.
- Pua E. C. (2007). Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Crops V. Verlag Berlin Heidelberg 60:4-22.

- Rosales E. F., Pocasangre E. L. (2002). Mejoramiento convencional de banano y plátano: Estrategias y logros. Memorias XV reunión. Pp.31-43
- Rochon A., Boyle P., Wignes T., Fobert P.R., 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* 8:3670-3685.
- Roux N., Baurens F. C., Doležel J., Hřibová E., Heslop-Harrison P., Town C., Sasaki T., Matsumoto T., Aert R., Remy S., Souza M., Lagoda P. (2008). Genomics of Banana and Plantain (*Musa* spp.), Major Staple Crops in the Tropics. *Springer* 1:83-109.
- Sági L. S., Remy B., Panis R., Volckaert G. 1994. Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv. Bluggoe, ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Reports* 13:262-266.
- Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera, acceso en http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=244&Itemid=111
- Simmonds N. W. 1962. The Evolution of Bananas. Tropical Agricultural Series. Longman Scientific and Technical, UK. Pp. 170.
- Shang Y., Li X., Cui H., He P., Thilmony R., Chintamanani S., Zwiesler V. J., Gopalan S., Tang X., Zhou J. M. (2006). RAR1, a central player in plant immunity, is targeted by *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proceeding of National Academy of Sciences* 103:19200-19205.
- Shirasu K. (2009). The HSP90-SGT1 Chaperone Complex for NLR Immune Sensors. *Annual Reviews. Plant Biology* 60:139-64.
- Shirasu K., Lahaye T., Tan M. W., Zhou F., Azevedo C., Schulze-Lefert P. (1999). A Novel Class of Eukaryotic Zinc-Binding Proteins Is Required for Disease Resistance Signaling in Barley and Development in *C. elegans*. *Cell* 99:355-366.
- Song H., Zhao R., Fan P., Wang X., Chen X., Li Y. (2009). Overexpression of AtHSP90.2, AtHSP90.5 and AtHSP90.7 in *Arabidopsis thaliana* enhances plant sensitivity to salt and drought stresses. *Planta* 229:955-964.

- Takahashi A., Casais C., Ichimura K., Shirasu K. (2003). HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Biology* 100:11777-11782.
- Thilmony R. L., Chen Z., Bressan R. A., Martin G. B. (1995). Expression of the Tomato *Pto* Gene in Tobacco Enhances Resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* Expressing *avrPto*. *Plant Cell* 7:1529-1536.
- Torp J., Jørgensen J. H. (1986). Modification of Barley Powdery Mildew Resistance Gene *Mla12* by Induced Mutacion. *Genetic Cytology* 28:725-731.
- Vain P. 2007. Thirty years of plant transformation technology development. *Plant Biotechnology Journal* 5:221-229.
- Vázquez C. R., Romero C. A., Figuero A. J. (2005). Paquete tecnológico para el cultivo del Plátano. Gobierno del estado de Colima. Pp. 2-12
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9:244-252.
- Wang Y., Gao M., Li Q., Wang L., Wang J., Jeon J. S., Qu N., Zhang Y., He Z. (2008). *OsRAR1* and *OsSGT1* Physically Interact and Function in Rice Basal Disease Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:294-303.
- Weigel R. R., Pfitzner U. M., Gatz C. (2005). Interaction of NIMIN1 with NPR1 Modulates PR Gene Expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:1279-1291.
- Wolfe K. H., Gouy M., Yang Y. W., Sharpt P. M., Li W. H. (1989). Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 6201-6205.
- Xia Z., Sun K., Wang M., Wu K., Zhang H., Wu J. (2012). Overexpression of a Maize Sulfite Oxidase Gene in Tobacco Enhances Tolerance to Sulfite Stress via Sulfite Oxidation and CAT-Mediated H_2O_2 Scavenging. *Plos One* 7:1-8.
- Zhang M., Kadota Y., Prodromou C., Shirasu K, Pearl L. H. (2010). Structural Basis for Assembly of HSP90-Sgt1-CHORD Protein Complexes: Implications for Chaperoning of NLR Innate Immunity Receptors. *Molecular Cell* 39:269-281.

CAPÍTULO II

GENERACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TABACO QUE CONTENGA LA CONSTRUCCIÓN 35S::MaRAR1::NOS Y SU ANÁLISIS MOLECULAR

2.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas usan sistemas de inmunidad innata para responder a la infección de patógenos; estos son conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés). La inmunidad innata es inducida mediante el reconocimiento de las PAMP por receptores que se encuentran en la membrana y dan como resultado una respuesta temprana de la infección del patógeno. Por su parte, el patógeno libera proteínas efectoras que son reconocidas ya sea directa o indirectamente por proteínas de resistencia (R), lo que por lo general induce a la respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés) que es un tipo de muerte celular programada. Las principales proteínas R son receptores intracelulares que contienen dos dominios: uno de unión a nucleótidos (NB) y uno rico en repeticiones de leucinas (LRR) (Hammond-Kosack y Jones 1996; Thao *et al.*, 2007). A menudo las proteínas R requieren de otras proteínas para llevar a cabo su actividad, ejemplo de lo anterior es la proteína RAR1 (Shirasu, 2009).

El gen *RAR1* ("required for Mla12 resistance") fue identificado por primera vez por su papel esencial en la función de un subconjunto de los genes *Mla* que confieren resistencia al patógeno *Blumeria graminis* en cebada. La proteína presentó dos dominios similares pero distintos unidos a Zinc²⁺ llamados dominios ricos en repeticiones de histidina y cisteínas (CHORD I y II), así como un motivo CCCH que posee tres cisteínas y una histidina (Bhaskar *et al.*, 2008; Shirasu, 2009; Zhang *et al.*, 2010). *RAR1* es un gen que presenta solo una copia en plantas; se creía que este gen sólo participaba en la resistencia a enfermedades, sin embargo, estudios realizados muestran que esta proteína puede participar en el desarrollo en plantas de soya (Fu *et al.*, 2009). Se ha demostrado que *RAR1* juega un papel muy importante en la regulación de proteínas R y también puede operar otros receptores inmunes a nivel de ensamblaje o de mantenimiento de proteínas (Zhang *et al.*, 2011). El gen *RAR1* también juega un papel muy importante en la defensa basal de la planta, por ejemplo,

mutaciones en *Rar1* producen susceptibilidad hacia patógenos virulentos en *Arabidopsis* y cebada (Wang *et al.*, 2008; Holt *et al.*, 2005). La sobre-expresión del gen *OsRAR1* en arroz dio como resultado una mayor resistencia basal hacia el hongo *Magnaporthe oryzae* (Wang *et al.*, 2008).

En un estudio previo en nuestro grupo de investigación, se aisló el ADN complementario que codifica para una proteína homóloga a RAR1 desde una variedad de plátano resistente a la Sigatoka negra, el cual se nombró como *MaRAR1* (Canul, 2010). El análisis estructural y filogenético indicó que esta secuencia efectivamente pertenece a la familia de genes *RAR1* de plantas, planteando la posibilidad que cumpla una función en la resistencia contra patógenos. El objetivo del presente capítulo es generar y evaluar líneas T₁ transgénicas de tabaco con la construcción 35S::*MaRAR1*::NOS, la generación y caracterización de estas plantas transgénicas permitirá a corto plazo el estudio funcional de *MaRAR1*. De comprobarse su función en el incremento de la resistencia contra patógenos, este gen tendría potencial biotecnológico, ya que podría usarse con la finalidad de incrementar los niveles de resistencia de plátano u otro cultivo comercial al ataque de patógenos y de esta manera disminuir los costos económicos para el control de enfermedades, así como contribuir al cuidado del ambiente disminuyendo el uso extensivo de controles químicos. La razón de utilizar al tabaco en este estudio se debe a que es una planta modelo que puede facilitar el análisis funcional de genes involucrados en la resistencia y ayudar a determinar la conservación de rutas de señalización entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Análisis *in silico*

2.2.1.1 Obtención de secuencias homólogas a MaRAR1 de plátano en otras especies de plantas

Para la búsqueda de secuencias homólogas a RAR1 en otras especies de plantas se utilizó la base de datos del Phytozome (<http://www.phytozome.net>) que permite analizar la historia evolutiva de cada gen vegetal disponible en la misma a nivel de organización de secuencia, estructura, familia de genes, al mismo tiempo se puede tener acceso a secuencias de genomas completos de plantas (actualmente 35), así como de otros organismos como algas (Goodstein *et al.*, 2012; <http://www.phytozome.net/>). Para la búsqueda de secuencias se partió de la secuencia completa de MaRAR1 de plátano que consta de 215 aminoácidos (648 pb), la cual aún no se encuentra disponible en la base de datos del NCBI (Canul, 2010). Se usó la herramienta BLASTP utilizando los parámetros por defecto con la finalidad de encontrar secuencias homólogas en el genoma de las plantas.

2.2.1.2 Alineamiento múltiple de secuencias tipo RAR1 de diferentes especies de plantas

Se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias de aminoácidos de la proteína RAR1 de plátano junto con la de otras secuencias de aminoácidos de otras plantas. La secuencia de MaRAR1 fue alineada con las secuencias de *A. thaliana* (AT5G51700.1), *Carica papaya* (evm.model.supercontig_3.258), *Ricinus communis* (30147.m014164), *Citrus cinensis* (orange1.1g027086m), *Glycine max* (Glyma10g38720.1), *Setaria italica* (Si018156m), *Brachypodium distachyon* (Bradi3g45030.1). El alineamiento múltiple fue realizado en el software Clustal X2 utilizando los parámetro por defecto establecidos por el programa (Larkin *et al.*, 2007). Finalmente se realizó el sombreado de aminoácidos conservados utilizando el programa BOXSHADE v. 3. 21.

2.2.1.3 Modelaje por homología de la estructura tridimensional de la secuencia tipo RAR1 de plátano

Para evaluar si la secuencia de aminoácidos de *MaRAR1* podría presentar una conformación tridimensional similar a la estructura descrita por Zhang *et al.* (2010) de la secuencia del dominio CHORD II de *A. thaliana*, se realizó un modelaje por homología de la estructura tridimensional de la secuencia del dominio CHORD II de

MaRAR1 de plátano, utilizando el programa Swiss Model (Arnold *et al.*, 2006). Dicho programa se basa en desarrollar una predicción del modelo tridimensional basándose en la homología de la secuencia introducida al programa y la base de datos del "Protein Data Bank", que contiene la estructura tridimensional de proteínas que han sido modeladas por métodos de espectrometría o resonancia magnética nuclear (Bordoli *et al.*, 2009). Se utilizaron los parámetros por defecto establecidos por el programa.

2.2.2 Elaboración del pC35SMa para la transformación genética de tabaco

2.2.2.1 Multiplicación de los plásmidos pGRAR1 y pC35NOS

Se utilizó el plásmido pGRAR1 generada por Canul (2010) que consiste en el vector pGEM-T-Easy que contiene el ADN complementario del gen *MaRAR1*, un gen tipo *RAR1* de la variedad 'Tuu Gia' de plátano, el cual presenta un marco de lectura abierto de 648 pb. Por otro lado Vallejo-Reyna (2011) generó el vector de construcción pC35NOS que consiste del vector binario pCAMBIA2200, el cual incluye al promotor 35S y el terminador NOS. pCAMBIA 2200 (<http://www.cambia.org>; Fig. 2.1) es un plásmido que permite realizar transformaciones mediante *A. tumefaciens*, tiene un tamaño de 8894 pb, contiene el gen *nptII* que aporta resistencia al antibiótico kanamicina lo que permite la selección de posibles plantas transformadas, y para la selección de bacterias cuenta con un gen *cmr* que aporta resistencia a cloranfenicol; también contiene el sitio multiclonal PUC18 dentro del gen *lacZ* que permite introducir la secuencia de DNA de interés. Con la finalidad de obtener copias de los plásmidos pGRAR1 y pC35NOS se llevó a cabo la transformación de *E. coli*.

Se usó la cepa DH10B de *E. coli* y para su transformación se transfirió 1 μL de cada plásmido a un tubo de microcentrifuga y se le adicionó 100 μL (3×10^8 cel/mL) de células competentes. Se incubó en hielo por 30 minutos y posteriormente se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos e inmediatamente se enfrió en hielo por 3 minutos. Seguidamente se le adicionó 900 μL de medio SOC y se dejó incubando a 37 °C por 1 hora 30 minutos a 150 rpm en un orbitador. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 1620 rcf por 5 min, la pastilla se resuspendió en 100 μL de medio SOC y se plaquearon en cajas Petri con medio LB (sólido) suplementado con 10 mg/L cloranfenicol para pCAMBIA 2200 y 100 mg/L de ampicilina para pGEM-T-Easy. Las cajas Petri se dejaron incubando a 37 °C por 16 horas. Las colonias seleccionadas fueron transferidas a medio LB (líquido) junto con el antibiótico

correspondiente a cada plásmido y fueron cultivadas a 37 °C por 16 h a 225 rpm en un orbitador. Los plásmidos fueron extraídos con el estuche comercial High Pure Plasmid Isolation (Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor a partir de un volumen final de 4 mL de cultivo bacteriano sedimentado. La pastilla obtenida se resuspendió en 50 µL de Tris-HCl pH 7.5 10 mM y el plásmido se almacenó a -20 °C. Para la comprobación de la presencia del inserto 35S::NOS en pC35NOS se realizó una digestión con las enzimas EcoRI y HindIII, mientras que para pGRAR1 se utilizó la enzima EcoRI cuyos sitios de restricción flanquean al inserto. La reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL con los siguientes reactivos: 3 µL de resuspensión de plásmido purificado, 0.5 µL de enzima EcoRI (20 U/µL), 0.5 µL de enzima HindIII (10 U/µL), 2 µL de buffer 10 X y 14.5 µL de agua ultrapura. Se incubó a 37 °C por 1 hora y se inactivó a 65 °C por 15 minutos. El producto de la digestión se visualizó en un gel de agarosa 1.2%- TAE 1X con bromuro de etidio (0.2 µg/mL) para la comprobación de la presencia del inserto de interés.

2.2.2.2 Subclonación de *MaRAR1* en pCAMBIA 2200 para dar lugar a pC35SMa

La ORF de *MaRAR1* se obtuvo del pGRAR1 mediante una digestión con la enzima de restricción BamHI en un volumen final de 50 µL: 1 µg de plásmido, 1 µL de enzima BamHI (20 U/µL), 0.5 µL de BSA (10 mg/mL) (NEB), 5 µL de buffer 2 (NEB) y 33.5 µL de agua ultrapura. Se incubó a 37 °C por 2 horas. Por su parte el pCAMBIA 2200 fue digerido con la enzima Sall bajo las mismas condiciones pero usando el buffer 3 (NEB). Se realizaron purificaciones después de cada digestión con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se resuspendió en 50 µL de Tris-HCl pH 7.5 10 mM y se almacenó a -20 °C. Los productos de las purificaciones se visualizaron en un gel de agarosa 1.2% en TAE 1X.

El gen *MaRAR1* purificado se insertó y ligo al pC35NOS y se le nombró pC35SMa. La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL usando 0.1µg/µL de plásmido, 0.2 µg/µL de inserto, 0.5 µL de la enzima T4 DNA ligasa (1 U/µL), 2 µL de buffer ligasa. La mezcla de ligación fue incubada a 16 °C por 16 horas.

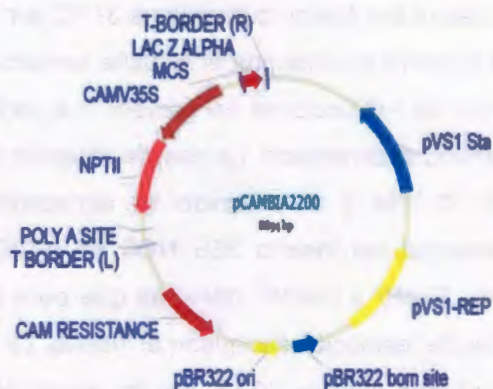


Figura 2. 1. Plásmido pCambia2200. Este vector contiene el gen *nptII* que codifica la proteína neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia al antibiótico de kanamicina y el gen *cmr* que codifica para la cloranfenicol acetil transferasa que confiere resistencia a cloranfenicol. La expresión del gen *nptII* está regulada por el promotor constitutivo CaMV35S. <http://www.cambia.org>.

La reacción de ligación fue utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH10B. Para la transformación con la construcción se utilizaron los 20 μL de la ligación y 200 μL (3×10^8 cel/mL) de células competentes. La mezcla fue incubada en hielo durante 20 minutos y después se le sometió a un choque térmico a 42 °C por 45 segundos e inmediatamente fue enfriada en hielo por 3 minutos. Seguidamente se le adicionó 1000 μL de medio SOC y se dejó incubando a 37 °C por 1 hora 30 minutos a 150 rpm en un orbitador. Posteriormente las células fueron recuperadas centrifugando a 1620 rcf por 5 minutos y se plaquearon en cajas Petri con medio LB (sólido) con 10 mg/L de cloranfenicol. Las cajas Petri se dejaron incubando a 37 °C por 16 horas. Las colonias seleccionadas fueron transferidas a medio LB (líquido) suplementado con 100 mg/L de ampicilina y fueron cultivadas a 37 °C por 16 horas a 225 rpm. Los plásmidos fueron extraídos con el estuche comercial High Pure Plasmid Isolation (Roche) siguiendo las instrucciones del proveedor a partir de un volumen final de 4 mL de cultivo bacteriano sedimentado. Las pastillas resultantes fueron resuspendidas en 50 μL de Tris-HCl pH 7.5 10 mM. Los plásmidos purificados se almacenaron a -20 °C.

Con el propósito de comprobar la inserción de *MaRAR1* en pC35NOS se llevó a cabo un análisis de restricción con las enzimas EcoRI y HindIII que liberan un fragmento de 1506 pb, esto debido a que estas enzimas flanquean los extremos del casete de expresión que estaría formado por el promotor, el gen *MaRAR1* y el terminador. La reacción de digestión se llevó a cabo en un volumen final de 20 μL : 0.5 μg de plásmido, 0.5 μL de enzima EcoRI (20 U/ μL), 0.5 μL de enzima de HindIII (10 U/ μL), 2

μL de buffer 2 10 X (NEB) y 14 μL de agua ultrapura. Se incubó a 37 °C por 1 hora y se inactivó a 65 °C por 15 minutos. La digestión se visualizó en un gel de agarosa 1.2%- TAE 1X.

2.2.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con el pC35SMa

Una vez que se obtuvo el pC35SMa se procedió a introducir este plásmido en cepas LBA4404 de *A. tumefaciens*. Para la transformación de las cepas se realizó lo siguiente: 1μg de plásmido se mezcló con 200 μL de células, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido por 1 minuto, seguido se dio un choque térmico a 37 °C por 5 minutos y se incubó en hielo por 3 minutos. Las bacterias transformadas se recuperaron agregando 800 μL de medio YM (Extracto de levadura, D-manitol, NaCl, MgSO₄·7H₂O, K₂HPO₄·3H₂O, agar a pH 7.0) e incubando en oscuridad a 28 °C por 3 horas a 150 rpm. Se colectaron la células centrifugando a 1503 rcf por 5 minutos y se plaquearon 100 μL de bacterias en cajas Petri con medio YM con 100 mg/L de estreptomicina, 10 mg/L de cloranfenicol y 50 mg/mL de rifampicina. Las cajas fueron incubadas en oscuridad a 28 °C por 48 hrs, finalmente las colonias que fueron capaces de crecer son las que contenían el plásmido de interés.

2.2.3.1 PCR múltiple para la comprobación de la transformación de *A. tumefaciens*

Para la verificación de la transformación de *A. tumefaciens* se realizó una PCR múltiple a las colonias que fueron capaces de crecer en medio YM con 100 mg/L de estreptomicina, 10 mg/L de cloranfenicol y 50 mg/L de rifampicina. Se utilizaron los oligos que amplifican una región interna de los genes *VirG* de *A. tumefaciens*, estos oligos generan un amplicón de 200 pb (cuadro 2.1). En cuanto a los oligos del gen *MaRAR1* se utilizaron los que amplifican una región interna de 240 pb del gen (cuadro 2.1). Para la PCR se escogieron y se marcaron 3 colonias, estas colonias se picaron con la ayuda de palillos y se disolvieron en 20 μL de H₂O y posteriormente se le realizó un precalentado a 100° por 10 minutos para degradar a las proteasas de la bacteria. La reacción de amplificación del gen *MaRAR1* y del gen *VirG* se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL con 0.2 μL de Taq Polimerasa (5 U/μL, Invitrogen), 2 μL de dNTPs 10 mM, 2.5 μL de MgCl₂ 50 mM, 5 μL de PCR buffer 10x y 16.3 μL de agua ultrapura. Se usó 1 μL (10 μM) de cada uno de los oligos sentido y antisentido (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Oligonucleótidos específicos de los genes *MaRAR1* de plátano y *VirG* de *A. tumefaciens*

MaRAR1	Sentido	5'-CGTCTCTGATCATGGATCACAAGG-3'
	Antisentido	5'-TCACAGCATTTCACCCCTCT-3'
VirG	Sentido	5'-AAGGTGAGCCGTTGAAACAC-3'
	Antisentido	5'-ATCTCAAGCCCATCTTCACG-3'

La reacción de PCR se efectuó con el siguiente programa: 1. Desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min; 2. Desnaturalización: 95 °C por 30 segundos; 3. Alineamiento: 50 °C por 30 segundos; 4. Extensión: 72 °C durante 30 segundos; repetición del paso 2-4 por 39 veces; 6. Extensión final: 72 °C por 5 minutos. Se tomó una alícuota de 10 µL de los productos de PCR, y se fraccionó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1.5%-TAE 1X. Las colonias que dieron positivo fueron seleccionadas y transferidas a medio YM (líquido) con 100 mg/L de estreptomicina, 10 mg/L de cloranfenicol y 50 mg/mL de rifampicina y fueron cultivadas a 28 °C por 24 horas a 225 rpm. Para almacenarlas se tomaron 500 µL de *A. tumefaciens* y se les adicionó 300 µL de glicerol al 65%. Estas muestras se almacenaron a -80 °C.

2.2.4 Transformación de plantas de tabaco mediante *A. tumefaciens* con el plásmido pC35SMa

La transformación de tabaco se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Clemente en 2006. Primero se inocularon tubos falcon con 5 mL de medio YM con 100 mg/L de estreptomicina, 10 mg/L de cloranfenicol y 50 mg/mL de rifampicina con colonias de *A. tumefaciens* transformada con pC35SMa, y se incubaron en oscuridad a 28 °C a 200 rpm por 12 hrs. Al día siguiente se inocularon dos matraces, uno con 500 µL y otro con 1 mL de cultivo de *A. tumefaciens* en 50 mL de medio YM con 100 mg/L de estreptomicina, 10 mg/L de cloranfenicol, 50 mg/mL de rifampicina y 100 µM de acetosiringona, y se incubaron a 28 °C a 200 rpm por 12 hrs en orbitador. Transcurrido el tiempo se procedió a medir la densidad óptica de los cultivos hasta llegar a una densidad dentro de un rango de 0.6-1.0. Una vez obtenida la densidad óptica (DO) deseada se colectaron las células por centrifugación a 2880 rcf por 20 minutos y se retiró el sobrenadante, las bacterias fueron resuspendidas en 20 mL de medio de co-cultivo líquido (cuadro 2.2) con 100 µM de acetosiringona y se incubó a 28 °C a 150

rpm por 1 hora en un orbitador. Posteriormente se midió de nuevo la densidad óptica (0.6-1.0). Por su parte, siguiendo el protocolo de Clemente (2006) los explantes de tabaco fueron obtenidos 24 hrs antes de iniciar la transformación, y depositados en cajas con medio de pre-cultivo. Para realizar la transformación, en la campana de flujo laminar se agregaron los explantes de tabaco al cultivo de *A. tumefaciens* y fueron incubados a 28 °C a 75 rpm por 30 minutos. Posteriormente, los explantes se transfirieron a cajas Petri con medio de co-cultivo sólido con 100 µM de acetosiringona y se incubaron en oscuridad a 25 °C por 72 hrs. Transcurrido el proceso de transformación se realizaron lavados de los explantes en medio de co-cultivo líquido con 150 mg/L de timentina con el objetivo de evitar el crecimiento de *Agrobacterium*. Los explantes fueron depositados en medio de regeneración (cuadro 2.2) con 150 mg/L de kanamicina y 150 mg/L de timentina y se dejaron en condiciones de 25 °C con fotoperiodo de 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad durante 3 semanas para generar los brotes de tejido transformado. Finalmente, los brotes obtenidos de aproximadamente 1 cm de tamaño fueron colocados en cajas magenta con medio de enraizamiento (cuadro 2.2) para inducir la producción de raíces, donde cada caja magenta contenía 75 mg/L de kanamicina y 150 mg/L de timentina. Una vez que las plantas generaron raíces fueron sembradas en sustrato de una mezcla comercial "peat moss" y perlita (Pro-Mix), y mantenidas a una temperatura de 26 °C ± 2 °C bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. La intensidad lumínica (75 µmol/m²s) fue suministrada con lámparas Philips T5HO.

Cuadro 2.2. Medios de cultivo para la transformación genética de *Nicotiana tabacum* con *A. tumefaciens* (Clemente, 2006).

Soluciones	Medio de pre-cultivo 1 L	Medio de co-cultivo 1 L	Medio de propagación 1 L	Medio de enraizamiento 1 L
Macronutrientes 10X	100 mL	10 mL	100 mL	50 mL
Micronutrientes 100X	10 mL	1 mL	10 mL	5 mL
Fe EDTA 100X	10 mL	1 mL	10 mL	10 mL
Vitaminas 100X	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
MES	-	3.7 g	-	-
BAP (1mg/mL)	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
ANA (1mg/mL)	0.1 mL (100 µL)	0.1 mL (100 µL)	0.1 mL (100 µL)	0.1 mL (100 µL)
pCPA (8 mg/mL)	1 mL	1 mL	-	-
Sacarosa	30 g	30 g	30 g	30 g
pH (KOH/HCl)	5.7	5.4	5.7	5.7
Agar	8 g	8 g	8 g	8 g

*Modificaciones realizadas según el cultivo a partir de Murashige y Skoog, 1962.

*Ver Anexo 1 para consultar los componentes de las soluciones para el medio MS.

2.2.6 Extracción de ADN de plantas de tabaco

El ADN fue extraído utilizando el kit de Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction (General Electric). Entre 150 y 250 mg de hoja de tabaco fueron macerados en un mortero con nitrógeno líquido. La pastilla se resuspendió en 50 µL de H₂O ultrapura, las trazas de ARN fueron degradadas con 2 µL de RNasa A (1 mg/µL) incubando a 37 °C por 30 minutos. Finalmente las muestras fueron conservadas a -20 °C.

2.2.7 Detección por PCR de la presencia del transgén *MaRAR1* en líneas de tabaco transformadas con pC35S_{Ma}

Se evaluó la presencia de *MaRAR1* en las plantas de tabaco de la generación T₀ y T₁ a través de la técnica molecular de PCR, empleando oligos para la amplificación de la región interna del gen *MaRAR1* (240 pb, cuadro 2.1). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL, con 1 µL de template, 0.2 µL de TaqPolimerasa (5 U/ µL, Invitrogen), 1 µL de dNTPs 10 mM, 1.5 µL de MgCl₂ 50 mM, 5 µL de PCR buffer 10x y 38.3 µL de agua ultrapura. Se usó 1 µL (10 µM) de cada uno de los oligos sentido y antisentido.

La reacción de PCR se efectuó con el siguiente programa: 1. Desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min; 2. Desnaturalización: 95 °C por 30 segundos; 3. Alineamiento: 55 °C por 30 segundos; 4. Extensión: 72 °C durante 1 minuto; repetición del paso 2-4 por 39 veces; 6. Extensión final: 72 °C por 5 minutos. Se tomó una alícuota de 10 µL de los productos de PCR, y se fraccionó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1.2%-TAE 1X. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el 2-Log DNA Ladder (BioLabs).

2.2.8 Germinación de semillas de la generación T₁ de *Nicotiana tabacum*

Se germinaron semillas correspondientes a la generación T₁ de las cuatro líneas transgénicas, la silvestre (WT) y líneas transformadas con el vector pCAMBIA 2200 (sin la construcción de estudio) obtenidas a partir de plantas de la generación T₀. Para la germinación se siguió el protocolo descrito por Clemente (2006). Las semillas fueron sembradas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 30 g/L sacarosa y 150 mg/L de kanamicina, y se cultivaron a 25 °C con fotoperiodo de 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad. Una vez enraizadas en magentas que contenían 75 mg/L de kanamicina, las plantas fueron colocadas en sustrato de una mezcla comercial "peat moss" y perlita (Pro-Mix), a una temperatura ambiente de 26 °C ± 2 °C bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. La intensidad lumínica (75 µmol/m²s) fue suministrada con lámparas Philips T5HO.

2.2.9 Southern blot

2.2.9.1 Digestión con la enzima EcoRI

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de hojas de tabaco, tanto de las líneas transgénicas como de la silvestre. La enzima de restricción con la que se digirió el ADN de las plantas fue EcoRI. Se digirieron 5-10 µg de ADN empleando 1U de enzima por cada µg de ADN en un volumen de 30 µL con el buffer REact3 (Invitrogen). Las digestiones se llevaron a cabo a 37 °C durante 12 horas. Para visualizar el producto de la digestión, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% en TAE 1X a un voltaje de 9 V/cm durante 85 minutos.

2.2.9.2 Southern blotting

Tras la electroforesis, el gel se introdujo en una solución de depurinación (1.1% HCl) durante 10 minutos, a continuación se trató en una solución de desnaturalización (1.5 M NaCl; 0.5 M NaOH) por 30 minutos y después en una solución de neutralización (1.5 M NaCl; 0.5 M Trizma base) por 30 minutos. La transferencia del ADN hacia la membrana de nylon (Roche) se realizó con citrato de tri-sodio 0.3 M y 3 M NaCl (20XSSC) durante toda la noche. A continuación se lavó la membrana con 2XSSC y el ADN se fijó con luz ultravioleta en un equipo crosslinker (UVP CL-1000) (modificado de Sambrook y Russell, 2001).

2.2.9.3 Marcaje de la sonda de ADN

La sonda se marcó con digoxigenina mediante PCR, para esto fue necesario introducir en la reacción de PCR una cierta porción de uno de los desoxirribonucleótidos precursores marcado. Se utilizó dUTP unido a digoxigenina (Dig-dUTP) (Roche). Para el marcaje de la sonda del gen *MaRAR1* se utilizó como templete el plásmido pC35SMa. El volumen de la reacción fue de 20 µL y la proporción de precursor marcado a no marcado (Dig-dUTP: dTTP) fue 1:3. La concentración final de los componentes de la reacción fueron los siguientes: 100 pg de ADN, buffer de reacción de Expand 1x, 0.2 mM de una mezcla de dATP, dGTP y dCTP, 130 µM de dTTP, 70 µM de Dig-dUTP, 0.5 µM de cada oligo y 1U de Expand long template (Roche).

La reacción de PCR se efectuó con el siguiente programa: 1. Desnaturalización inicial de 95 °C por 3 min; 2. Desnaturalización: 95 °C por 30 segundos; 3. Alineamiento: 50 °C por 30 segundos; 4. Extensión: 68 °C durante 1 minuto; repetición del paso 2-4 por 30 veces; 6. Extensión final: 68 °C por 10 minutos. El producto de PCR fue visualizado en un gel de agarosa al 1.2%, posteriormente se procedió a escindir la banda correspondiente de la sonda, la cual fue purificada con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), ya que la presencia de nucleótidos DIG-dUTP no incorporados en el ADN podría generar un exceso de señal de fondo tras las hibridaciones.

3.2.4.4 Prehibridación e hibridación

Se realizó una prehibridación de la membrana en 20 mL de una solución DIG Easy Hyb (Roche) a 42 °C durante al menos 1 hora. Tras la prehibridación se retiró la solución utilizada y se reemplazó por una nueva añadiéndose 10-15 ng de la sonda marcada previamente desnaturalizada a 100 °C durante 10 minutos y enfriada rápidamente en hielo. La hibridación se realizó a 42 °C durante toda la noche.

3.2.4.5 Detección quimioluminiscente

Tras la hibridación la membrana se colocó en una charola de tamaño similar a la membrana. La membrana se sometió a los siguientes lavados de post-hibridación: 2 lavados de 5 min en solución lavado de baja astringencia (2X SSC, SDS al 0.1%) a temperatura ambiente, y 2 lavados de 15 min en la solución de lavado de alta astringencia a 68 °C (0.1X SSC, 0.1% SDS). A continuación se sumergió la membrana en un amortiguador de lavado (0.1 M ácido maleico, 0.15 M NaCl pH 7.5, 0.3% Tween 20) durante 5 minutos para equilibrarla. Posteriormente se sumergió la membrana en la solución de bloqueo (Roche) (dilución 10X solución de bloqueo 1:10 con el buffer de ácido maleico) durante 30 min, bloqueándose así los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo. Después se preparó una solución del anticuerpo (anti-Digoxigenina-AP) (Roche) a una dilución 1:10 en la solución de bloqueo y se sumergió la membrana durante 30 min con agitación suave.

La eliminación del anticuerpo no unido al ADN se realizó mediante 2 lavados en el amortiguador de lavado antes descrito durante 15 min. A continuación, se sumergió la membrana en amortiguador de detección (0.1 M Tris-HCl; 0.1 M NaCl, pH 9.5) durante 5 min. Se preparó una solución del sustrato CDP-star (Roche) en el amortiguador de detección diluyendo 1:100 y se puso en contacto con la membrana durante 5 min, después se eliminó el exceso de la solución del sustrato y finalmente se selló la membrana en una bolsa de plástico y se colocó en un casete con una película sensible a la luz visible, durante 30 minutos y se reveló la película empleando el revelador (RP X-OMAT) y el fijador (RP X-OMAT).

2.2.10 Extracción de ARN en plantas de tabaco

Para la extracción de ácido ribonucleico total se usaron de 50 a 150 mg de tejido de hoja que fueron macerados en nitrógeno líquido con un mortero y pistilo. El tejido pulverizado se colocó en un tubo tipo eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 1 mL del reactivo trizol (Sigma) por cada 100 mg de tejido. Se homogeneizó y se centrifugó a 13523 rcf por 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo tipo eppendorf nuevo y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, los ácidos nucleicos se separaron del material proteico agregando 0.2 mL de cloroformo por cada mL de Trizol agregado inicialmente, se homogeneizó e incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se centrifugó a 13523 rcf por 15 minutos. Se removió el sobrenadante, se transfirió a un tubo nuevo y se precipitaron los ácidos nucleicos con

500 mL de isopropanol frío incubando la muestra a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 13523 rcf por 10 minutos. La pastilla fue lavada con etanol al 70%, se retiró el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente la pastilla fue resuspendida en 50 μ L de H₂O Ultra pura (Invitrogen).

2.2.11 Cuantificación de ácidos nucleicos mediante espectrofotometría

Para estimar la concentración y el nivel de pureza del ARN extraído se utilizó un espectrofotómetro SmartSpect plus de BioRad a una longitud de onda de 260 nm. Se tomaron 5 μ L de muestra más 95 μ L de H₂O ultrapura (dilución 1:20) para cuantificar la concentración. La concentración de ARN parte de que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 μ g/mL de ARN. La siguiente ecuación es la que se utilizó para estimar la cantidad de ARN total:

Concentración de ARN = (Absorbancia a 260 nm) (Factor de conversión) (Factor de dilución)

Donde:

Factor de conversión = 40 μ g/mL

Factor de dilución = 20

2.2.12 Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis de ADNc se partió de una muestra de 5 μ g de ARN total, se agregaron 1 μ L (50 μ M) de oligo dT primer (5'-GCTGTCAACGATACGCTAACGTAACG-3', Invitrogen) y la cantidad de agua necesaria para llegar a un volumen de 20 μ L, se calentó la muestra a 75 °C por 5 minutos para linearizar los ARN mensajeros y se enfrió la muestra en hielo por 3 minutos. A los 20 μ L se agregaron 8 μ L de buffer de la enzima transcriptasa reversa (5X first strand buffer), 4 μ L 0.01M de DTT (0.1M), 2 μ L de dNTPs (10 mM) y 2 μ L de inhibidor de RNasas (RNase OUT 40U/ μ L Invitrogen). Los 38 μ L de reacción se dividieron en dos tubos diferentes con 19 μ L cada uno. En el primer tubo se agregó 1 μ L de enzima transcriptasa reversa (Super Script III 200 U/ μ L, Invitrogen) y en el segundo tubo se agregó 1 μ L de agua ultra pura como control negativo para descartar contaminación por ADN genómico. La reacción se incubó por 90 minutos a 50 °C, después se inactivó la enzima incubando la muestra a 75 °C por 15 min. Seguidamente se agregaron 2 μ L de RNasa A (10mg/mL) para degradar el

ARN remanente incubando la muestra a 37 °C por 30 min. Finalmente, se diluyó la muestra 1:5 ajustando la reacción a un volumen final de 100 µL.

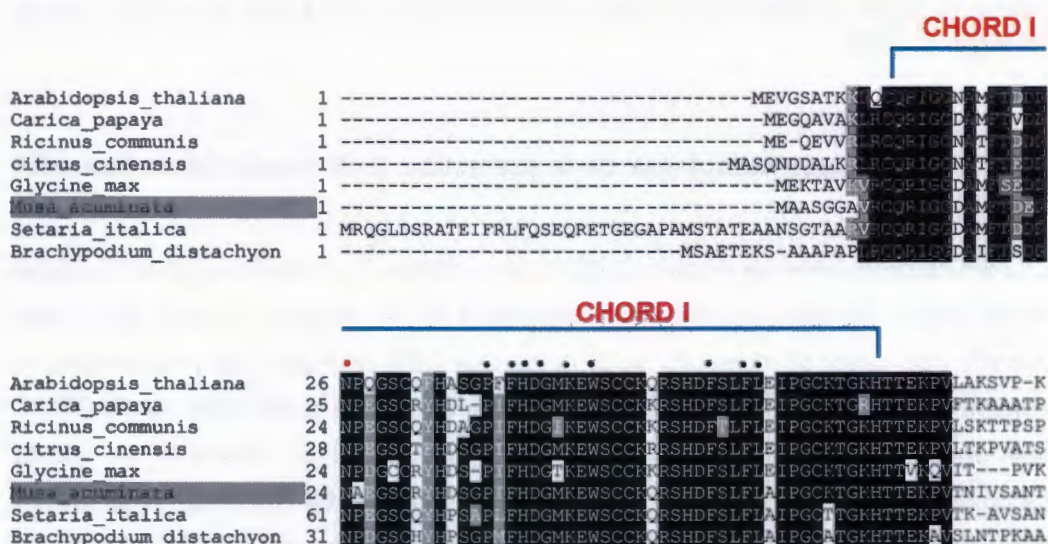
2.2.13 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo utilizando 5 µL de ADNc de cada tejido como plantilla. Se usaron oligos que amplifican la región interna de *MaRAR1* (240pb, cuadro 2.1). El programa para llevar a cabo la reacción utilizó una temperatura inicial de desnaturalización de 95 °C por 3 min; 2. Desnaturalización: 95 °C por 30 segundos; 3. Alineamiento: 55 °C por 30 segundos; 4. Extensión: 72 °C durante 1 minuto; repetición del paso 2-4 por 39 veces; 6. Extensión final: 72 °C por 5 minutos. Como control positivo para comprobar que no haya habido una carga diferencial en el gel y para cerciorarse que los componentes de la reacción funcionen adecuadamente, se utilizaron oligos para el gen del factor de elongación 1 alfa (EF₁α) de tabaco. El control negativo (muestra sin retrotranscriptasa) también utilizó estos oligos, en este caso no se esperaba ver amplificación, de ocurrir sería un indicativo de contaminación de la reacción. Se tomó una alícuota de 10 µL de los productos de RT-PCR, y se fraccionó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1.2%, en TAE 1X. El marcador de peso molecular que se utilizó fue el 2-Log DNA Ladder (New England BioLabs).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Alineamiento múltiple de MaRAR1 de plátano con proteínas RAR1 de otras plantas

El alineamiento múltiple reveló que varias regiones de la proteína MaRAR1 de plátano se encuentran altamente conservadas con la secuencia RAR1 de las otras plantas (Fig. 2.2). Se pueden observar en la figura 2.2 que el dominio CHORD I y el dominio CHORD II al parecer se encuentran altamente conservado en las secuencias tipo RAR1 de las diferentes especies de plantas. Previamente Canul (2010) en su trabajo de tesis reportó que la secuencia MaRAR1 de plátano, presenta los dos dominios CHORD I y II y que se encuentran altamente conservados, así como el motivo CCCH (puntos naranjas) que aunque de función aún desconocida, nos proporciona información valiosa acerca de la estructura primaria de la proteína. Sin embargo, no se había reportado los aminoácidos de MaRAR1 de plátano esenciales para la interacción con otras proteínas. Se pueden observar a lo largo de la secuencia de MaRAR1 de plátano los aminoácidos conservados de *A. thaliana* (AtRAR1) (Asn26, Ile153, Asn154, Glu170, Asn173, Glu175 y Trp217) importantes para la unión de AtRAR1 con la proteína SGT1 (puntos rojos); también se conservan los aminoácidos de AtRAR1 (Pro38, Phe40, His41, Asp42, Lys45, Trp47, Phe57, Phe60, Leu61, Ala185, Phe187, His188, Asp189, Arg192, Trp194, Phe204, Asp205 y Phe207) necesarios para la unión de AtRAR1 con la proteína HSP90 (puntos negros) reportado en el trabajo de Zhang *et al.* 2010.



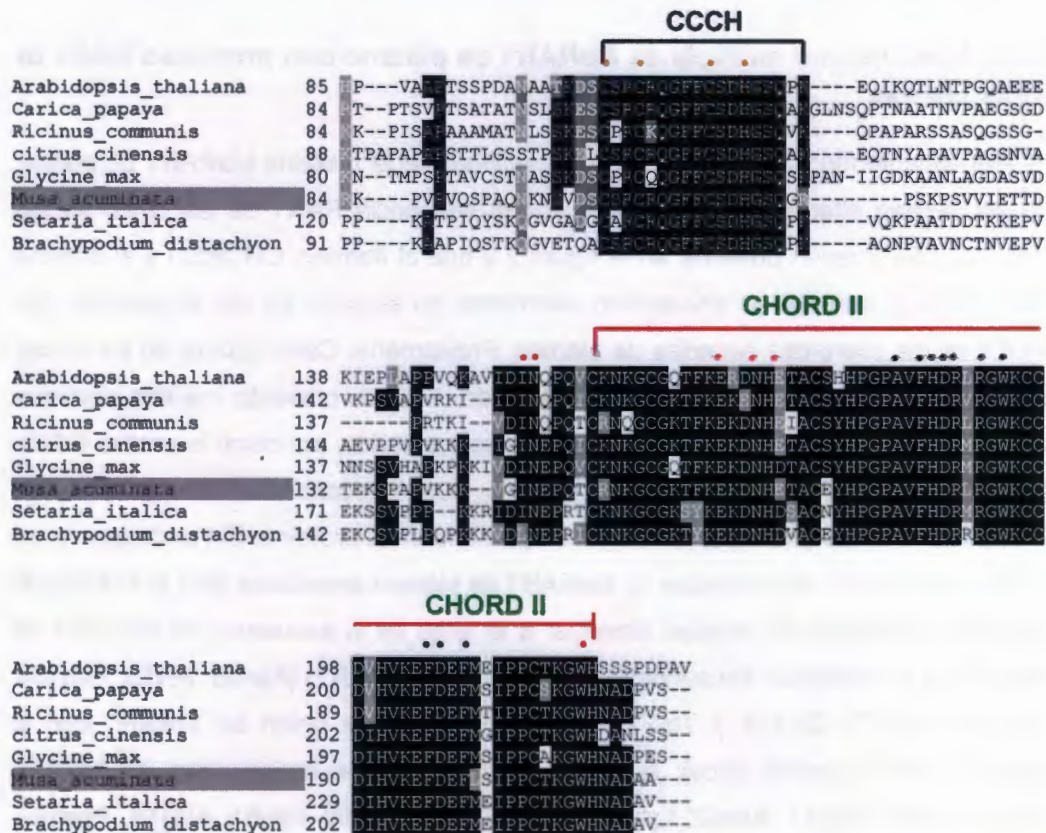


Figura 2. 2. Alineamiento por el programa CLUSTAL X de la secuencia MaRAR1 de plátano con secuencias RAR1 de otras especies de plantas. Los aminoácidos conservados están sombreados en negro. Se resaltan los dominios CHORD I (línea azul) y CHORD II (línea roja), mientras que los aminoácidos de unión a SGT1 se señalan con puntos rojos y los de unión a HSP90 en negro. Las cisteínas e histidina del motivo CCCH se señalan en puntos naranjas (Zhang *et al.*, 2010).

2.3.2 Modelaje por homología de la estructura tridimensional de MaRAR1 de plátano

La estructura terciaria del dominio CHORD II de plátano fue predicha por el programa Swiss-Model usando como molde la secuencia de *A. thaliana* (protein Data Bank 2xcmF) que hasta el momento es la única que está caracterizada y disponible. El dominio CHORD II está fuertemente conservado en plantas a diferencia de CHORD I, que se conserva más en mamíferos (Zhang *et al.*, 2010). Zhang *et al.* (2010) determinaron la estructura terciaria del complejo HSP90-SGT1-CHORD II; el análisis estructural y bioquímico mostró la arquitectura del complejo HSP90, RAR1 y SGT1

que recluta a los receptores NLR, y sugiere que las proteínas de dominio CHORD, al igual que otras co-chaperonas como HSP90 participan en el reclutamiento de receptores, y manipulan los elementos estructurales que controlan el ciclo de conformación de la ATPasa de la chaperona. En la figura 2.3B se observa que la estructura del dominio CHORD II de MaRAR1 contiene 7 regiones β -plegadas y 1 α -hélice. Realizando una comparación con el estudio realizado por Zhang y colaboradores en 2010, el dominio CHORD II de *A. thaliana* (protein Data Bank: 2xcmF, figura 2.3 A) presenta 5 β -plegadas y 1 α -hélice que son necesarias para la interacción con otras proteínas. Sin embargo, el dominio CHORD II de plátano se observan las β -plegadas y el α -hélice que se han identificado como necesarias para la interacción con otras proteínas como SGT1 y HSP90. La información obtenida nos dice que posiblemente la proteína MaRAR1 de plátano también interaccione con otras proteínas como SGT1 y HSP90 para poder llevar a cabo su función en defensa contra patógenos.

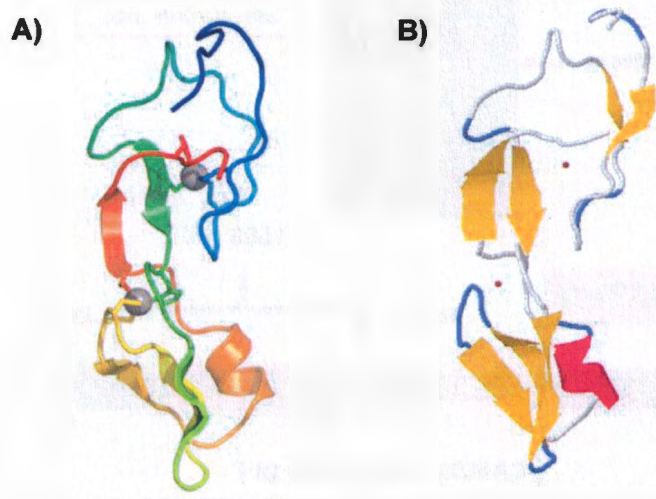


Figura 2. 3. Modelaje tridimensional por homología del dominio CHORD II de la proteína MaRAR1 de plátano. A. Estructura cristalográfica del dominio CHORD II de *A. thaliana* (Zhang *et al.*, 2010). B. La predicción de la estructura CHORD II de plátano basados en el template de *A. thaliana* (template: 2xcmF) presenta las conformaciones de α -hélice (rojo) y β -plegada (amarillo) necesarios para la interacción de la proteína con SGT1 y HSP90.

2.3.3 Subclonación del gen *MaRAR1* en pCAMBIA2200 para dar lugar a pC35SMa

El análisis de restricción con las endonucleasas *EcoRI* y *HindIII* confirmó que la clonación de la ORF de *MaRAR1* en pCAMBIA2200 se realizó exitosamente, dando como resultado el plásmido denominado pC35SMa (pCAMBIA2200::35S::*MaRAR1*::NOS, Fig.2.4B). En la figura 2.4A se pueden observar las bandas esperadas que corresponden al pCAMBIA 2200 que mide 8894 pb y una banda que corresponde al promotor 35S, el gen *MaRAR1* y el terminador NOS con un tamaño de 1506 pb.

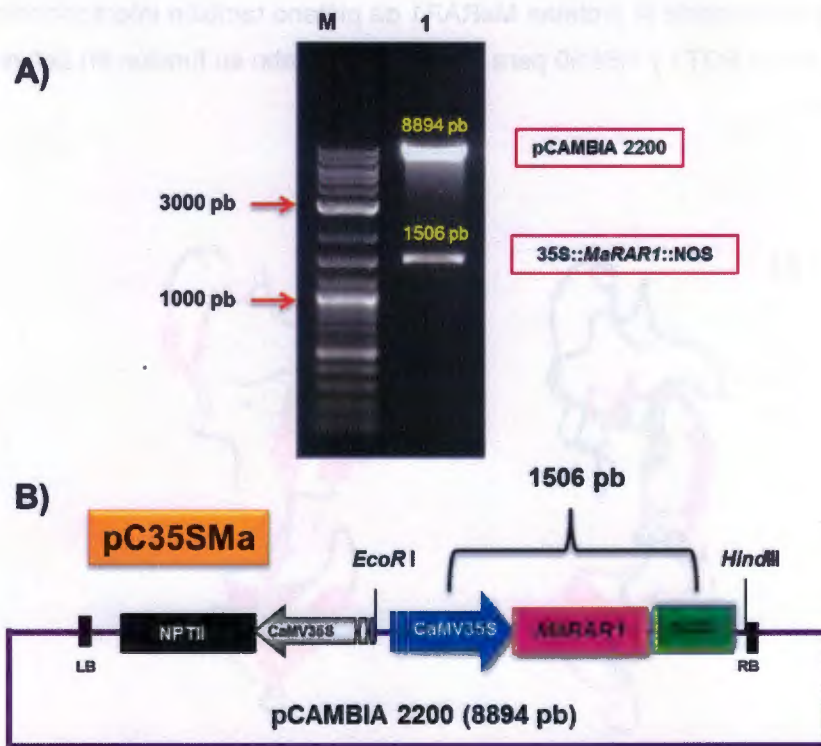


Figura 2. 4. Obtención del pC35SMa. A) Perfil de la digestión del vector pC35SMa con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. Carril 1, fragmentos digeridos con *EcoRI* y *HindIII* de 35S::*MaRAR1*::NOS. M, Marcador de peso molecular. B) Esquema del pC35SMa que contiene el casete de expresión de *MaRAR1* con el promotor 35S y el terminador NOS indicando los sitios de restricción para *EcoRI* y *HindIII*.

2.3.4 Análisis de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con pC35SMA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El pC35SMA se utilizó para transformar *A. tumefaciens*, y con la finalidad de verificar si la transformación fue exitosa, se llevó a cabo una PCR múltiple de colonia. Se pueden observar en la figura 2.5 dos bandas bien definidas, una de 240 pb que corresponde a un amplicón de una región interna del gen *MaRAR1* y la banda de 200 pb que corresponde a un amplicón de una región interna del gen *VirG* de *A. tumefaciens*. Estos resultados muestran que la transformación de *A. tumefaciens* con el casete que contiene nuestro gen de interés fue exitosa y es factible de utilizarse para la transformación de plantas de tabaco.

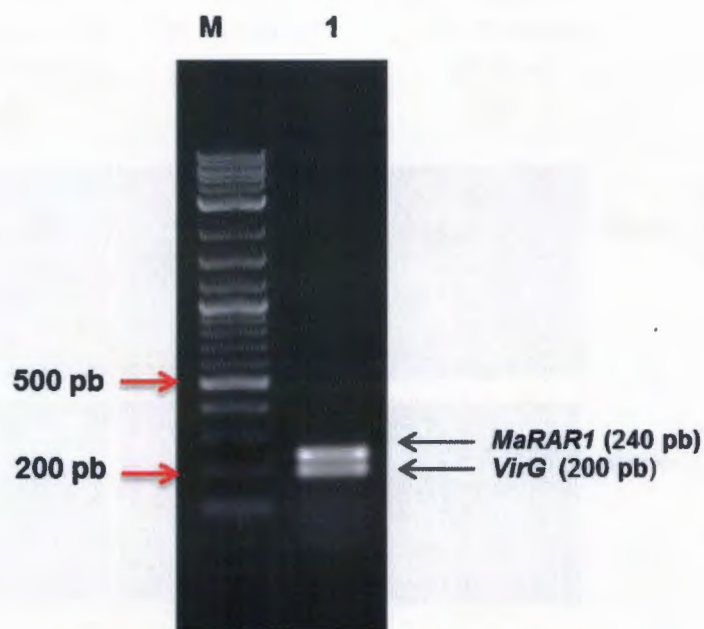


Figura 2. 5. Electroforesis de la PCR múltiple de *A. tumefaciens*. Carril 1, bandas de los amplicones de los genes *MaRAR1* y *VirG*; M, Marcador de peso molecular.

2.3.5 Generación de plantas de tabaco transformadas con el plásmido pC35SMa

En la figura 2.6 se puede observar el proceso de la regeneración de plantas de tabaco desde explantes que fueron sometidos al proceso de transformación con el plásmido pC35SMa mediante *A. tumefaciens* (Fig. 2.6A-2.6C), así como brotes de los explantes sin transformar como control (2.6D-2.6F). El control indica que el proceso de transformación, el tipo de explante usado, así como los medios de cultivo usados fueron adecuados. Se obtuvieron un total de 6 plantas putativamente transformadas y generadas a partir de 10 explantes, sin embargo sólo se lograron 4 plantas positivas. Estas plantas transgénicas se desarrollaron de manera normal, sin alteración en la florecencia, la forma y número de hojas con respecto a las plantas silvestres.

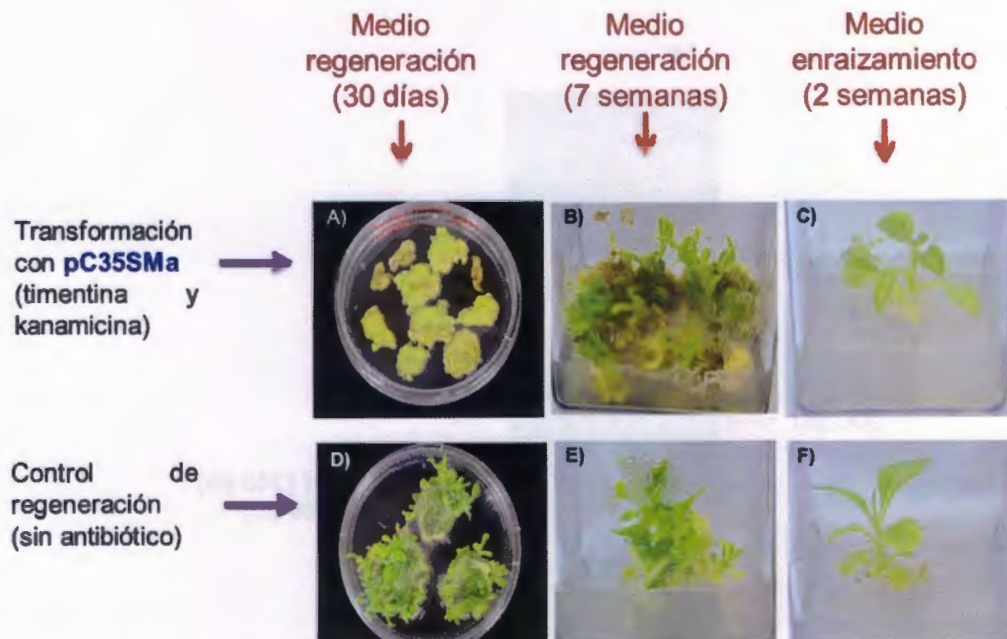


Figura 2. 6. Distintas fases de regeneración de tabaco. A y B) Explantes con brotes después de 4 semanas de la transformación con *A. tumefaciens* en medio de regeneración con 150 mg/L de kanamicina. C) Planta de 2 semanas en medio de enraizamiento con 75 mg/L de kanamicina. D y E) Brotes sin transformar en medio de regeneración sin antibiótico. F) Planta de tabaco sin transformar de 2 semanas en medio de enraizamiento sin antibiótico.

2.3.6. Evaluación de la presencia del transgén en plantas de tabaco transgénicas de la generación T₀

En la Fig. 2.7A se observan las cuatro plantas transgénicas de tabaco en sustrato comercial. Una vez enraizadas las plantas, se tomaron muestras de hoja para extracción de ADN, el cual fue usado como molde para análisis por PCR utilizando oligos específicos que amplifican 240 pb de la región interna del gen *MaRAR1*. En la figura 2.7B se puede apreciar claramente la presencia del amplicón correspondiente al gen *MaRAR1* (240 pb), el cual está presente en las cuatro líneas transgénicas seleccionadas, a diferencia del control, que es una planta de tabaco sin transformar.



Figura 2. 7. Plantas de tabaco transgénicas. A) L-MA1 a L-MA4 plantas transgénicas en sustrato, así como, la inflorescencia de una de las líneas transgénicas. B) Reacción en cadena de la polimerasa de las seis líneas transgénicas de la T₀ de tabaco (L-MA1-L-MA4). WT, planta silvestre (sin transformar). (-), Control negativo de la PCR usando agua como template.

2.3.7 Germinación de semillas de la generación T₁ de tabaco transgénicas

Las cuatro líneas transgénicas T₀ resultaron fértiles, por lo que se recolectaron todas las semillas procedente de su autofecundación (que da lugar a la generación T₁) y se procedió a germinarlas en medio MS suplementado con 30 g/L de sacarosa y 150 mg/L de kanamicina. Las semillas de las cuatro líneas transgénicas tuvieron un porcentaje de germinación de 95%. En la figura 2.8A se observan plántulas de tabaco de las cuatro líneas transgénicas, así como de la silvestre a tres semanas después de la germinación. Las plantas resultantes fueron colocadas en medio de enraizamiento y finalmente sembradas en sustrato de una mezcla comercial "peat moss" y perlita (figura 2.8B), como se describió en materiales y métodos. Finalmente las semillas de la generación T₁ (que dan lugar a la generación T₂) de estas plantas transgénicas fueron recolectadas y almacenadas.

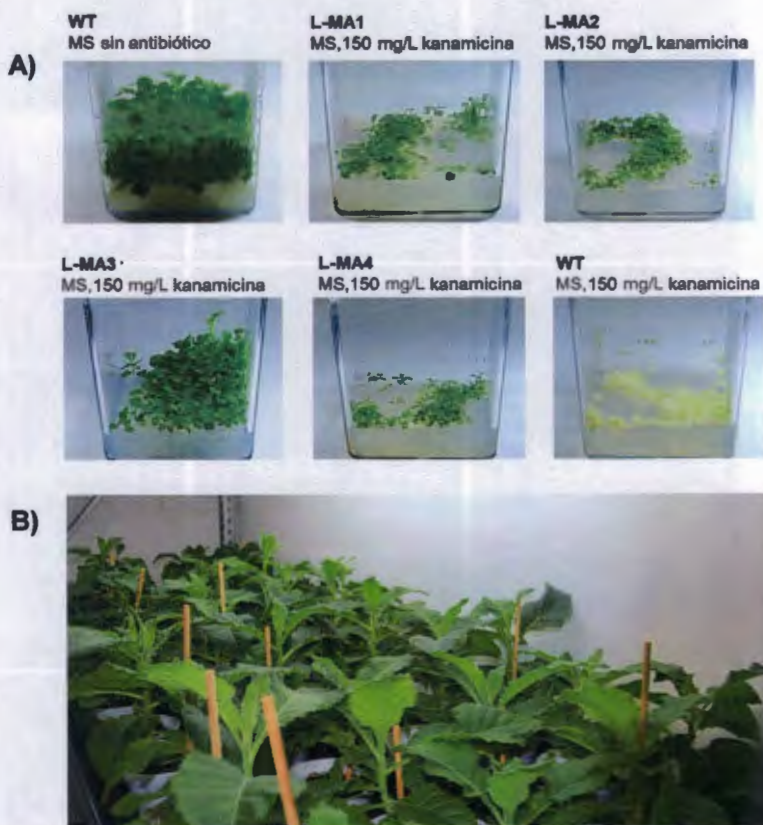


Figura 2. 8. Germinación de semillas de la generación T₁ de plantas de tabaco transformadas con el gen *MaRAR1.A*. A) Plántulas de tabaco de tres semanas de edad (WT= silvestre; L-MA1 a L-MA4= líneas transgénicas). La línea silvestre fue *N. tabacum* petit havana SR1. B) Plantas de las líneas transgénicas T₁ de aproximadamente siete semanas de edad.

2.3.8. Evaluación de la presencia del transgén en plantas de tabaco transgénicas de la generación T₁

Se seleccionó una planta de diez en total de cada línea transgénica, las cuales presentaban un buen tamaño, número de hojas y las que estaban más vigorosas. Se les analizó la permanencia del ADN transformante en el ADN genómico de hojas de las líneas transgénicas de tabaco T₁ mediante dos métodos. En primer lugar se realizó un análisis por PCR para amplificar una región del gen *MaRAR1*. El amplicón esperado correspondiente al gen *MaRAR1* pudo ser amplificado en generación T₁ como se muestra en figura 2.9. Los amplicones obtenidos a partir de las líneas transformadas coincidieron con el obtenido a partir del plásmido que se usó para la transformación (pC35SMa), el cual fue usado como control positivo. En segundo lugar se realizó un Southern blot (Fig. 2.10), utilizando una sonda del gen *MaRAR1* para detectar el número de copias procedentes de la transformación mediada por *A. tumefaciens*. La digestión con EcoRI dio como resultado la detección de al menos cuatro copias del transgén en la línea L-MA1(2), una copia en la línea L-MA2(7), tres copias en la línea L-MA3(6) y dos copias en la línea L-MA4(6). Como controles negativos se usó ADN genómico de una planta silvestre y el vector vacío (pCAMBIA 2200 sin la construcción que contiene a *MaRAR1*), y en ambos casos no se obtuvo ningún amplicón como era de esperarse.

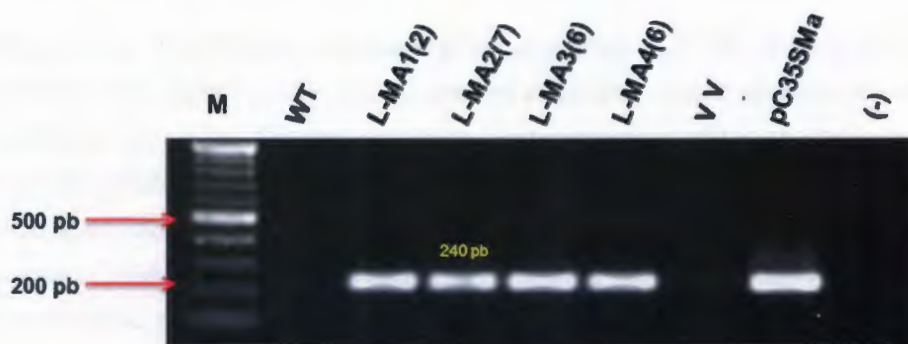


Figura 2. 9. Análisis de PCR de las plántulas transgénicas de la generación T₁ de *N. tabacum* cv. petit havana SR1 (L-MA1(2) a L-MA4(6)). Como controles negativos se utilizó ADN de tabaco silvestre (WT) y vector vacío (pCAMBIA 2200 sin la construcción que contiene a *MaRAR1*) (V V). Como control positivo se usó el pC35SMa. (-), Control negativo de la PCR usando agua como template.

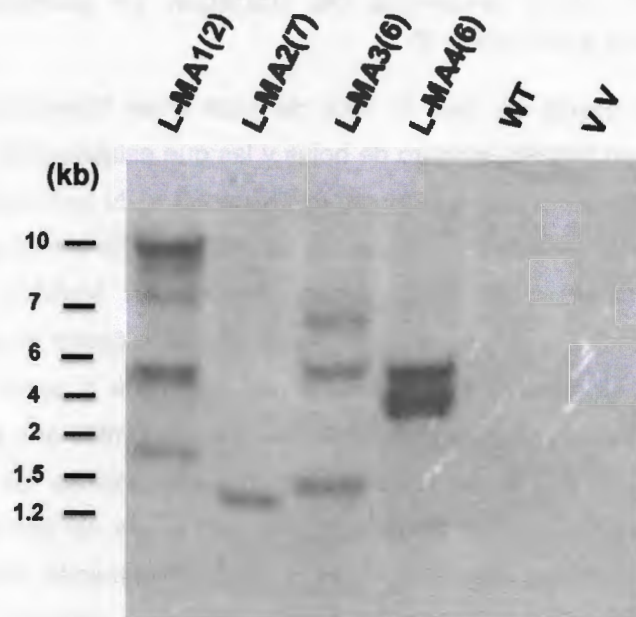


Figura 2. 10. Southern blot de cuatro líneas transgénicas de tabaco (generación T₁) que contienen al gen *MaRAR1* de plátano. Líneas transgénicas T₁ (L-MA1(2) a L-MA4(6)), línea de tabaco silvestre como control negativo (WT), línea de tabaco transformada con el vector vacío (pCAMBIA 2200 sin la construcción experimental) como control negativo (V V).

2.3.9 Expresión de *MaRAR1* en plantas transgénicas de tabaco

Se usó la técnica de RT-PCR para evaluar la expresión de *MaRAR1* en las cuatro líneas transgénicas de tabaco obtenidas en este estudio. Pero primero se corroboró la síntesis correcta del ADN complementario mediante una RT-PCR para detectar la expresión del gen *EF1α*, de tabaco. En la figura 2.11 se observa una banda de 200 pb en las cuatro líneas transgénicas así como en la silvestre y en la transformada con el vector vacío (pCAMBIA 2200 sin la construcción que contiene a *MaRAR1*), indicando junto a sus controles negativos (sin retrotranscriptasa) la ausencia de contaminación de ADN genómico.

Por su parte, se puede observar en la figura 2.12 el amplicón de 240 pb correspondiente a *MaRAR1* en las cuatro líneas transgénicas de tabaco de la generación T₁. A diferencia de las transgénicas, en los controles negativos que son una planta silvestre y una planta transformada con el vector vacío no se obtuvo ningún amplicón como era de esperarse.

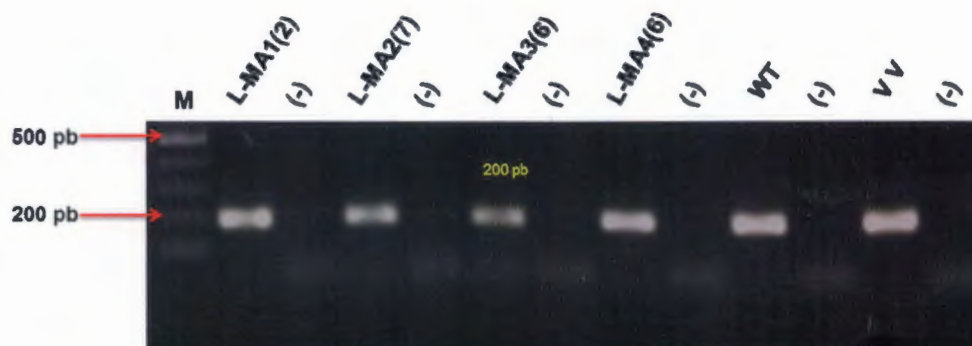


Figura 2. 11. Amplificación por medio de RT-PCR del gen *EF1α* en las líneas transgénicas de la generación T_1 de tabaco. El amplicón de 200pb corresponde al *EF1α* de tabaco, que se observa tanto en las líneas transgénicas como en la planta silvestre (WT) y la transformada con el vector vacío (V V). Control negativo (-) consistió en omitir a la retrotranscriptasa.

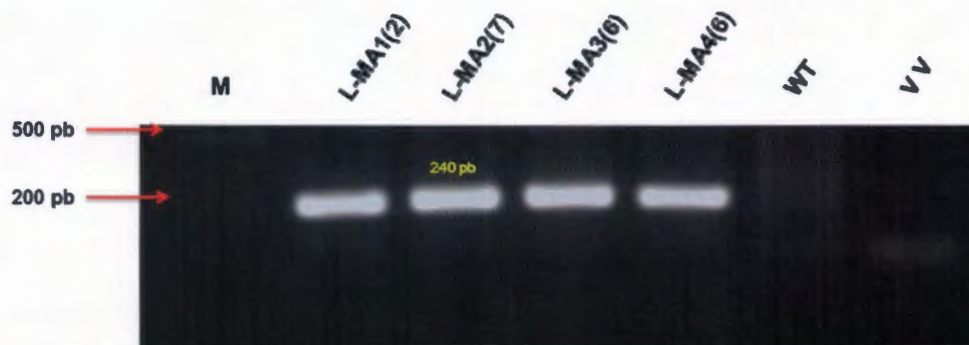


Figura 2. 12. Amplificación por medio de RT-PCR del gen *MaRAR1* en las líneas transgénicas de tabaco. Carriles L-MA1(2) a L-MA4(6), amplicón de 240 pb correspondiente al gen *MaRAR1* en las líneas transgénicas. M, marcador de peso molecular. Planta silvestre (WT) y planta transformada con el vector vacío (V V) como controles negativos.

2. 4 DISCUSIÓN

Las plantas son organismos sésiles, que constantemente están expuestos a diversos factores ambientales tanto bióticos y abióticos, que ocasionan un gran impacto en su crecimiento y productividad. Para hacer frente a estas tensiones, las plantas activan una red de eventos que inician con la percepción de señales de estrés, seguido de cascadas de transducción de señales que eventualmente conducen a la expresión de genes diana que ocasionan cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos como respuesta a las condiciones estresantes (Shinozaki y Yamguchi-Shinozaki, 2000; Ben *et al.*, 2010).

Las plantas han co-evolucionado con los microbios desde su aparición en la tierra aproximadamente 480 millones de años (Chisholm *et al.*, 2006), y así han desarrollado un sistema sofisticado de inmunidad innata que se manifiesta durante la infección a través del reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por medio de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y las moléculas efectoras de patógenos por las proteínas de resistencia a enfermedades (R), lo que resulta en una respuesta de defensa (Chisholm *et al.*, 2006; Dangl, 2001). Estas proteínas R necesitan de otras proteínas que les brinden mayor estabilidad para que lleven de forma correcta su función. Una de estas es la proteína RAR1, de la que se han identificado homólogos en protozoarios, hongos, plantas y animales, pero están ausentes en levadura (Azevedo *et al.*, 2002).

El plátano, *Musa acuminata*, es un cultivo que se ve amenazado por plagas y enfermedades que deja pérdidas importantes a nivel cosecha, siendo la enfermedad de la Sigatoka negra (SN) la enfermedad foliar más devastadora de este cultivo. Esta enfermedad afecta a las hojas del plátano y es causada por el hongo *Micosphaerella fijiensis*, provocando que del 30 al 40% del costo total de la producción sean destinados para su control (Orozco-Santos y Orozco-Romero, 2004; Palencia *et al.*, 2006). El genoma de plátano consiste de 472.2 Mb que contienen aproximadamente 36,542 genes. D'Hont y colaboradores publicaron en 2012 la secuencia genómica de *Musa acuminata*, lo cual abre enormemente las posibilidades de analizar su genoma para la búsqueda de genes que permitan el desarrollo de nuevas variedades resistentes a enfermedades o a otros problemas específicos de este cultivo.

En trabajos previos en nuestro grupo de investigación Canul (2010) clonó y caracterizó el ADN complementario de una secuencia tipo RAR1 nombrado *MaRAR1*, a partir de

'Tuu Gia', una variedad de plátano resistente a la SN. Este gen presentó un tamaño de 648 pb, y su expresión se presenta de manera constitutiva en la planta.

RAR1 fue aislado por primera vez en cebada (*Hordeum vulgare*) utilizando un análisis mutacional, observándose que estas mutantes fallan en el proceso de acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o en desencadenar una respuesta hipersensible ante la presencia del hongo *Blumeria graminis* mediada por genes de resistencia *Mla12* (Torp y Jorgensen, 1986; Shirasu *et al.*, 1999). RAR1 consta de dos dominios ricos en cisteínas e histidinas (CHORD I y CHORD II) los cuales constan de 60 aminoácidos. Se ha visto que los dominios CHORD de la proteína RAR1 facilitan la función de genes R de resistencia en plantas y un homólogo en *C. elegans* causa esterilidad y muerte embrionaria (Shirasu *et al.*, 1999; Heise *et al.*, 2007). En plantas se ha visto que los dominios CHORD se encuentran unidos en forma de tándem por átomos de zinc y contienen un motivo de tres cisteínas y una histidina (CCCH) (Heise *et al.*, 2007).

En la presente tesis, el análisis de alineamiento de la secuencia de aminoácidos de MaRAR1 permitió observar los dominios CHORD I y CHORD II encontrados las proteínas RAR1, los cuales estuvieron altamente conservados y contaban con el dominio CCCH reportado por Heise *et al.* (2007), de la cual hasta la actualidad no se sabe la función que ejerce. También se pueden observar que en la secuencia MaRAR1 de plátano se encuentran conservados los aminoácidos de AtRAR1 (Asn26, Ile153, Asn154, Glu170, Asn173, Glu175 y Trp217) importantes para su unión con la proteína SGT1; y también se encuentran conservados los aminoácidos de AtRAR1 (Pro38, Phe40, His41, Asp42, Lys45, Trp47, Phe57, Phe60, Leu61, Ala185, Phe187, His188, Asp189, Arg192, Trp194, Phe204, Asp205 y Phe207) necesarios para la unión con la proteína HSP90, reportados en el trabajo de Zhang *et al.* (2010). Esta unión de RAR1 con las co-chaperonas SGT1 y HSP90 se ha observado en estudios aplicando la técnica de ensayo de doble híbrido en levadura, (Heise *et al.*, 2007; Shirasu, 2009). Cabe señalar que SGT1 funciona en varios procesos biológicos, tales como el ensamblaje del cinetocoro CBF3, en la formación de la ubiquitina ligasa del complejo SCF, y la activación del dominio LRR que contiene la adenilil ciclase (Shirasu, 2009). Por su parte, se ha demostrado que RAR1 y SGT1 interactúan y funcionan de manera sinérgica para la defensa de la planta (Austin *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008), por lo que la proteína MaRAR1 estudiada en la presente tesis podría tener una función similar en plátano, lo cual se podría comprobar en estudios futuros de la

interacción de estas proteínas. Por otro lado, se sabe que RAR1 y HSP90 también pueden interactuar, siendo HSP90 una proteína esencial que interviene en el ensamblaje y estabilización de las proteínas de señalización clave, tales como las proteínas cinasas o receptores en células eucariotas ante situaciones de estrés biótico y abiótico (Shirasu, 2009), tomando en cuenta lo anterior la proteína MaRAR1 de plátano podría desarrollar una función similar, al igual sería interesante investigar si MaRAR1 también interactúa con HSP90 y si está involucrada en estrés abiótico en plátano.

Estudios previos de Zhang *et al.* (2010) presentaron el modelaje cristalográfico del dominio CHORD II de *A. thaliana* y el complejo de su interacción con el dominio CS de SGT1 de *A. thaliana* y el dominio N-terminal HSP90 de cebada (Shirasu, 2009). Se tienen datos en plantas de que el dominio CHORD II presenta mayor afinidad para interactuar con otras proteínas a diferencia del dominio CHORD I (Shirasu, 2009). El análisis cristalográfico reportado por Zhang *et al.* (2010) del dominio CHORD II de *A. thaliana* presentó 5 β -plegadas y una α -hélice (Fig. 2.3A). En el análisis de modelaje tridimensional por homología de la secuencia MaRAR1 de plátano realizado en la presente tesis, se pudo observar una estructura que presenta las β -plegadas y el α -hélice reportadas por Zhang *et al.* (2010) y que de acuerdo a estos autores son necesarias para la interacción con otras proteínas, aunque nuestra proteína de estudio presentó en total 7 β -plegadas y una α -hélice (Fig. 2.3B), esta información nos indica que posiblemente MaRAR1 pueda interaccionar con otras proteínas.

Por otra parte, se han realizado estudios de la función de genes involucrados en la resistencia ante patógenos mediante el silenciamiento génico o la sobre-expresión génica mediante el uso de promotores constitutivos. En el caso de homólogos de RAR1, también se han hecho algunos estudios de la función de estos genes. Estudios en soya, demostraron que el silenciamiento de este gen en la planta causa alteraciones morfológicas y las plantas eran susceptibles a patógenos, por lo que se asume que RAR1 participa en la resistencia de patógenos en esta planta (Fu *et al.*, 2009). Otros estudios realizados en plantas de tabaco, donde se ha identificado un gen homólogo *RAR1*, se comprobó que este gen se encuentra implicado en la degradación de proteínas mediadas por el señalosoma COP90 y en la resistencia ante el virus del mosaico de tabaco (Liu *et al.*, 2002). Actualmente no existe mucha información de estudios de la sobre-expresión de RAR1 en plantas, sin embargo Wang *et al.* (2008) realizaron la sobre-expresión del gen *OsRAR1* en plantas de arroz, y

encontraron el aumento de la resistencia hacia razas específicas de *Xanthomonas oryzae* y *Magnaporthe oryzae*.

Teniendo como base lo anterior, en este trabajo se generó la construcción 35S::MaRAR1::NOS (Fig. 2.4B), con la que se realizó la transformación de la planta modelo *Nicotiana tabacum* petit havana SR-1, con el gen *MaRAR1* de plátano (Fig. 2.6). Cabe señalar que esta planta de tabaco además de ser comercialmente importante, su transformación ya ha sido lograda genética mediante *A. tumefaciens*. El promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), es el promotor constitutivo más usado en diferentes plantas dicotiledóneas, y ejemplo de ello es la sobre-expresión del gen *NPR1* de *A. thaliana*, que dio como resultado una mayor resistencia a la bacteria *P. syringae* y al hongo oomiceto *P. parasitica* Noco (Cao *et al.*, 1998). De igual forma el promotor 35S ha sido usado para la sobre-expresión del gen *Pto* de tomate en plantas de tabaco, donde se observó mayor resistencia a *P. syringae* en las plantas transgénicas (Thilmony *et al.*, 1995). Por otra parte también se usó la secuencia 3'UTR del gen NOS de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens* la cual termina la transcripción y dirige la señal de poliadenilación, la cual se utiliza ampliamente en vectores de expresión de plantas (Dai *et al.*, 1999). Teniendo en base esta información se espera que las líneas transgénicas de tabaco obtenidas en la presente tesis pudieran mostrar una mayor resistencia cuando sean retadas con patógenos como lo han demostrado en trabajos anteriores y que presenten una morfología normal.

En este trabajo de tesis se obtuvieron cuatro líneas de tabaco transformadas con el gen *MaRAR1*: L-MA1, L-MA2, L-MA3 y L-MA4. Una primera confirmación de la naturaleza transgénica de estas plantas se obtuvo al observar su crecimiento en medio selectivo con kanamicina (150 mg/L), esto porque se transformó con el gen de selección *NPTII* (que confiere resistencia a kanamicina) y sólo las células, tejidos y plantas transformadas son capaces de crecer en niveles normalmente tóxicos para una célula vegetal (Conner *et al.*, 1991). Posteriormente, estas plantas dieron resultado positivo al ser analizadas por PCR utilizando oligos específicos que amplifican una región interna del gen *MaRAR1*. Con base en estos resultados se pudo confirmar la naturaleza transgénica de las plantas debido a la presencia del transgén. Cabe señalar que las cuatro líneas transgénicas se desarrollaron de manera normal hasta la fase adulta de la cual se obtuvieron mediante la autofecundación de sus flores semillas para generar plantas T₁. Estas plantas T₁ fueron sometidas a estudios para su

caracterización molecular. La caracterización molecular se puede llevar a cabo a partir de pocas líneas transgénicas como muestra el trabajo de Ben y colaboradores (2010), que lograron obtener tres líneas transgénicas de tabaco con el gen *AISAP* de *Aeluropus litoralis*, el cual se induce bajo condiciones salinas, sequía, frío. Estos autores observaron en las líneas generadas un comportamiento de mayor tolerancia a los tipos de estreses sometidos en comparación con la planta silvestre. Lo anterior demuestra que se pueden realizar estudios de caracterización molecular y de funcionalidad de genes a partir de tres líneas transgénicas.

En el presente estudio se observó que el gen de interés se heredó en las plantas transgénicas de la generación T₁ cuando éstas fueron analizadas mediante PCR. El análisis del número de copias del gen *MaRAR1* mediante Southern blot reveló que la línea 1(2) contenía al menos cuatro copias, la línea 2(7) al menos una copia, la línea 3(6) al menos tres copias y la línea 4(6) al menos dos copias. Este número de copias observado en las diferentes líneas era de esperarse debido a que el método de transformación por *Agrobacterium* permite la inserción de pocas copias del transgén (Lermontova *et al.*, 1997; Hernández-García *et al.* 2010), como se ha reportado en diferentes estudios, donde se han observado desde una hasta seis copias del transgén en plantas transgénicas de tabaco transformadas con el transgén de interés (Chacón *et al.* 2009; Hernández-García *et al.*, 2010). La transformación genética mediante *Agrobacterium* ha sido ampliamente aplicada a muchas especies de plantas y se ha convertido en el método más utilizado para la introducción de genes foráneos en células vegetales, ya que este método ofrece varias ventajas, tales como la integración genómica estable, un único o bajo número de copias del transgén o transgenes, una eficiencia más alta y un costo más bajo (Riva *et al.*, 1998; Bartlett *et al.*, 2008). Como es lógico, es preferible obtener plantas con pocas copias del transgén, ya que son más fáciles de caracterizar a nivel molecular, es más probable que presenten normalidad en la segregación mendeliana y es menos probable que sufran mecanismos de silenciamiento (Riva *et al.*, 1998).

En este trabajo se evaluaron los perfiles de expresión del gen *MaRAR1* por medio de RT-PCR en las cuatro líneas transgénicas de la generación T₁ de tabaco. Los resultados indicaron la expresión del gen *MaRAR1* en las cuatro líneas transgénicas, a diferencia de estas plantas transgénicas en la planta silvestre y la planta transformada con el vector vacío no se presentó expresión por parte del gen de estudio. Este análisis muestra resultados de forma cualitativa, ya que no indica en cuál de las cuatro

líneas transgénicas se observa una mayor expresión relativa del gen. Sin embargo, estos resultados son importantes ya que indican que el transgén se está expresando y que por tanto no hubo algún evento de silenciamiento del transgén que pudiera evitar la transcripción del gen en alguna de las cuatro líneas transgénicas de tabaco. Por tanto, se cumplió con el objetivo de generar plantas transgénicas de tabaco que expresaran al gen *MaRAR1* de plátano. Se espera que al evaluar los niveles de expresión estas cuatro líneas transgénicas se observen una mayor expresión de acuerdo al número de copias del transgén insertadas en su genoma, ya que se ha observado que el número de copias puede estar relacionado con los niveles de transcrito (Bradeen *et al.* 2009).

Por otra parte, en esta tesis se obtuvieron semillas para generar plantas de la generación T₂, las cuales pueden ser usadas para posteriores análisis. Como se han llevado a cabo diversos estudios utilizando la generación T₂ de las plantas transgénicas (Ben *et al.* 2010; Roy *et al.*, 2007; Tabar *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2008). Los estudios posteriores pueden que generen datos valiosos de funcionalidad para este gen, por lo que el presente trabajo podría proporcionar una mejor comprensión acerca del papel que desempeña este gen en las plantas. Sin embargo, es importante que no se limite el uso de un gen en la planta donde originalmente fue aislado, sino que pueda ser aprovechado en plantas de interés comercial, como solanáceas, donde encontramos cultivos como tomate, chile, papa, etc., por lo que es interesante evaluar la función de este gen en plantas modelo como tabaco (una solanácea) y otras especies de plantas, con el objetivo de que pueda ser usado para diferentes cultivos comercialmente importantes, mejorando su productividad, rendimiento o generar un cultivo resistente a alguna enfermedad.

Las plantas transgénicas generadas en este trabajo de tesis podrán usarse en estudios posteriores con la finalidad de comprender la función del gen *MaRAR1* en la resistencia contra patógenos de plantas. Finalmente, la obtención de plantas transgénicas ha generado grandes beneficios en el estudio de procesos biológicos básicos, y además ofrece el potencial de producir materias primas, así como para enfrentar problemas ambientales, ahorrar fuentes no renovables y proveer alimento a una población mundial en crecimiento progresivo.

2. 5 CONCLUSIONES

El modelaje por homología del dominio CHORD II de plátano mostró una estructura terciaria similar a la del dominio CHORD II de *Arabidopsis thaliana*, sugiriendo que posiblemente cumplen la misma función.

El gen *MaRAR1* de plátano se logró integrar al genoma de tabaco observándose un patrón de copias diferente para cada una de las cuatro líneas transgénicas de la generación T₁.

Las cuatro líneas transgénicas de tabaco de la generación T₁ expresaron al gen *MaRAR1* de plátano.

2. 6 PERSPECTIVAS

En la presente tesis se obtuvieron cuatro líneas transgénicas de tabaco con el gen *MaRAR1* aislado de la variedad de plátano 'Tuu Gia', las cuales se desarrollaron de manera similar a las plantas de tabaco silvestre y fueron autofecundadas para obtener progenie de la generación T₁. El número de copias del transgén insertadas en el genoma de las cuatro líneas transgénicas fue determinado por Southern blot y la expresión del transgén fue observada por medio de RT-PCR, lo cual nos proporcionó los primeros datos importantes para caracterizar molecularmente a estas líneas transgénicas. Sin embargo, para completar dicha caracterización falta evaluar los niveles de expresión del transcrito para cada una de las líneas con respecto a las plantas transformadas con el vector pCAMBIA2200 y la planta silvestre, lo cual puede ser determinado a través de la técnica de northern blot y/o RT-PCR en tiempo real (qPCR). Además será importante sintetizar anticuerpos para *MaRAR1* que se puedan utilizar para comprobar la presencia de la proteína *MaRAR1* en dichas plantas transgénicas mediante el método de western blot.

Con la finalidad de tener una mayor comprensión del funcionamiento de *MaRAR1* y su relación en conferir resistencia a patógenos, se pueden usar las plantas de la generación T₂ obtenidas en el presente trabajo y realizar ensayos de patogenicidad contra fitopatógenos bacterianos y fúngicos como *Pseudomonas syringae* pv. tabaci y *Fusarium oxysporum* respectivamente, y comparar su tolerancia con respecto a plantas silvestre testigo. Dichos ensayos pueden ser llevados a cabo de manera *in vitro* o *ex vitro* como ha sido reportado en numerosos artículos donde las plantas resistentes inhiben de manera significativa el crecimiento de unidades formadoras de colonias (CFU por sus siglas en inglés) de los patógenos bacterianos como *Pseudomonas*, o bien se inhibe el crecimiento de micelio del hongo fitopatógeno como *Fusarium*, de esta manera disminuyendo el área foliar dañada por el hongo.

Otro aspecto interesante a estudiar sería su posible uso biotecnológico para la generación de plantas cisgénicas de plátano al sobre-expresar el gen *MaRAR1* en plantas de un cultivar comercial como "Enano gigante", y evaluar de esta forma su posible uso para el desarrollo de cultivares resistentes a enfermedades y plagas, tales como Sigatoka negra causada por *M. fijiensis*, mal de Panamá causada por *F. oxysporum*, entre otras enfermedades. Se espera que estas variedades cisgénicas de

plátano permitan minimizar el uso de pesticidas tóxicos para el ambiente y la salud humana, así como reducir los costos de producción de este cultivo tropical.

Con la finalidad de complementar las evidencias funcionales con respecto al papel del gen *MaRAR1* en la resistencia de plantas hacia microorganismos patógenos, se podría llevar a cabo un análisis de silenciamiento génico en plantas de plátano de la variedad 'Tuu Gia' que es resistente a la enfermedad de la Sigatoka negra. De esta forma se esperaría que al silenciar este gen, la planta resulte susceptible a *M. fijiensis*, y comprobar de esta manera que se encuentra implicado en el sistema de defensa en plátano. Otro estudio que se podría realizar es un análisis de complementariedad, para esto se cuenta con una mutante *AtRar1* de *A. thaliana*. Esta mutante *AtRar1* provoca un descenso de la resistencia mediada por proteínas R y en la defensa basal (Holt *et al.*, 2005; Muskett *et al.*, 2002; Tornero *et al.*, 2002). Plantas mutantes de *AtRar1* han sido empleadas para estudios de funcionalidad con el gen *OsRAR1* de arroz, donde se observó que las plantas de *A. thaliana* recuperaron su función y generaron resistencia contra patógenos (Wang *et al.*, 2008). La alta identidad entre las secuencias *MaRAR1* y *AtRAR1* nos sugiere que podría observarse un comportamiento similar al utilizar *MaRAR1* expresado en la mutante *AtRar1* y de esta forma recuperar la función de resistencia en *A. thaliana*.

Finalmente, con el objetivo de una mayor comprensión de los mecanismos bioquímicos y moleculares en los que *MaRAR1* participa dentro de la célula, sería interesante conocer las proteínas con las que interactúa, de esta forma se pueden realizar ensayos de interacción proteína-proteína del tipo dos híbridos en levadura que prueben que la proteína *MaRAR1* puede interactuar con proteínas del tipo SGT1 y HSP90, como ocurre con su homólogo *RAR1* de *A. thaliana*, o bien descubrir nuevas proteínas con las que pueda estar relacionada esta proteína en plátano.

2. 7 BIBLIOGRAFÍA

- Arnold K., Bordoli L., Kopp J. y Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics* 22:195-201.
- Austin M. J., Muskett P., Kahn K., Feys B. J., Jones J. D. G., Parker J. E., (2002). Regulatory Role of *SGT1* in Early *R* Gene-Mediated Plant Defenses. *Science* 295:2077-2080.
- Azevedo C., Sadanadom A., Kitagawa K., Freialdenhoven A., Shirasu K., Schulze-Lefert P. (2002). The RAR1 Interactor SGT1, an Essential Component of R Gene-Triggered Disease Resistance. *Science* 295:2073-2076.
- Bartlett G J., Alves S. C., Smedley M., Snape W. J., Harwood A. W. (2008). High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods* 4:22.
- Ben S. R., Zouari N., Ben R. W., Azaza J., Meynard D., Guiderdoni E., Hassairi A. (2010). Improved drought and salt stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing a novel A20/AN1 zinc-finger "A/SAP" gene isolated from the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. *Plant Molecular Biology* 72:171-190.
- Bhaskar P. B., Raasch J. A., Kramer L. C., Neumann P., Wielgus S. M., Austin P. S., Jiang J. (2008). *Sgt1*, but not *Rar1*, is essential for the *RB*-mediated broad-spectrum resistance to potato late blight. *Plant Biology* 8:1-8.
- Bordoli L., Kiefer F., Arnold K., Benkert P., Battey J., Schwede T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols* 4:1-13.
- Bradeen J. M., Lorizzo M., Mollov D. S., Raasch J., Colton K. L., Millett B. P., Austin-Phillips S., Jiang J., Carpato D.(2009). Higher Copy Numbers of the Potato *RB* Transgene Correspond to Enhanced Transcript and Late Blight Resistance Levels. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:437-446

- Canul T. E. (2010). Caracterización del ADN complementario de un gen tipo *RAR1* en un cultivar de *Musa acuminata*. Tesis de licenciatura. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. Pp. 34-39.
- Cao H., Li X., X. Dong. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Plant Biology* 95:6531-6536.
- Chacón O., Hernández I., Portieles R., López Y., Pujol M., Borrás H. O. (2009). Identification of defense-related genes in tobacco responding to black shank disease. *Plant Science* 177:175-180.
- Chisholm S., Coaker G., Day B., Staskawicz B. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124:803-814.
- Clemente T. (2006) *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). *Methods Molecular Biology* 343:143-154.
- Conner A., Williams M., Gardener R., Deroles S., Shaw M. Lancasrer J. (1991). *Agrobacterium*- Mediated transformation of New Zealand potato cultivars. *New Zealand Journal of Crops and Horticulture Science* 19:1-8.
- Dai Z., An K., Edward G. E., An G. (1999). Functional role of CAAT box element of Nopaline synthase (nos) promoter. *Journal of Plant Biology* 42:181-185.
- Dangl J. L., Jones J. D. G. (2001). Plant Pathogens and Integrated Defense Responses to Infection. *Nature* 411:826-833.
- D'Hont A., Denoeud F., MarcAury J., Baurens F. C., Carreel F., Garsmeur O., Noel B., Bocs S., Droc G., Rouard M., Da Silva C., Jabbari K., Cardi C., Poulain J., Souquet M., Labadie K., Jourda C., Lengelle J., Rodier-Goud M., Alberti A., Bernard M., Correa M., Ayyampalayam S., Mckain M. R., Leebens-Mack J., Burgess D., Freeling M., Mbéguié D., Chabannes M., Wicker T., Panaud O., Barbosa J., Hribova E., Heslop-Harrison P., Habas R., Rivallan R., Francois P., Poirion C., Kilian A., Burthia D., Jenny C., Bakry F., Brown S., Guignon V., Kema G., Dita M., Waalwijk C., Joseph S., Dievart A., Jaillon O., Leclercq J., Argout X., Lyons E., Almeida A., Jeridi M., Dolezel J., Roux N., Risterucci A. M., Weissenbach J., Ruiz M., Glaszmann J. C., Quétier F., N. Yahiaoui., P. Wincker.

- (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* 488:213-217.
- Fu D. Q., Ghabrial S., Kachroo A. (2009). *GmRAR1* and *GmSGT1* Are required for basal, *R* gene-mediated and systemic acquired resistance in soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22:86-95.
- Goodstein D. M., Shu S., Howson R., Neupane R., Hayes R. D., Fazo J., Mitros T., Dirks W., Hellsten U., Putnam R. D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* 40:1178-1186.
- Hammond-Kosack K E, Jones J D G. (1996). Resistance gene dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.
- Heise C. T., Le Duff C. S., Boter M., Casais C., Airey J. E., Leech A. P., Amigues B., Guerois R., Moore G. R., Shirasu K., Kleanthous C. (2007). Biochemical Characterization of RAR1 Cysteine- and Histidine-Rich Domains (CHORDs): A Novel Class of Zinc-Dependent Protein-Protein Interaction Modules. *Biochemistry* 46:1612-1623.
- Hernández-García C. M., Bouchard R. A., Rushton P. J., Jones M. L., Chen X., Timko M. P., Finer J. J. (2010). High level transgenic expression of soybean (*Glycine max*) *GmERF* and *Gmubi* gene promoters isolated by a novel promoter analysis pipeline. *Plant Biology* 10:2-16.
- Holt B. F., Belkhadir Y., Dangl J. L. (2005). Antagonistic Control of Disease Resistance Protein Stability in the Plant Immune System. *Science* 309:929-932.
- Larkin M., Blackshields G., Brown N., Chenna R., McGettigan P., McWilliam H., Valentin F., Wallace I., Wilm A., Lopez R., Thompson J., Gibson T., Higgins D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Lermontova I., Kruse L. E., Mock H. P., Grimm B. (1997). Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase. *Plant Biology* 94:8895-8900.
- Liu Y., Schiff M., Marathe R., Dinesh-Kumar S. P. (2002). Tobacco *RAR1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* Like Genes are Required for N-mediated Resistance to Tobacco mosaic virus. *Plant Journal* 30:415-429.

- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plants* 15:473-497.
- Muskett P. R., Kahn K., Austin J. M., Moisan J. L., Sadanandom A., Shirasu K., Jones D. G. J., Parker E. J. (2002). *Arabidopsis RAR1* Exerts Rate-Limiting Control of *R* Gene-Mediated Defenses against Multiple Pathogens. *Plant Cell* 14:979-992.
- Orozco-Santos M., Orozco-Romero J. (2004). La Sigatoka negra en bananos y plátanos: el caso de México. XVI Reunión Internacional Acorbat pp. 70-78.
- Palencia C. G. E., Gómez S. R., Martín S. J. E. (2006). Manejo sostenible del cultivo del plátano. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Pp. 7-18.
- Roy C. A., Roy C., Sengupta D. N. (2007). Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous *lea* gene *Rab16A* from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant Cell Reports* 26:1839-1859.
- Riva A. G., Cabrera G. J., Vázquez P. R., Ayra P. C. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1:118-133.
- Sambrook J., Russell D. W. (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual* 3ra ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shinozaki K., Yamguchi-Shinozaki K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3:217-223.
- Shirasu K. (2009). The HSP90-SGT1 Chaperone Complex for NLR Immune Sensors. *Annual Reviews. Plant Biology* 60:139-164.
- Shirasu K., Lahaye T., Tan M. W., Zhou F., Azevedo C., Schulze-Lefert P. (1999). A Novel Class of Eukaryotic Zinc-Binding Proteins Is Required for Disease Resistance Signaling in Barley and Development in *C. elegans*. *Cell* 99:355-366.
- Tabar M. S., Solouki M., Tohidfar M., Sadeghizadeh M. (2012). Expression of human granulocyte-colony stimulating factor (*hG-CSF*) gene in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Australian Journal of Crops Sciens* 6:135-140.
- Thao N. P., Chen L., Nakashima A., Hara S., Umemura K., Takahashi A., Shirasu K., Kawasaki T., Shimamoto K. (2007). *RAR1* and HSP90 Form a Complex with

Rac/Rop GTPase and Function in Innate-Immune Responses in Rice. *Plant Cell* 19:4035-4045.

Thilmony R. L., Chen Z., Bressan R. A., Martin G. B. (1995). Expression of the Tomato *Pto* Gene in Tobacco Enhances Resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* Expressing *avrPto*. *Plant Cell* 7:1529-1536.

Tornero P., Merritt P., Sadanandom A., Shirasu K., Innes W. R., Dangl L. J. (2002). *RAR1* and *NDR1* Contribute Quantitatively to Disease Resistance in Arabidopsis, and Their Relative Contributions Are Dependent on the *R* Gene Assayed. *Plant Cell* 14:1005-1015.

Torp J., Jørgensen J. H. (1986). Modification of Barley Powdery Mildew Resistance Gene *Mla12* by Induced Mutacion. *Genetic Cytology* 28:725-731.

Wang Y., Gao M., Li Q., Wang L., Wang J., Jeon J. S., Qu N., Zhang Y., He Z. (2008). *OsRAR1* and *OsSGT1* Physically Interact and Function in Rice Basal Disease Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21:294-303.

Zhang M., Kadota Y., Prodromou C., Shirasu K., Pearl L. H. (2010). Structural Basis for Assembly of HSP90-Sgt1-CHORD Protein Complexes: Implications for Chaperoning of NLR Innate Immunity Receptors. *Molecular Cell* 39:269-281.

Zhang L. R., Yang W. X., Liu D. Q. (2011). *TaRAR1* is required for *Lr24*-mediated wheat leaf rust resistance. *Agricultural Sciences in China* 10: 1732-1738.

ANEXOS

Anexo 1

Soluciones para el medio Murashige-Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962)

SOLUCIÓN	COMPONENTES	g/L stock (10X)	mg/L
MACRONUTRIENTES	NH ₄ NO ₃	16.5 g	1,650
	KNO ₃	19.0 g	1,900
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.5 g	450
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7 g	370
	KH ₂ PO ₄	1.7 g	170
MICRONUTRIENTES	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2230 mg	22.3
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	860 mg	8.6
	H ₃ BO ₃	620 g	6.2
	KI	83 mg	0.83
	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	25 mg	0.25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.5 mg	0.025
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	2.5 mg	0.025
	Myo-inositol	10 000 mg	100
VITAMINAS	Nicotinic acid	50 mg	0.5
	Pyridoxine HCl	50 mg	0.5
	Thiamine HCl	10 mg	0.1
	Glycine	200 mg	2.0
Fe-EDTA	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	1862 mg	37.24
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	1390 mg	27.8

