



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL GEN *MaRAR1* DE
PLÁTANO EN LA RESISTENCIA AL ESTRÉS BIÓTICO EN
TABACO**

Tesis que presenta

ÁNGELES GUADALUPE MAYORGA LÓPEZ

Opción al título de

DOCTORADO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2018

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **Ángeles Guadalupe Mayorga López** titulado "**Evaluación de la función del gen *MaRAR1* de plátano en la resistencia al estrés biótico en tabaco**" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Agrobiotecnología, bajo la asesoría del Dr. Santy Peraza Echeverría, dentro de la opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Doctorado del Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:



Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 29 de agosto de 2018.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____



Ángeles Guadalupe Mayorga López

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Evaluación de la función del gen *MaRAR1* de plátano en la resistencia al estrés biótico en tabaco” y número de beca 254618 en el que participé bajo la dirección del Dr. Santy Peraza Echeverria.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca No. 254618 otorgada para mis estudios de doctorado. También se agradece al CONACYT por el financiamiento de los proyectos PDCPN-2015-01-177 y CB-106289, así como a la International Foundation for Science (IFS) (proyecto C/4064-1).

A mi director de tesis, el Dr. Santy Peraza Echeverría, por permitirme ser parte de su grupo de investigación, gracias a la confianza brindada, por darme la libertad de explotar al máximo la curiosidad, creatividad y el pensamiento crítico que como futura investigadora requiero. Por sus aportaciones al proyecto estos cinco años de trabajo arduo en los cuales la retroalimentación fue de gran ayuda para mí, motivándome a fortalecer mi formación como científico y como persona.

A la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, por su apoyo y disposición brindada, porque aunque no fue mi asesora siempre me ayudó a que el proyecto siguiera manteniendo esa innovación, a manera de que siempre hubiera algo nuevo que aportar.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dr. Jorge Manuel Santamaria Fernández y Dr. Jean Phillippe Vielle Calzada, quienes en conjunto con mi asesor cuestionaron mi trabajo positivamente en cada evaluación.

A mi comité de revisión de tesis, Dr. Jorge Manuel Santamaria Fernández, Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, Dr. Gregorio Godoy Hernandez, Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dr. Gabriel Lizama Uc y Dr. Juan Tun Garrido, por emplear parte de su tiempo para la revisión de esta tesis.

A la Q.B.A. Ileana Borges Argáez y a la Lic. Verónica Limones Briones, por su apoyo técnico y atención brindada para la realización de este proyecto. Reconozco que su ayuda hizo la diferencia para poder concluir en tiempo mi proyecto, siempre tuvieron tiempo para enseñarme y aclarar mis dudas.

A mis profesores del Posgrado en Ciencias Biológicas del CICY, por su excelente desempeño a lo largo de los cursos; debo reconocer que cada uno de ustedes aportó nuevas enseñanzas en mi desarrollo profesional, que tomo de manera muy positiva.

A mis amigos Gabriela, Carlos Iván, José Antonio, Víctor Jesús e Iván, por ser un equipo que a lo largo de los años me ha brindado su apoyo incondicional.

A mis compañeros del Laboratorio de Cultivos Tropicales y Microalgas, Miguel Ángel, Rodrigo, Melissa, Patricia, Merly Adilene, Shirley, Anayeli, María Eugenia, Alejandra, Margarita, Sergio, Ricardo y Fray, por hacerme sentir muy contenta en mi área de trabajo con sus conversaciones, comidas y salidas a pasear. Gracias por haberme brindado tan sencillamente su amistad.

De manera muy especial, agradezco a mi madre Gloria, por ser el pilar de la familia Mayorga López, por su infinito amor e incansable apoyo brindado durante esta etapa de mi vida. Por creer en mí a pesar de mis errores y alentarme día a día a luchar para ser una mejor persona.

A mis hermanas Rosalinda y Karla Melina, por siempre estar ahí en los momentos que más las necesité, sus consejos y regaños hicieron que siempre deseara ser mejor en todos los sentidos de mi vida.

Al amor de mis cuatro adorados sobrinos, Adrián, Sebastián, Adriana Montserrat y la pequeña Melina, por que han llenado de alegría mi vida desde el día que nacieron.

A mis padrinos Javier y Teresa, por estar conmigo durante toda esta etapa de mi formación apoyándome siempre con su gran amor.

A mi gran familia, tíos y primos, por ser la motivación para desarrollarme profesionalmente y obtener una meta más en mi vida.

Quiero agradecer de manera muy especial a mi hermosa familia, Rogelio y Natalia, por ser una parte esencial de mi vida y el motor más importante para poder culminar este maravilloso proyecto.

A todos les doy mi más sincero agradecimiento.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada con mucho amor y esfuerzo a mis padres Carlos Irán Mayorga Chang^t y Gloria López Salinas, ustedes son mi mayor razón de ser, porque tú, mami, siempre tuviste una sonrisa para mí desde el momento en que nací. Tu amor, comprensión y apoyo incondicional son los sentimientos que llevaré grabados en mi corazón por siempre.

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
1.1 ANTECEDENTES GENERALES	3
1.1.1 Origen e historia del cultivo tropical de plátano.....	3
1.1.2 Biología y clasificación taxonómica de plátano.....	4
1.1.3 Importancia del plátano como cultivo agrícola.....	6
1.1.4 Producción de plátano a nivel mundial.....	7
1.1.5 Producción de plátano en México.....	8
1.1.6 Problemáticas de la producción: aspectos de patógenos y plagas.....	9
1.1.7 Biotecnología aplicada al cultivo de plátano.....	12
1.1.8 El sistema inmune de las plantas	14
1.1.9 La resistencia sistémica adquirida: una resistencia de amplio espectro para combatir el ataque de patógenos	16
1.1.10 Rutas de señalización en los mecanismos de defensa de plantas	16
1.1.11 La proteína RAR1 y su participación en la resistencia contra patógenos	18
1.1.12 RAR1 y su interacción con otras proteínas co-chaperonas.....	19
1.1.13 Genes mutantes de <i>rar1</i>	20
1.1.14 Sobre-expresión de <i>RAR1</i> en plantas	21
1.1.15 El gen <i>RAR1</i> en plátano	22
1.1.16 El estudio de <i>MaRAR1</i> en la planta modelo de Tabaco	22
1.2 JUSTIFICACIÓN	24
1.3 HIPÓTESIS	25
1.4 OBJETIVOS	25
1.4.1 General.....	25
1.4.2 Particulares.....	25
1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
CAPÍTULO II	27
2.1 INTRODUCCIÓN	27
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.2.1 Germinación de las semillas de la generación T2 de plantas de tabaco transformadas con el gen <i>MaRAR1</i>	29
2.2.2 Análisis morfológico de las plantas de tabaco	29
2.2.3 Extracción de ácidos nucleicos.....	30
2.2.4 Amplificación de <i>MaRAR1</i> por PCR en las líneas transgénicas de tabaco	31
2.2.5 Evaluación del número de copias de <i>MaRAR1</i> en plantas de tabaco de la generación T2 mediante un ensayo Southern blot.....	32
2.2.6 Evaluación de la expresión del transgen <i>MaRAR1</i> en plantas de tabaco de la generación T2 mediante RT-PCR de punto final	34

2.2.7 Evaluación de los niveles de expresión de <i>MaRAR1</i> en las líneas transgénicas generación T2 por RT-PCR de tiempo real	35
2.3 RESULTADOS	36
2.3.1 Germinación de semillas de la generación T2 de líneas transgénicas de tabaco que presentan al gen <i>MaRAR1</i> de plátano	36
2.3.2 Análisis morfológico de las líneas transgénicas generación T2.....	37
2.3.3 Pérofiles de los ácidos nucleicos aislados de las líneas transgénicas de tabaco generación T2.....	39
2.3.4 Análisis de la presencia de <i>MaRAR1</i> en las líneas transgénicas de tabaco generacion T2 por PCR.....	40
2.3.5 Análisis del número de copias del transgen <i>MaRAR1</i> en las líneas transgénicas de tabaco generación T2.....	41
2.3.6 Evaluación de la expresión de <i>MaRAR1</i> en líneas transgénicas de la generación T2 por RT-PCR de punto final.....	41
2.3.7 Evaluación de la expresión de <i>MaRAR1</i> en las líneas transgénicas generación T2 por RT-PCR en tiempo real.....	42
2.4 DISCUSIÓN	44
CAPÍTULO III	48
3.1 INTRODUCCIÓN	48
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.2.1 Material vegetal	51
3.2.2 Verificación de la cepa <i>P. syringae pv. tabaci</i>	51
3.2.3 Evaluación de la curva de crecimiento de la bacteria <i>Pseudomonas syringae pv. tabaci</i> 52	
3.2.4 Ensayo de resistencia de las líneas transgénicas generación T2 ante la bacteria <i>Pseudomonas syringae pv. tabaci</i>	53
3.2.5 Evaluación de la viabilidad celular y la producción de H ₂ O ₂ a las líneas transgénicas de tabaco durante la interacción con <i>Pseudomonas syringae pv. tabaci</i>	53
3.2.7 Evaluación de la expresión de genes marcadores <i>NtPR1</i> y <i>NtPR3</i> en las líneas transgénicas por RT-PCR de punto final.....	54
3.2.6 Evaluación de la expresión de <i>NtPR1</i> en las líneas transgénicas generación T2 por RT-PCR en tiempo real.....	54
3.2.7 Evaluación de la organización genómica de <i>MaRAR1</i>	55
3.3 RESULTADOS	56
3.3.1 Verificación de la cepa <i>P. syringae pv. tabaci</i>	56
3.3.3 Evaluación de la curva de crecimiento de la bacteria <i>Pseudomonas syringae pv. tabaci</i> 57	
3.3.4 Ensayo de resistencia de las líneas transgénicas generación T2 ante la bacteria <i>Pseudomonas syringae pv. tabaci</i>	58
3.2.5 Evaluación de la viabilidad celular y la producción de H ₂ O ₂ a las líneas transgénicas de tabaco durante la interacción con <i>Pseudomonas syringae pv. tabaci</i>	58
3.2.6 Evaluación de la expresión de <i>NtPR1</i> y <i>NtPR3</i> en las líneas transgénicas	60
3.3.7 Evaluación de la organización genómica de <i>MaRAR1</i>	61

3.4 DISCUSIÓN	64
CAPÍTULO IV	67
CONCLUSIONES	67
PERSPECTIVAS	68
BIBLIOGRAFIA	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura de la planta de plátano.....	5
Figura 1.2 Contenido nutricional del plátano fresco por cada 100 gr de pulpa	6
Figura 1.3 Producción de plátano a nivel mundial	8
Figura 1.4 Estadísticas de la producción de plátano en México.....	9
Figura 1.5 Síntomas de la enfermedad de Sigatoka negra en plátano.. ..	10
Figura 1.6 Síntomas de la enfermedad del mal de Panamá en plátano.	11
Figura 1.7 Síntomas de la enfermedad del Moko en plátano.. ..	12
Figura 1.8 Modelo de evolución de la resistencia contra microorganismos en plantas.....	15
Figura 1.9 Interacción entre las diferentes rutas de señalización reguladas por fitohormonas durante la respuesta de las plantas al ataque de patógenos.....	17
Figura 1.10 Estructura de la proteína RAR1.....	18
Figura 1.11 Vía de activación de <i>RAR1</i> a partir de estudios de pérdida de función.	19
Figura 1.12 Representación del complejo chaperona para las proteínas NLR.	20
Figura 2.1 Germinación de semillas de tabaco transgénicas generación T2 con el gen <i>MaRAR1</i> de plátano.....	36
Figura 2.2 Evaluación morfológica del crecimiento de plantas transgénicas generación T2 que sobre-expresan al gen <i>MaRAR1</i> de plátano.	37
Figura 2.3 Medición del crecimiento radicular de las cuatro líneas transgénicas de tabaco que sobre-expresan el gen <i>MaRAR1</i>	38
Figura 2.4 Características fenotípicas de las plantas transgénicas generación T2.....	39
Figura 2.5 Electroforesis en gel al 0.8% de ácidos nucleicos de las plantas transgénicas de tabaco	40
Figura 2.6 Análisis de PCR de las cuatro líneas transgénicas de la generación T2 de tabaco <i>N. tabacum</i> (L1-L4).	40
Figura 2.7 Southern blot de cuatro líneas transgénicas de tabaco generación T2 que contienen al gen <i>MaRAR1</i> de plátano.. ..	41
Figura 2.8 Amplificación por medio de RT-PCR del gen <i>MaRAR1</i> en las líneas transgénicas de la generación T2 de <i>Nicotiana tabacum</i> cv. petit havana SR1 (L1-L4)....	42
Figura 2.9 qRT-PCR de <i>MaRAR1</i> en las cuatro líneas transgénicas de tabaco.....	43
Figura 3.1 Análisis molecular y fenotípico de la bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	44
ror! Marcador no definido.	
Figura 3.2 Infección de <i>Nicotiana tabacum</i> Petit Havana SR1 con <i>Pseudomonas syringae</i>	57
Figura 3.3. Crecimiento de <i>Pst</i> en plantas de tabaco transformadas con <i>MaRAR1</i>	58
Figura 3.4 Evaluación cualitativa de la infección en las plantas transgénicas de tabaco... ..	59
Figura 3.5 La sobre-expresión del gen <i>MaRAR1</i> de plátano en tabaco causa la inducción de genes PR.....	61
Figura 3.7 La organización y arquitectura de clústeres de genes cercanos a <i>MaRAR1</i>	62
Figura 3.8 Clasificación de los genes vecinos encontrados según su función.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1 Oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *MaRAR1* 31

Cuadro 2.2 Oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *NtEF1 α* 35

Cuadro 3.1 Oligonucleótidos específicos para la amplificación de genes de *P. syringae* pv. *tabaci* 52

Cuadro 3.2 Oligonucleótidos específicos para la amplificación de genes marcadores 54

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
AIA	Ácido Indol Acético
Avr	Gen de avirulencia
BAP	Bencil Amino Purina
CaMV	Virus del Mosaico de la Coliflor (Del inglés: Cauliflower Mosaic Virus)
CHORD	Dominio rico en cisteínas y histidinas (Del inglés: Cystein and Histidine-Rich Domain)
EFR	Receptor del factor de elongación Tu
ES	Embriogénesis Somática
ET	Etileno
ETI	Inmunidad activada por efectores (Del inglés: Effector Triggered Immunity)
FLS2	Receptor sensible a flagelina
H ₂ O ₂	Superóxido de Hidrógeno
HSP90	Proteína chaperona de choque térmico 90 (Del inglés: Heat Shock Protein 90, a chaperone)
ISR	Resistencia Sistémica Inducida (del inglés: Induced Systemic Resistance)
JA	Ácido Jasmónico
MLA	Moho-resistencia Locus A (del inglés: Mildew-resistance Locus A)
Mb	Mega bases
NB-LRR	Repeticiones Ricas en Leucinas con un dominio de unión a nucleótidos
NLR	Receptores tipo Nod (Del inglés: Nod-like receptor)
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Superóxido
Oligo-dT	Oligo deoxitimidina
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (Del inglés: Pathogen Associated Molecular Pattern)
Pb	Pares de bases
PCD	Muerte Celular Programada (Del inglés: Programed Cell Death)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PR	Relacionado con Patogénesis (Del inglés: Pathogenesis-Related)
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patógenos (Del inglés: Pathogen Recognition Receptor)
PTI	Inmunidad activada por PAMPs (Del inglés: Pamp Triggered Immunity)
R	Gen de Resistencia
HR	Respuesta Hipersensible (Del inglés: Hypersensitive Response)
RLK	Receptor tipo cinasa (Del inglés: Receptor Like Kinase)
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno (Del inglés: Reactive Oxygen Species)
RPK	Receptor de Proteína Cinasa (Del inglés: Receptor Protein Kinase)
SGT1	Supresor de G-dos alelos de Skp1 (Del inglés: Suppressor of G-Two allele of skp1)
SA	Ácido Salicílico
SAR	Respuesta Sistémica Adquirida (Del inglés: Systemic Acquired Response)
SCE	Células Embriogénicas en Suspensión (Del inglés: Suspension Cells Embryogenic)
TF	Factor de Transcripción (Del inglés: Transcription Factor)
TMV	Virus del Mosaico del Tabaco

RESUMEN

El plátano es el cuarto alimento más importante en el mundo por su alto valor nutrimental y como fuente de exportación en países en desarrollo con una producción mundial anual de más de 148 millones de toneladas. Sin embargo, este cultivo es afectado por numerosos tipos de patógenos, como virus, bacterias, hongos y nematodos, ocasionando grandes pérdidas en términos de exportaciones y productividad de pequeños agricultores. Una solución ideal a esta problemática es el mejoramiento genético de variedades de plátano que actualmente se cultivan. Recientemente se han obtenido nuevos avances que mejorarán nuestra comprensión de los genes implicados en la resistencia a enfermedades en este cultivo, tales como la secuenciación del genoma del plátano y la realización de estudios transcriptómicos de la interacción entre el plátano y sus patógenos más virulentos (p. ej., *Mycosphaerella fijiensis* y *Fusarium oxysporum*). El gen *RAR1* codifica una co-chaperona de HSP90 requerida para la resistencia a enfermedades mediada por múltiples receptores de resistencia NBS-LRR en plantas. Un ortólogo de *RAR1* aun no había sido aislado ni caracterizado en plátano. En estudios previos de nuestro laboratorio se logró aislar y caracterizar el ADN complementario de un gen *RAR1* de plátano, el cual fue utilizado para transformar genéticamente a la planta modelo de tabaco lográndose obtener cuatro líneas transgénicas (generación T1) que sobre-expresaron este gen de manera constitutiva para posteriormente evaluar su función en la resistencia a patógenos.

El objetivo general de la presente tesis fue evaluar la función del gen *MaRAR1* en la resistencia al estrés biótico utilizando a la planta tabaco como modelo de estudio. Se generaron cuatro líneas transgénicas de tabaco de la generación T2, las cuales fueron caracterizadas molecularmente en cuanto a la presencia del transgen, número de copias y niveles de expresión. Se observó la presencia del transgen *MaRAR1* en las cuatro líneas transgénicas y el número de copias observado fue el siguiente: L1 (4 copias), L2 (una copia), L3 (tres copias) y L4 (una copia). También se evaluó la expresión del transgen por qRT-PCR, donde las líneas L1 y L4 fueron en las que menor nivel de expresión de *MaRAR1* se encontró, en comparación con las líneas L2 y L3. Por otra parte, no se observó diferencias morfológicas ni de desarrollo entre las líneas transgénicas L2, L3, L4 y la WT, a excepción de la L1, en donde se observó un crecimiento más lento y un menor tamaño de la raíz. También se observó una disminución del tiempo de floración de la línea L2.

MaRAR1 esta presente como un gen de copia única en *Musa acuminata* ssp. *Genoma malaccensis*. Curiosamente, *MaRAR1* esta rodeado de muchos genes que codifican factores de transcripción y otras proteínas cuyos homólogos en *Arabidopsis thaliana* y arroz se han visto implicados en las respuestas de estrés biótico o abiótico. En este estudio, la sobreexpresión de este gen en plantas de tabaco transgénicas (T2) mejoró la resistencia al patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. La nueva información obtenida en este trabajo amplió nuestro conocimiento de RAR1 en la familia Musaceae y proporciona herramientas útiles para mejorar la resistencia a las enfermedades en plátano y otros cultivos.

ABSTRACT

Banana is the fourth most relevant food source in the world due to its high nutritional value. It is also an important export source for developing countries with an annual world production greater than 148 million ton. However, this crop is prone to be affected with several types of pathogens, such as viruses, bacteria, fungus, and nematodes, which causes great loses for small-scale farmers. Genetic improvement of current cultivated banana species is an ideal solution for this problem. In fact, recent advances in this field allow for a better understanding of the genes implied in the resistance of this crop to diverse diseases. Studies on the interaction between banana and its more virulent pathogens (eg, *Mycosphaerella fijiensis* and *Fusarium oxysporum*), as well as the sequencing of the banana genome are examples of these advances. The *MaRAR1* gene encodes a HSP90 co-chaperone that is required for disease resistance and is mediated by multiple NBS-LRR resistance receptors in plants. An ortholog of *MaRAR1* had not yet been isolated or characterized in banana. Previous studies performed in our laboratories isolated and characterized the complementary DNA of a banana *MaRAR1* gene and used it to genetically transform tobacco, obtaining four transgenic lines (T1 generation) that overexpressed this gene in a constitutive way. Their effects on resistance to pathogens was later analyzed.

This work aims to assess the effect of the *MaRAR1* gene on resistance to biotic stress using the tobacco plant as a study model. Four transgenic lines (L1, L2, L3, and L4) of tobacco T2 plants were generated and subsequently characterized by determining the presence of the transgene, number of copies and levels of expression. The *MaRAR1* transgene was observed in all the transgenic lines whose numbers of copies were 4, 1, 3, and 1 for L1, L2, L3, and L4, respectively. The expression of the transgene was also assessed by qRT-PCR. L1 and L2 showed a lower level of expression than L3 and L4. On the other hand, neither morphologic nor development differences were observed between the L2, L3 or the L4 transgenic lines and the WT, being L1 an exception as it had a slower growth and a smaller root. A shorter floriation time for the L2 line was also observed.

MaRAR1 is present as a single-copy gene in *Musa acuminata* ssp. *Malaccensis*. Interestingly, *MaRAR1* is surrounded by many genes that encode transcription factors and other proteins whose counterparts in *Arabidopsis thaliana* and rice are implied on the

response to biotic or abiotic stress. In this work, the overexpression of this gene in transgenic (T2) tobacco plants enhanced resistance to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. The new information gained in this work has expanded our knowledge of RAR1 in the Musaceae family and provided useful tools for enhancing disease resistance in banana and other crops.

INTRODUCCIÓN

El plátano (*Musa acuminata*) es una planta herbácea monocotiledónea, que pertenece a la familia Musáceae. En México este cultivo se cosecha principalmente en los estados de Chiapas, Veracruz, Tabasco y Oaxaca (SIAP, 2011). Los usos que se le atribuyen a este cultivo se deben a su alto valor nutritivo. Se consumen principalmente como fruto fresco, frito o procesado.

Sin embargo, como otros cultivos, presenta serios problemas fitosanitarios causados por patógenos del tipo virus, bacteria, hongo o nemátodo. Por ejemplo, el hongo *Mycosphaerella fijiensis* que causa la enfermedad foliar de la Sigatoka negra afecta principalmente las hojas de la planta (ocasionandoles necrosis) (Churchill, 2010). Por otra parte, la enfermedad del mal de Panamá la ocasiona el hongo *Fusarium oxysporum cubense* sp. *Cubense* Raza 4, que coloniza a la planta a través de la raíz, evitando que sea capaz de obtener agua y nutrientes del suelo, esto culmina con su muerte (Pérez, 2004). En cuanto a enfermedades de tipo bacteriano, está la enfermedad del Moko causada por *Ralstonia solanacearum* raza 2. Este patógeno infecta diferentes estados del crecimiento de la planta (afecta principalmente las hojas jóvenes), incluso los estados más avanzados, donde logra afectar a los frutos (Martínez, 2013).

En la actualidad el control de estas enfermedades es mediante el uso intensivo de pesticidas, lo que representa un alto costo de inversión, contamina el ambiente y afecta a la salud humana. Una alternativa para la solución de este problema es el mejoramiento genético de cultivares comerciales de plátano. No obstante, en plátano esta estrategia no puede realizarse de la manera tradicional, debido a que los cultivares son estériles. Por tal motivo, la biotecnología, a través de la tecnología del ADN recombinante, ofrece diversas oportunidades para realizar el mejoramiento genético del plátano. Se han establecido técnicas de cultivo *in vitro* para este cultivo (Navarro *et al.*, 1997), existen métodos de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o biobalística (Khanna *et al.*, 2004; Becker *et al.*, 2000) y la secuencia genómica de plátano esta disponible (D'Hont *et al.*, 2012). Esto abre nuevas ventajas que pueden hacer posible la introducción de genes que puedan conferir resistencia ante las enfermedades que más afectan la producción del plátano.

Las plantas poseen barreras físicas y bioquímicas como primer tipo de defensa ante patógenos. Sin embargo, cuando son evadidas, la planta puede activar diferentes mecanismos moleculares inducibles para combatir la enfermedad. El SAR es un mecanismo de resistencia que activa la expresión de múltiples genes de defensa en las que están codificadas proteínas que le brindan protección a la planta ante subsiguientes ataques de patógenos. Este mecanismo se caracteriza por ser de amplio espectro.

A menudo este tipo de proteínas R requieren de otras proteínas para llevar a cabo su función. Una de las proteínas involucradas en la ETI, que han sido estudiadas en los últimos años, es la proteína RAR1 identificada en cebada. Es una co-chaperona de 216 aminoácidos, actúa como punto de convergencia clave para la activación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) al detectarse un patógeno, que desencadena una HR como primera estrategia de defensa. El resultado es un aumento de SA en la célula, que induce la activación del SAR en toda la planta. Esto a su vez promoverá la transcripción de genes de defensa (Hammond y Paker, 2003). Estos mecanismos de defensa son de gran interés, por su posible activación en cultivos agrícolas, donde se esperaría que la sobre-expresión de genes claves involucrados en estos mecanismos de defensa aumenten la resistencia a patógenos de interés.

En nuestro grupo se aisló y caracterizó previamente el ADN complementario de un gen tipo *RAR1* de *Musa acuminata*, cv. Tuu Gia, confiere resistencia a la Sigatoka negra. Este gen se nombró como *MaRAR1* (Canul, 2010). Recientemente también se realizó la transformación genética de tabaco (*Nicotiana tabacum*) con *MaRAR1*, donde se obtuvieron cuatro líneas transgénicas de la generación T1 (L1, L2, L3 y L4) que sobre-expresan el transgen. Estas líneas transgénicas pueden ser usadas como un modelo para el análisis funcional de este gen y para evaluar su papel en la resistencia contra el estrés biótico.

Por tanto, el objetivo general del presente proyecto fue evaluar la función del gen *MaRAR1* de plátano en la resistencia contra la bacteria patógena *Pseudomonas. syringae* pv. *tabaci* en la generación T2 de las cuatro líneas transgénicas de tabaco. Los resultados obtenidos mostraron que *MaRAR1* está involucrado en la respuesta inmune de la planta. Estos resultados hacen del gen *MaRAR1* un candidato interesante para ser sobre-expresado en el cultivar comercial Enano Gigante y evaluar posteriormente su función en la resistencia contra el hongo *M. fijiensis*.

CAPÍTULO I

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Origen e historia del cultivo tropical de plátano

La planta conocida como plátano agrupa a un gran número de clones que pertenecen al género *Musa*, de la familia *Musaceae*. El origen de las especies silvestres de plátano *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* se sitúa en el sureste de Asia y las islas del Pacífico, extendiéndose desde la India hasta Papua, Nueva Guinea, incluyendo Malasia e Indonesia. Su llegada a África oriental se da por intercambio de cultivos a través de Madagascar hacia el año 500 d. C., se difunde al Mediterráneo por el año 650 d. C. y viajeros polinesios lo llevan al Pacífico aproximadamente por el año 1000 (Reynolds, 1927; Marshall, 1956; Simmonds, 1955; De Langhe, 1996).

La gran mayoría de los plátanos cultivados se originaron a partir de cruces inter e intraespecífica de los genotipos diploides *M. acuminata* AA y *M. balbisiana* BB. Estas especies silvestres dan frutos pequeños que no le dan valor al cultivo (Simmonds, 1955). El proceso de hibridación de ambos genotipos dio como resultado un cambio en los frutos. Los bananos y plátanos comerciales en la actualidad tienen mayor rendimiento, ausencia de semillas y la gran mayoría son triploides estériles.

La triploidia es otro paso en la evolución del plátano. Se piensa que sucede después de la fertilización de células viables. Esto ocurre cuando un proceso de meiosis es incompleto (apomeiosis), lo que da como resultado la producción de óvulos y polen diploide, en lugar de haploides. La triploidia es el producto de la fecundación entre un óvulo diploide con un polen haploide (Simmonds, 1987). Muchas plantas cultivadas son poliploides (triploides, tetraploides, hexaploides), ya que su poliploidia les confiere una gran vigor a las plantas y producen frutos más grandes.

La mayoría de los cultivos comerciales son triploides y pertenecen al grupo AAA. Los grupos más importantes que se cultivan a nivel mundial son AAA (plátanos de postre, se consumen crudos), AAB (plátano de cocina, no se consumen crudos) y ABB (plátano de cocina, no se consumen crudos) (Simmonds, 1995).

1.1.2 Biología y clasificación taxonómica de plátano

El plátano pertenece a las plantas monocotiledóneas y a la familia botánica Musaceae, que a su vez está constituida por los géneros: *Musa* y *Ensete*. El género *Musa* esta conformado por dos secciones: *Musa* y *Callimusa*. La sección *Musa* es la de mayor importancia económica y difusión geográfica. Las especies más importantes son *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* (Häkkinen, 2013).

El plátano es una planta herbácea, monocárpica, de clima tropical, que llega a medir de 3 a 8 m de altura. Consta de un tallo subterráneo denominado cormo, rizoma, que es el verdadero tallo de la planta. En la parte superior del cormo, y atravesando la corteza, está el punto de crecimiento que da origen a las hojas y al desarrollo externo de la planta. En la parte inferior desarrolla las raíces que se ramifican en secundarias y éstas, a su vez, en pelos absorbentes. El pseudotallo (falso tallo) está formado por las vainas envolventes de las hojas, que se disponen en forma helicoidal, unidas fuertemente unas con otras, llegando a tener 30 cm de diámetro basal y no son leñosas. Su estructura es tan resistente que permite mantener a la planta a pesar de su peso, el del sistema foliar y el racimo.

El tallo floral se eleva del cormo a través del pseudotallo y termina en la inflorescencia. Su función es básicamente conectiva; es decir, funge como el enlace vascular entre las raíces, hojas y el racimo.

En la etapa de desarrollo de la planta, se observan varios tipos de hojas: hojas rudimentarias, hojas estrechas ensiformes y hojas verdaderas. Una hoja verdadera consta de cinco partes: vaina, peciolo, lámina, nervadura central y apéndice (Figura 1.1). La vaina es la parte basal y envolvente de la hoja que forma parte del pseudotallo. El peciolo es acanalado y tiene una forma característica de media luna. La nervadura central es la prolongación del peciolo y se adelgaza hacia el ápice de la hoja. La lámina de la hoja es de forma oblongada con su ápice en punta. El apéndice es una prolongación del nervio central y le permite a la hoja nueva abrirse paso por el pseudotallo al ir emergiendo. Finalmente, el eje de la inflorescencia es la continuación del tallo floral. En este las hojas están reemplazadas por brácteas que recubren las flores, que se abren y exponen los dedos que inicialmente apuntan hacia abajo y posteriormente toman una posición inversa hacia arriba (Figura 1.1).

El fruto es una falsa baya curveada. Su cáscara es verde y se torna amarilla en su madurez. El tamaño y peso de la fruta depende del vigor y la salud de la planta. En cultivos del trópico, el fruto puede ser cosechado entre 85 y 110 días después del floreamiento, pero en zonas subtropicales, el desarrollo de la fruta puede tomar hasta 210 días. Cuando se corta el racimo, la planta finaliza su ciclo de vida y se reemplaza por uno de los retoños que una vez emitió el cormo (Rodríguez *et al.*, 1985).

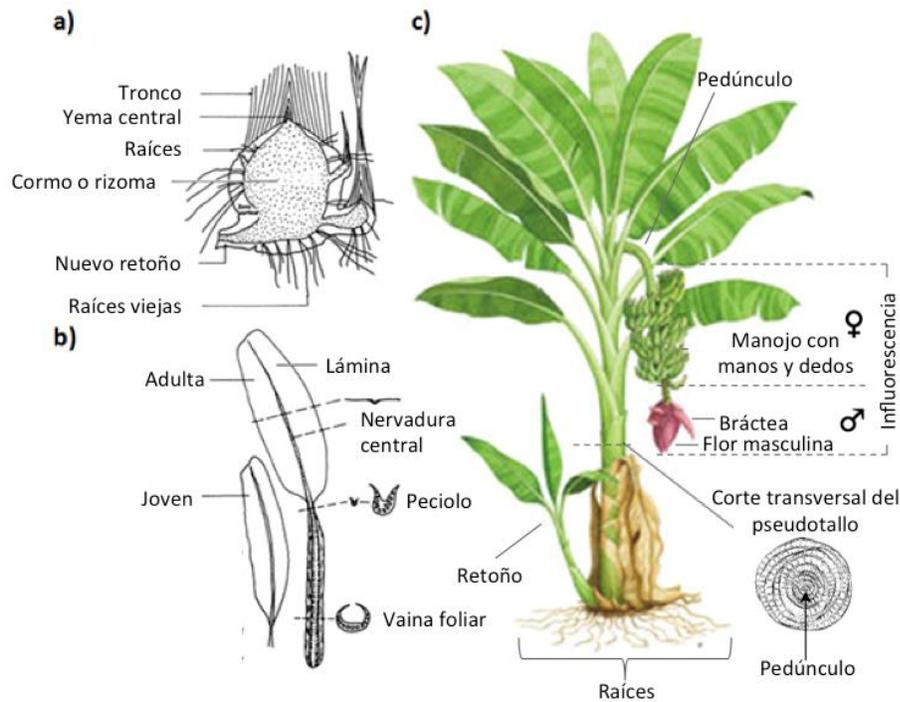


Figura 1.1 Estructura de la planta de plátano. a) Corte longitudinal de un cormo, b) Tipos de hoja en sus diferentes etapas de desarrollo, c) Planta adulta. Imagen modificada de Rodríguez *et al.* (1985).

1.1.3 Importancia del plátano como cultivo agrícola

El plátano es una fruta tropical que posee una combinación de carbohidratos, minerales y vitaminas que la convierten en un alimento nutritivo en cualquier dieta (Figura 1.2). Es además, el complemento perfecto para las personas con gran actividad física, como niños y deportistas.

COMPOSICIÓN PROXIMAL/100 G	
AGUA	74,20
ENERGÍA (KCAL)	92,00
GRASA	0,48
PROTEÍNA	1,03
CARBOHIDRATOS	23,43
FIBRA	2,40
MINERALES	
POTASIO (MG)	396
FÓSFORO	20
HIERRO	0,31
SODIO	1
MAGNESIO	29
CALCIO	6
ZINC	0,16
SELENIO (MG)	1,1
VITAMINAS	
VITAMINA C (MG)	9,1
VITAMINA A (I.U.)	81
VITAMINA B1 (MG)	0,045
VITAMINA B2 (MG)	0,10
VITAMINA E (MG)	0,27
NIACINA (MG)	0,54



Figura 1.2 Contenido nutricional del plátano fresco por cada 100 gr de pulpa (Hernández y Vit, 2009)

A través de los años el plátano se ha convertido en un alimento básico en todas las zonas agrícolas del país y últimamente ha cobrado relevante importancia como un cultivo económicamente rentable, aunque en la producción de plátano aproximadamente el 85% se da en parcelas relativamente pequeñas y huertos familiares o de traspatio con el fin de consumo local (Arias *et al.*, 2003). El cultivo es de interés para los agricultores, ya que la producción de plátano es una actividad comercial muy rentable, pues por cada peso invertido se recuperan \$1.40 pesos (Plan Rector del Sistema Nacional de Plátano, 2010).

Existen plátanos de todas las formas, tamaños y colores. Dependiendo de la variedad y la madurez, la pulpa puede ser de almidón dulce y firme a blanda. Los plátanos son el alimento básico de muchos países de América Latina, Asia y poblaciones africanas, mientras que en otros países de clima templado lo emplean como postre.

Existen diferentes variedades según la región y también se han desarrollado híbridos que han podido adaptarse a diferentes países de condiciones climáticas similares.

La variedad Cavendish (AAA) incluye frutos del plátano que se consumen crudos. Entre los principales se encuentran el Enano Gigante, Enano Chaparro, Roatán, Valery, Morado. Las siguientes variedades son plátanos comestibles sólo después de cocinarlos: Cuerno (AAB), con un promedio de 30 dedos por racimo, una longitud de 24 cm y un diámetro de 5 cm; Dominico (AAB) Hartón, con un promedio de 80 dedos por racimo (más pequeños y delgados que la Variedad Cuerno); el híbrido FIAH 21 (AAAB) es originario de Honduras y es altamente tolerante a la Sigatoka. Puede llegar a producir 70 dedos por racimo si se le proporciona el manejo agronómico adecuado. El fruto posee un periodo del estado inmaduro corto (3-5 días), en el que su pulpa es inconsistente y exige un cuidadoso manejo post-cosecha. El híbrido FHIA 20 (AAAB) tiene características similares a FHIA 20, pero con un mayor periodo del estado inmaduro (7-9 días). Ambos híbridos poseen un gran valor comercial para las industrias que se dedican a la fabricación de frituras de plátano. La variedad África 1 es originaria de Camerún y es tolerante a la Sigatoka negra y amarilla. Da frutos de 700 g y pulpa rosada (Marcelino *et al.*, 2004; Plan Rector del Sistema Nacional de plátano, 2010).

1.1.4 Producción de plátano a nivel mundial

Según datos de la FAO, en el año 2012, en el mundo habían 4 953 315 Ha dedicadas al cultivo de plátano. La producción mundial de plátano ha ido en aumento: de 40 millones de toneladas en el 2000 a 89 658 324 de toneladas en 2012. La India es el país con mayor producción con 24 869 490 Ton, seguido por China con 10 550 000 Ton y Filipinas con 9 225 998 Ton. México ocupa actualmente el décimo lugar con una producción de 2 203 861 Ton. Dentro de los principales países exportadores de plátano están Ecuador con 5 778 170 Ton, seguido por Bélgica con 1 294 403 Ton y Colombia con 777 275 Ton, respectivamente. Estados Unidos se mantiene hasta el momento como principal importador de plátano con 4 122 683 Ton, seguido por Bélgica con 1 340 044 Ton y Alemania con 1 288 293 Ton (Figura 1.3).

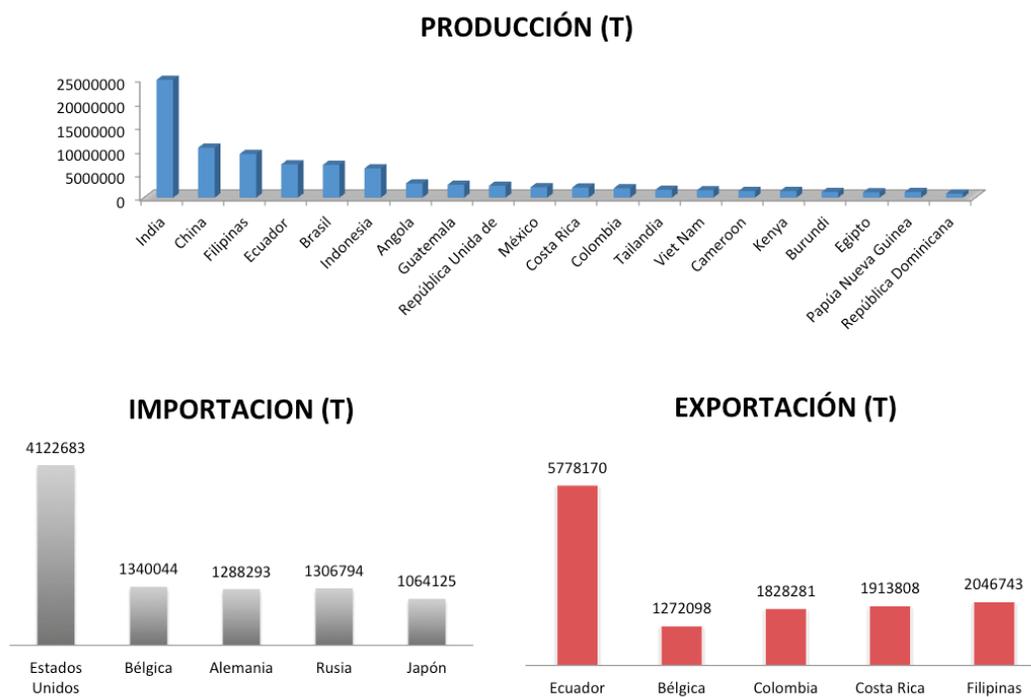


Figura 1.3 Producción de plátano a nivel mundial (Fuente: FAOSTAT 2012).

1.1.5 Producción de plátano en México

En México, se destina alrededor de 78 mil Ha a este cultivo y genera una ganancia anual de aproximadamente de 2.1 millones de Ton, de las cuales el 95% se destina al consumo interno y el 5% restante para la exportación (SAGARPA, 2010).

En el 2013 se dedicaron 75 009 Ha al cultivo de plátano en el país. Chiapas se colocó como el principal estado dedicado a este cultivo con 23 223 Ha, seguido por Veracruz (15 109 Ha) y Tabasco (10 709 Ha). En este año se obtuvo una producción de 2 127 772 Ton/Ha, de la cual el 52% se generó en los estados Chiapas y Tabasco, con 723 626 y 526 968 Ton, respectivamente. De acuerdo con los datos del SIAP, los estados con mayor rendimiento fueron Tabasco (49.22 Ton/Ha), Jalisco (36.09 Ton/Ha) y Colima (33.55 Ton/Ha)(Figura 1.4).

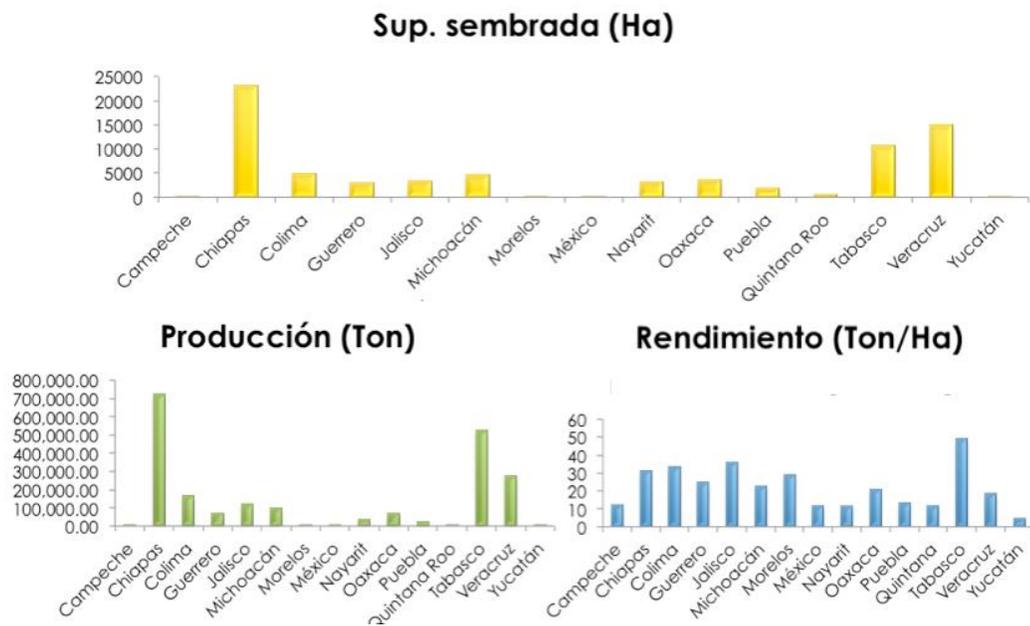


Figura 1.4 Estadísticas de la producción de plátano en México (Fuente: SIAP, 2013).

1.1.6 Problemáticas de la producción: aspectos de patógenos y plagas

Las principales causas de pérdidas se deben a la alta incidencia de plagas y enfermedades. Dentro de las enfermedades que son causadas por hongos, la primera identificada fue la Sigatoka amarilla, causada por el hongo *Mycosphaerella musicola*. Se caracteriza por la presencia inicial de manchas necróticas, rodeadas a veces por un halo amarillo y posteriormente se da el secamiento y muerte de la mayor parte del área foliar. Posteriormente se identificó la Sigatoka negra que es más destructiva que ataca el género *Musa*, causada por el hongo *M. fijiensis*. Esta última es más agresiva que la Sigatoka amarilla. Esta enfermedad no mata inmediatamente a las plantas. Se caracteriza por causar rayas negras en las hojas, que merman la capacidad fotosintética y desencadena una maduración prematura de la planta que se refleja en la cantidad y tamaño de los frutos. En las fases avanzadas de la infección se produce la necrosis foliar (Figura 1.5; Churchill, 2010).

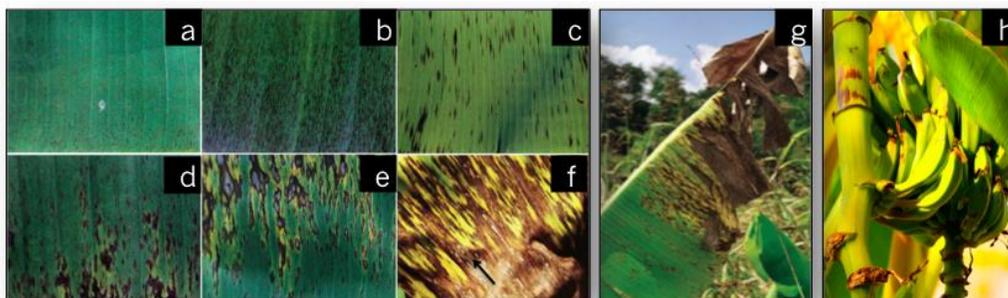


Figura 1.5 Síntomas de la enfermedad de Sigatoka negra en plátano. Infección en la hoja de *Musa spp.* causada por *M. fijiensis*. Estadios de la enfermedad en hojas: peca inicial (a), primer estado de raya (b), segundo estado de raya (c), primer estado de mancha (d), segundo estado de mancha (e), tercer estado de mancha (f), necrosis foliar (g) y frutos inmaduros (h). Imagen modificada de Churchill (2010).

El ciclo de la enfermedad de *M. fijiensis* consiste en cuatro etapas distintas que incluyen la germinación de esporas, la penetración del estoma, aparición de espermatogonios, peritecios y ascosporas, es en esta fase donde se propaga la enfermedad. Plantas silvestres de plátano que no tienen ningún uso agronómico, como en las subespecies burmannicoides Calcuta 4 ó *Malaccensis*, son resistentes a esta enfermedad a través de un mecanismo de defensa que involucra muerte celular programada, del tipo HR (Churchill, 2010).

El mal de Panamá es otra enfermedad que afecta al banano y la ocasiona el hongo *Fusarium oxysporum cubense* sp. *Cubense* Raza 4. Se caracteriza por el amarillamiento de las hojas más viejas, que se marchitan y terminan colgadas del pseudotallo, debido al debilitamiento de los peciolos, para finalmente secarse (Figura 1.6b). Los síntomas internos se desarrollan en las raíces, avanzando por el cormo, hasta dispersarse por el pseudotallo; estos son observables haciendo cortes a las plantas infectadas (Figura 1.6c). La obstrucción del sistema vascular de la planta es lo que evita que pueda absorber agua y nutrientes del suelo, lo que termina por matarla (Figura 1.6e; Dita y Pérez, 2013).



Figura 1.6 Síntomas de la enfermedad del mal de Panamá en plátano. a, b) Síntomas externos de la infección, c) Síntomas internos son visibles realizando un corte transversal (c) y radial (d) al pseudotallo de una planta infectada observándose la infección del hongo en el tejido vascular. e) Fotografía por microscopía electrónica de la formación de tilosas en los vasos del xilema de plátano infectado. Imagen modificada de Dita y Pérez (2013).

Por otra parte, el picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) es una plaga considerada como la más importante en países tropicales y subtropicales. Se alimenta y desarrolla dentro del rizoma, formando túneles que obstruyen el paso del agua y los nutrientes. Además son la puerta de entrada de otras plagas como el Gusano tornillo (*Castniomera humboldti*), la Lliga estrellada (*Rosellinia pepo*) y el Moko (bacteria *Ralstonia solanacearum*) (Merchán, 2002). Esta última enfermedad es considerada uno de los problemas fitosanitarios más serios para el cultivo de plátano, pues representa un problema potencial para países en los que esta presente. Se dispersa fácilmente y afecta todos los estados de desarrollo de la planta. El principal síntoma inicia en la hoja bandera, que se torna amarillo-verdosa, y avanza hacia las hojas de mayor edad (Figura 1.7a). Las plantas enfermas presentan un marchitamiento gradual en relación con la intensidad de la enfermedad. La bacteria coloniza el tejido central del pseudotallo y lo obstruye con polisacaridos que genera ella misma (Figura 1.7c). En los estadios avanzados de la enfermedad se pueden observar puntos color cafés en los raquis de las hojas (Figura 1.7d). En el caso del fruto, los síntomas se observan en las manos y en el racimo, causando la pudrición de los frutos. Los frutos presentan madurez prematura con cáscara agrietada (Figura 1.7e; Martínez, 2013).

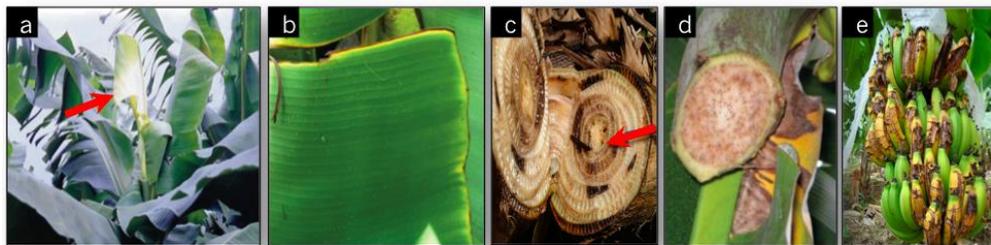


Figura 1.7 Síntomas de la enfermedad del Moko en plátano. a) Amarillamiento y debilitamiento de la hoja bandera, b) Clorosis y necrosis en la orilla de las hojas, c) Corte transversal del pseudotallo (c) y el raquis (d) con haces vasculares y puntuaciones color café, e) Síntomas del Moko en frutos. Imagen modificada de Martínez (2013).

1.1.7 Biotecnología aplicada al cultivo de plátano

El género *Musa* incluye miembros de reproducción sexual (por semilla) y asexual (de manera vegetativa), donde el mejoramiento convencional de banano y/o plátano de cocción, han tenido un objetivo en común: el desarrollo de cultivares resistentes a enfermedades y plagas [como la Sigatoka (negra y amarilla), el mal de Panamá, el Moko, picudo, entre los más importantes] y conferirle características agronómicas y organolépticas deseables que sean más valoradas en el mercado internacional (Rosales y Pocasangre, 2002).

Durante los últimos 80 años se ha desarrollado el mejoramiento de banano mediante técnicas tradicionales de cruza entre variedades resistentes. Se puede mencionar el programa de mejoramiento de banano y plátano de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA), donde se obtuvieron híbridos tetraploides más sobresalientes: FHIA-01, FHIA-02, FHIA-18 y FHIA-23, como bananos de postre. Por otra parte, los FHIA-03 y FHIA-25 como bananos de cocción. Todos los híbridos FHIA liberados son resistentes o tolerantes a la Sigatoka negra, así como al mal de panamá. Sin embargo, sus características organolépticas y vida de anaquel no son las ideales (FHIA, 2014).

Por otra parte, el programa de mejoramiento de banano del CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Francia) creado en 1983, en el que se hacen estudios estratégicos para el mejoramiento genético,

basados en una caracterización molecular de germoplasma, el uso del cultivo de tejidos, mutagénesis, marcadores moleculares, embriogénesis somática, transformación genética no convencional. Su estrategia se basa en desarrollar triploides resistentes. Su proceso de mejoramiento se basa en caracterizar diploides (2X) fértiles, que posean características agronómicas como resistencia a enfermedades y mejorar la calidad de fruta. Una vez obtenidas líneas puras y fértiles, se tratan con colchicina para inducir una duplicación cromosómica, que resulta en la producción de plantas tetraploides (4X) fértiles, que finalmente se cruzan con diploides seleccionados, para producir líneas triploides. Entre los híbridos más sobresalientes del CIRAD están IRAF 909 e IRAF 910, que son triploides con buenos rendimientos en el tamaño del racimo y tolerantes a la Sigatoka negra (Rosales y Pocasangre, 2002).

Si bien el mejoramiento convencional ha dado resultados, hasta el momento no ha sido posible aplicar esto en cultivares comerciales como Enano Gigante. La biotecnología brinda múltiples herramientas que pueden contribuir de manera positiva a este cultivo. El área en donde más se ha trabajado es en los procesos de micropropagación de plátano.

Las técnicas de embriogénesis somática (ES) se desarrollaron originalmente para lograr dos propósitos: 1) la micropropagación masiva y 2) el desarrollo de cultivos celulares para el mejoramiento genético (transformación genética y la fusión de protoplastos) (Sági *et al.*, 1995; Becker *et al.*, 2000). Actualmente existen métodos de transformación genética a partir de suspensiones celulares embriogénicas (SCE) ya establecidas para Enano Gigante, mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Khanna *et al.*, 2004) o biobalística (Becker *et al.*, 2000). Además, la regeneración de plantas a partir de SCE ya ha sido probada en cultivares comerciales como Enano Gigante, obteniéndose aproximadamente un 13-25% de embriones somáticos regenerados a planta (Navarro *et al.*, 1997).

El análisis de la interacción de *Musa acuminata* con el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, demostró una alta actividad de enzimas peroxidasa, Fenilalanina Amonio Liasa (PAL), β -1,3 glucanasa, Quitinasa y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el cultivar Calcuta 4 resistente a Sigatoka, a diferencia del cultivar Williams que es susceptible al hongo. Dichas enzimas podrían desempeñar una función esencial en la defensa de la planta con una RH, lignificación celular y la síntesis de compuestos fenólicos (Torres, *et al.*, 2009).

Por último, un avance importante para este cultivo fue la publicación de la secuencia genómica de un cultivar silvestre de *Musa acuminata* DH-Pahang, que consta de 472 Mega bases (Mb), donde se identificaron 36 542 genes (D'Hont *et al.*, 2012). Teniendo acceso al genoma de plátano y haciendo uso de técnicas de ingeniería genética, biología molecular y la embriogénesis somática, se abre la oportunidad de realizar la búsqueda de genes involucrados en respuesta a enfermedades, para realizar mejoramiento genético en este cultivo en el corto y mediano plazo.

1.1.8 El sistema inmune de las plantas

Las plantas son organismos sésiles que están sujetas a cambios en las condiciones ambientales. Continuamente son amenazadas por una amplia gama de patógenos y plagas, incluyendo virus, bacterias, hongos, insectos herbívoros entre otros. Cada uno de estos agentes patogénicos desarrolla características altamente especializadas para establecer una relación parasitaria con la planta huésped. De acuerdo a sus estilos de vida, estos patógenos se clasifican en biótropos, quienes obtienen los nutrientes de tejido vivo infectando la célula huésped sin alterar el resto de la planta; y los necrótopos, quienes destruyen las células huésped segregando toxinas que degradan la pared celular para así alimentarse de tejido muerto. Por último están los hemibiótopos que son patógenos que presentan ambos estilos de vida (Pieterse *et al.*, 2009).

Para contrarrestar el ataque de estos diferentes tipo de patógenos, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa que consisten en barreras físicas y químicas constitutivas que ayudan prevenir la invasión; no obstante, a pesar de la diversidad de defensas constitutivas, muchos patógenos son capaces de romper tales defensas. Para ello las plantas han evolucionado estrategias sofisticadas que perciben el ataque de patógenos activando mecanismos moleculares inducibles a partir de señales sistémicas provenientes del sitio de la infección (Camarena, 2009).

El sistema inmune de las plantas está constituido por una inmunidad innata que actúa de dos formas fundamentales: la primera fase consiste en el reconocimiento de PAMP, mediante PRR y que se localizan anclados en la superficie de las células vegetales. Cuando estos receptores se activan se desencadena una cascada de señalización que induce un mecanismo de defensa llamado PTI. Sin embargo, hay patógenos que logran evadir este mecanismo de defensa y son capaces de producir moléculas efectoras que

son introducidas a la célula, mediante un sistema de secreción tipo III, actuando en diferentes puntos de la señalización del PTI, inhibiéndolo y causando susceptibilidad en la planta. No obstante, las plantas han desarrollado mecanismos alternos que pueden reconocer moléculas efectoras mediante receptores de resistencia (R), conformados principalmente por la familia de proteínas NB-LRR, que contienen repeticiones ricas en leucinas y dominios de unión a nucleótidos (NB-LRR, por sus siglas en inglés). Estas proteínas son un punto clave para desencadenar una muerte celular programada (PCD) en el sitio de ataque, también conocida como HR. A esta segunda barrera de defensa del sistema inmune innato de la planta se le denomina ETI (Jones y Dangl, 2006; He *et al.*, 2007; Boller y He, 2009)(Figura 1.8).

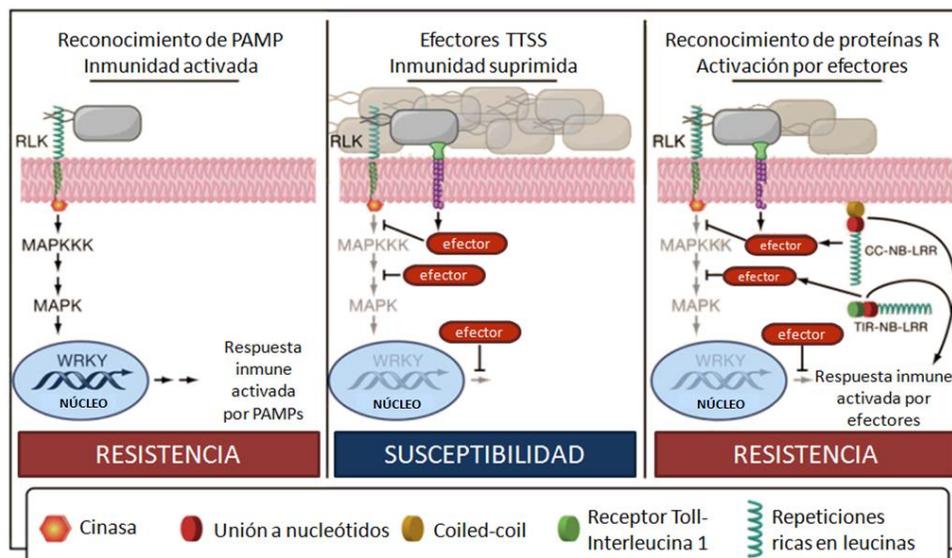


Figura 1.8 Modelo de evolución de la resistencia contra microorganismos en plantas. a) Reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por receptores tipos cinasas (RLKs) que generan una cascada de señalización de cinasas para activar factores de transcripción tipo WRKY que activan la inmunidad dirigida por PAMPs; b) el patógeno desarrolla proteínas efectoras que suprimen la señalización por cinasas; c) el hospedero desarrolla proteínas R que reconocen los efectores y activan la respuesta inmune. Imagen modificada de Chisholm *et al.* (2006).

Una vez que el patógeno es reconocido, la planta activa una serie de mecanismos de defensa a través de la transducción de señales, que principalmente es dirigida por proteínas cinasas. Estos mecanismos activos tienen como objetivo principal detener el avance del patógeno en la planta, entre ellos destaca la HR, que es un mecanismo de MCP que actúa de manera localizada en el sitio de infección con el objetivo de evitar la dispersión del patógeno a células sanas, produciendo ROS, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el superóxido (O₂) que actúan inmovilizando y matando al patógeno,

seguido de una acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana que ha desarrollado la planta para protegerse de manera sistémica ante ataques futuros (Collinge *et al.*, 1994).

1.1.9 La resistencia sistémica adquirida: una resistencia de amplio espectro para combatir el ataque de patógenos

Los eventos que conducen a la resistencia sistémica adquirida conocida como SAR. Los eventos que conducen a la SAR comienzan localmente debido a una HR en donde la producción de ácido salicílico (SA) aumenta, activando la señalización de SAR (Pieterse *et al.*, 2009). En las células más alejadas que no han sido infectadas, la primera respuesta de defensa es la síntesis de proteínas de defensa relacionadas con la patogénesis que van a activar diferentes mecanismos de resistencia en la célula, por lo que es considerada de amplio espectro y larga duración (Camarena y Torre, 2007).

Existe también un tipo de resistencia sistémica inducida que se desarrolla a partir de la colonización de las raíces de la planta por microorganismos principalmente rizobacterias. Este tipo de resistencia esta mediada por vías metabólicas sensibles al ácido jasmónico (JA) y al etileno (ET) y son independientes de la expresión de genes PR y SA (Pieterse *et al.*, 2009).

1.1.10 Rutas de señalización en los mecanismos de defensa de plantas

En los últimos años, en estudios de expresión realizados en *Arabidopsis thaliana* se ha mostrado que la diferencia entre las plantas susceptibles y resistentes, se encuentra en la velocidad y magnitud en la cual se activen los genes de defensa. Entre los genes que se pueden activar en respuesta a las infecciones se encuentran los que codifican para (1) proteínas que participan en la construcción de barreras físicas o que permiten un confinamiento físico del patógeno; (2) enzimas que participen en la biosíntesis de metabolitos secundarios antimicrobiales o bien (3) proteínas relacionadas con patogénesis PR (Van Verk *et al.*, 2009).

Las PR se definen como proteínas que se expresan en las plantas al ser infectadas por un patógeno o por una situación asociada a él, como el incremento en los niveles de hormonas señalizadoras como SA, JA y ET (Camarena, 2007; Van Verk *et al.*, 2009). El SAR es un sistema de respuesta que se activa con el SA, esta fitohormona cambia el

potencial redox del citoplasma, y esto permite la monomerización de NPR1, que facilita su entrada hacia el núcleo donde interactúa con factores de transcripción (TF) TGA para incrementar los niveles de expresión de varios genes PR. La HR permite la activación de SAR; sin embargo, esta respuesta sólo es funcional para microorganismos biótrofos y hemibiótrofos, pero no en necrótofos (Durrant y Dong, 2004).

En el caso de microorganismos necrótofos se activan dos rutas que actúan de manera sinérgica, activando genes PR que codifican para las proteínas β -1,3- glucanasas (PR-2), quitinasas básicas (PR-3), proteínas tipo Hevein (PR-4) o bien proteínas defensinas (PDFs, por sus siglas en inglés) que ayudan a las plantas a defenderse de microorganismos fúngicos. Dichas rutas, se activan por señales de ET y JA que actúan de manera antagónica a la ruta de SA, por lo que existen mecanismos de regulación que permiten la conexión entre ambas rutas (Pieterse *et al.*, 2009) (Figura 1.9).

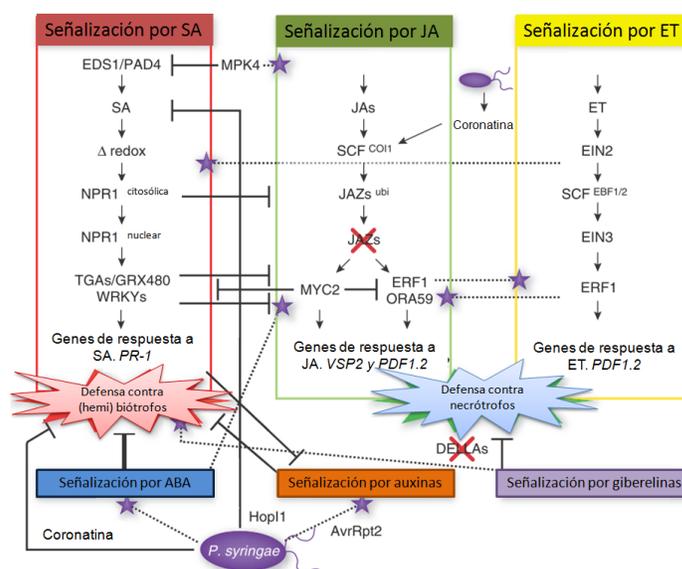


Figura 1.9 Interacción entre las diferentes rutas de señalización reguladas por fitohormonas durante la respuesta de las plantas al ataque de patógenos. Se ha visto que patógenos como *P. syringae* producen proteínas efectoras (Coronatina, Hop1 y AvrRpt2) que suprimen la respuesta de defensa de las plantas. Las rutas de señalización dependientes de SA, JA ó ET representan los principales mecanismos bioquímicos para activar los genes de defensa. Las líneas negras representan efectos negativos, mientras que las líneas punteadas con estrellas representan efectos positivos. Imagen modificada de Pieterse *et al.* (2009).

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

El gen *RAR1* (Required for *MLA12* Resistance) fue identificado por primera vez en cebada (*Hordeum vulgare*) y es requerido para la función de múltiples genes de resistencia tipo MLA (CC-NBS-LRR) que le confiere resistencia ante el hongo *Blumeria graminis*. Esta resistencia consiste en una acumulación de H₂O₂, primero con un estallido oxidativo a nivel local en el sitio de infección y concluye activando una HR (Shirasu *et al.*, 1999). Este gen codifica para la proteína RAR1, una chaperona de la proteína de choque térmico 90 (HSP90) y contiene dos dominios de unión de zinc de 60 aminoácidos altamente similares llamados CHORD1 y CHORD2 (dominios ricos en cisteína y histidina) que son separados por un dominio de 20 aminoácidos con tres cisteínas invariables y una histidina (CCCH) (Shirasu *et al.*, 2003, 2009) (Figura 1.10). Estos dominios son requeridos para que RAR1 interactúe directamente como chaperona de la proteína HSP90 y co-chaperona de SGT1 (supresor de G-dos alelo de skip1), esas interacciones son esenciales para sus funciones en la inmunidad de las plantas (Azevedo *et al.*, 2002; Takanashi *et al.*, 2003; Boter *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010).

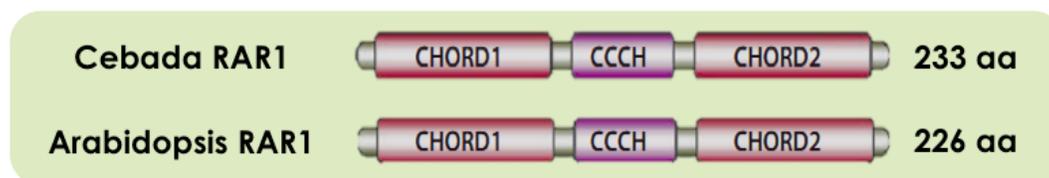


Figura 1.10 Estructura de la proteína RAR1. Las proteínas RAR1 de cebada y de *Arabidopsis* conservan los dominios CHORD 1 y CHORD 2 que permiten la interacción proteína-proteína.

En los últimos años, en estudios basados en silenciamiento génico y mutaciones al gen *RAR1* se ha observado un aumento en la susceptibilidad ante patógenos de tipo fúngico, bacteriano y virus, demostrando que *RAR1* posee un papel importante en la defensa basal de las plantas (Shirasu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002; Muskett *et al.*, 2002 y Fu *et al.*, 2009). Se ha propuesto una vía de activación de defensa, donde el gen *RAR1* es un punto de convergencia en la vía de señalización activada por genes R (Figura 1.11) (Hammond y Parker, 2003). Hasta el momento, se ha identificado una copia de *RAR1* en el genoma de arroz (*OsRAR1*), *Arabidopsis* (*AtRAR1*), soya (*GmRAR1*), tabaco (*NtRAR1*) y trigo

(*TaRAR1*) (Muskett *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008; Bhaskar *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2009 y Wang *et al.*, 2015).

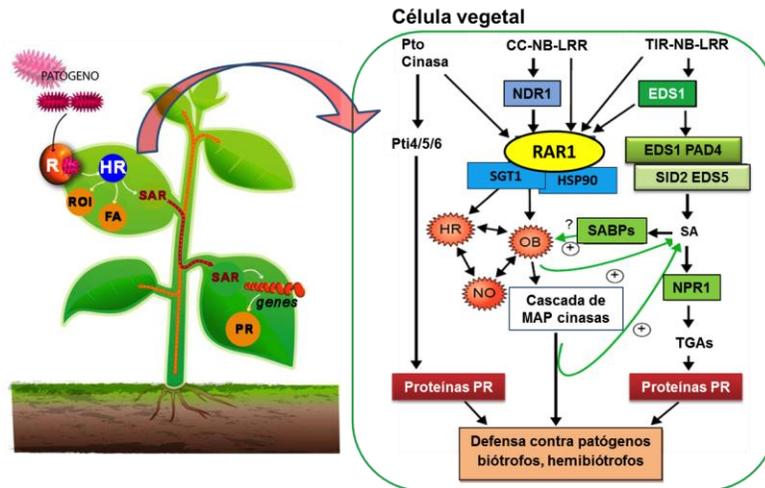


Figura 1.11 Vía de activación de *RAR1* a partir de estudios de pérdida de función. Ante la presencia de un patógeno, la planta detecta por medio de las proteínas NB-LRR productos de dicho microorganismo y desencadena rutas de transducción que activan respuestas tempranas conduciendo la expresión de 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.

1.1.12 *RAR1* y su interacción con otras proteínas co-chaperonas

Los dominios NB (Unión a nucleótidos) y proteínas NLR con repeticiones ricas en leucina funcionan como sensores inmunes citoplasmáticos en plantas y animales. Estas a su vez son capaces de reconocer de manera indirecta moléculas derivadas de patógenos y con ello desencadenar la respuesta inmune. Para realizar tal función, estas proteínas deben ser desplegadas y mantenerse en un estado competente para poder llevar a cabo el reconocimiento del patógeno en el sitio de infección. Una vez hecho el reconocimiento del patógeno, estas proteínas sufren cambios conformacionales que les permite ser translocadas para poder activar la inmunidad río abajo. Cuando este plegamiento no se lleva a cabo correctamente, los sensores son degradados para evitar la activación inapropiada de vías de señalización descendientes. Para llevar a cabo dicho plegamiento,

estos sensores requieren de chaperonas que establezcan esos cambios de conformación (Shirasu, 2009).

La proteína MLA es un sensor tipo NLR que le confiere resistencia a cebada ante la enfermedad de Oidio causada por el hongo *Blumeria graminis* en plantas de cebada. Una vez que se lleva a cabo el reconocimiento del patógeno esta proteína requiere de un plegamiento adecuado para poder transducir la señal de defensa, dicho ensamblaje es asistido por un complejo de co-chaperonas HSP90-RAR1-SGT1, que tienen como función interactuar entre sí estabilizando a las proteínas de resistencia (NB-LRR y NLR) para que transduzcan efectivamente la señal de defensa (Shang *et al.*, 2006; Kadota *et al.*, 2010)(Figura 1.12).

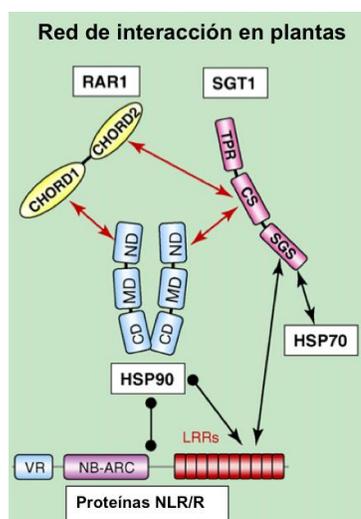


Figura 1.12 Representación esquemática del complejo chaperona para las proteínas NLR. Las interacciones entre la HSP90, SGT1 y dominios NLR revelan una red de interacciones directas entre proteínas que fueron evaluados *in vitro* (líneas rojas), doble híbrido y co-inmunoprecipitación (líneas negras)(Kadota *et al.*, 2010).

1.1.13 Genes mutantes de *rar1*

RAR1 es un componente esencial en la respuesta inmune que involucra a ciertos genes de resistencia de tipo NBS-LRR. RAR1, es una proteína co-chaperona que interactúa con otras chaperonas y para ello es esencial la presencia de los dominios CHORD1 y CHORD2, mutaciones en estos dominios han sido evaluadas observándose una disminución de la interacción con HSP90 y SGT1, al no interactuar correctamente las proteínas R no pueden transducir la señal de resistencia generando susceptibilidad a la

planta (Kadota *et al.*, 2010). En estudios realizados en cebada se demostró que mutantes al gen *rar1* fueron incapaces de acumular ROS y no presentaron una respuesta hipersensible ocasionando la susceptibilidad de la planta al hongo *Blumeria graminis* (Shirasu *et al.*, 1999) y a *Magnaporthe grisea* (Jarosch *et al.*, 2005). En el 2002, Muskett *et al.*, identificaron en *A. thaliana* genes ortólogos de *RAR1* en cebada y obtuvieron seis líneas mutantes para este gen. En ensayos de resistencia se demostró que dos líneas exhiben una susceptibilidad total (*rar1-11*) y parcial (*rar1-15*) ante *Peronospora parasitica* y *Pseudomonas syringae* cepa DC3000, a diferencia del control Landsberg *erecta* (Ler). Un fenotipo similar fue observado en plantas de arroz donde suprimieron la función de *OsRAR1* ocasionando susceptibilidad al hongo *Magnaporthe oryzae* a diferencia del control silvestre (Song *et al.*, 2013). De igual manera, en plantas de trigo en donde la expresión de *TaRAR1* fue suprimida se comprometió la resistencia de la planta al hongo responsable de la roya amarilla (Wang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

1.1.14 Sobre-expresión de *RAR1* en plantas

La sobre-expresión de genes tipo *RAR1* se evaluó en plantas en donde se silenció este gen, con el objetivo de observar si la sobre-expresión del transgen es capaz de reestablecer la función perdida. En arroz, la sobre-expresión del gen *OsRAR1* aumentó significativamente la resistencia a la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Sainz y Salmeron, 2006) y al hongo *M. oryzae* (Wang *et al.*, 2008). Por otra parte el gen de arroz fue silenciado en arroz y las plantas presentaron alta susceptibilidad ante la infección con el hongo *M. oryzae*. Mediante ensayos de complementación genética, se sobre-expresó a *OsRAR1* con el promotor de ubiquitina 1 de maíz en las líneas susceptibles, observándose un aumento significativo de la resistencia basal cuando son infectados con el hongo nuevamente (Song *et al.*, 2013). En soya la resistencia de las plantas al virus del mosaico y *P. syringae* se vio afectada por el silenciamiento del gen *GmRAR1* (Fu *et al.*, 2009).

Actualmente existe una patente del gen *OsRAR1* de arroz, otorgada a Sainz y Salmeron (2006), en la que está codificada la proteína *RAR1* involucrada en la resistencia (patente o. US7098378B2). El gen *OsRAR1* se expresó mediante el promotor constitutivo de ubiquitina y se reportó la resistencia al siguiente grupo de patógenos; *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizoctonia* spp., *Magnaporthe* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp.,

Fusarium spp. y *Sclerotinia* spp. La resistencia en organismos que desarrollan estilos de vida de tipo biótrofo, hemibiótrofo y necrótrofo con un mismo gen, indica que probablemente estos mecanismos de defensa tienen un punto de convergencia que le otorga a esta secuencia un gran potencial biotecnológico para generar plantas resistentes a otras especies de patógenos.

1.1.15 El gen *RAR1* en plátano

En un trabajo realizado por Canul (2010) se clonó un gen tipo *RAR1* de plátano variedad 'Tuu Gia', que confiere 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 *MaRAR1* se detectó en hojas, brácteas y flores de plantas adultas de plátano. Dentro del mismo estudio se realizó un dendograma de similitud, donde la secuencia *MaRAR1* se agrupó con secuencias tipo *RAR1* involucradas en la resistencia de las plantas monocotiledóneas de arroz (*OsRAR1*) y cebada (*HvRAR1*).

1.1.16 El estudio de *MaRAR1* en la planta modelo de Tabaco

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) es una especie que pertenece a la familia de las solanáceas, y es importante como cultivo agronómico. La planta de tabaco tanto *Nicotiana benthamiana* y *N. tabacum*, se ha convertido en un sistema modelo para el cultivo de tejidos y la ingeniería genética en las últimas décadas (Clemente, 2006). Un medio de cultivo *in vitro* (Murashige y Skoog, 1962), basado en estudios con cultivo de tejido de tabaco, ha sido ampliamente utilizado como formulación de medio de cultivo para cientos de especies de plantas. Por otra parte, La optimización de la transformación genética, utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, ha sido fundamental para la cascada de avances en el área de plantas transgénicas. Es el modelo ideal para la evaluación de la resistencia en plantas, debido a que es fácilmente transformable y la morfología que presenta en sus hojas al ser grandes y ovaladas facilita el análisis funcional de genes involucrados en la defensa de plantas ante patógenos. Además su fisiología es muy semejante a la de cultivos agronómicos. 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 estudios previos realizados en el laboratorio, se transformaron plantas de *N. tabacum* con el gen *MaRAR1* de la variedad Tuu Gia y se generaron cuatro líneas transgénicas de tabaco que sobre-expresan el gen *MaRAR1* bajo el control de promotor constitutivo 35S del CaMV y el terminador NOS, las cuales fueron nombradas L-MA1, L-MA2, L-MA3 y L-MA4. Las plantas transgénicas obtenidas de la generación T1 fueron analizadas demostrándose la presencia del transgen (Martin Cocom, 2014).

Estos datos son de gran interés para el cultivo de plátano, pues teniendo plantas transgénicas que sobre-expresan el gen *MaRAR1* en tabaco, se puede tener una mayor comprensión del funcionamiento de este gen y su función en la resistencia al estrés biótico.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El plátano es el cuarto alimento de mayor importancia económica después del arroz, el trigo y el maíz (SIPSA, 2014); sin embargo, la Sigatoka negra, el mal de Panamá y el Moko son enfermedades que afectan su producción significativamente.

El gen *RAR1* se encuentra implicado en la resistencia a patógenos biótrofos y hemibiótrofos en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, y su sobreexpresión puede conducir a incrementar la resistencia haciendolo un candidato interesante para el mejoramiento genético de plátano. La disponibilidad del ADNc de *MaRAR1* y líneas transgénicas de tabaco que expresen este gen permitirá evaluar su potencial para este fin.

Con la finalidad de facilitar el estudio de la función de *MaRAR1* en la resistencia al estrés biótico, en el presente proyecto se generaron cuatro líneas transgénicas de la generación T2 de la planta modelo de tabaco que sobre-expresan a *MaRAR1* y se avaluó su resistencia contra la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.

1.3 HIPÓTESIS

El gen *MaRAR1* de plátano esta implicado en la resistencia al estrés biótico en la planta modelo de tabaco.

1.4 OBJETIVOS

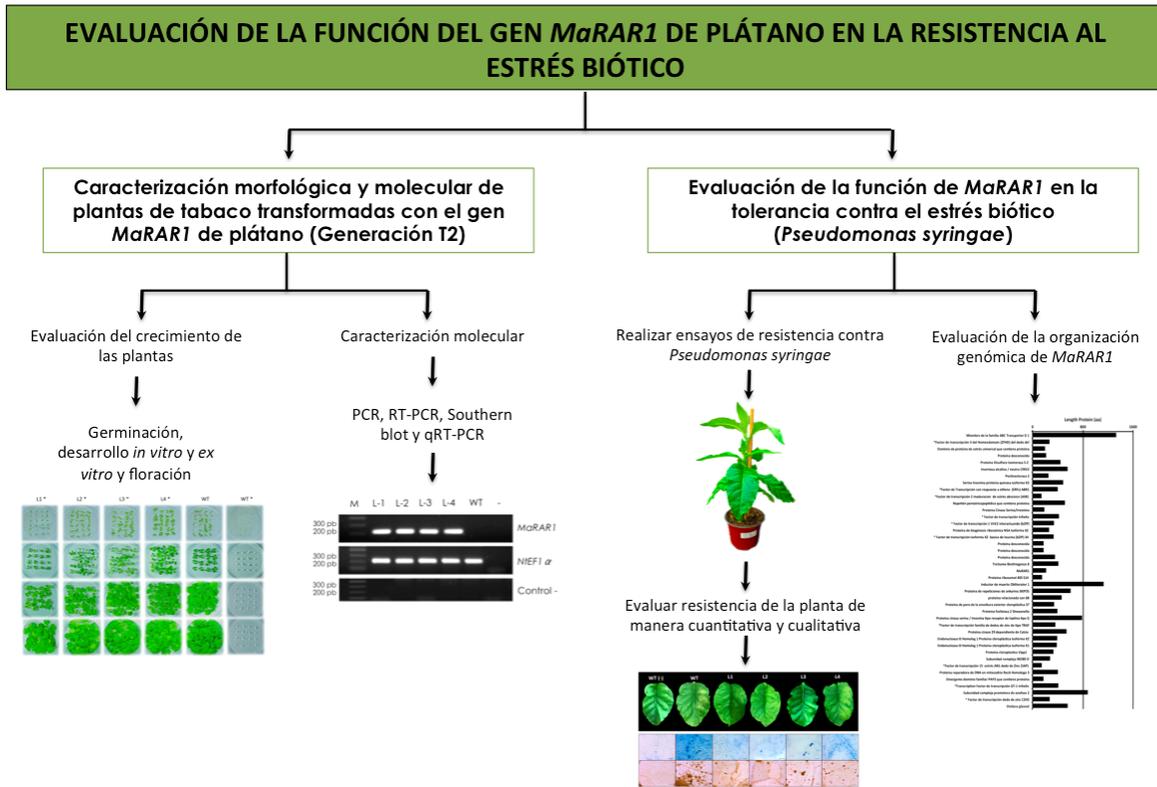
1.4.1 General

Evaluar la función del gen *MaRAR1* en la resistencia al estrés biótico en la planta modelo de tabaco

1.4.2 Particulares

1. Determinar el número de copias y los niveles de expresión de *MaRAR1* en plantas transgénicas de tabaco de la generación T2.
2. Evaluar la función de *MaRAR1* en la resistencia contra la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* en plantas transgénicas de tabaco de la generación T2.

1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE PLANTAS DE TABACO TRANSFORMADAS CON EL GEN *MaRAR1* DE PLÁTANO (GENERACIÓN T2)

2.1 INTRODUCCIÓN

Tabaco (*Nicotiana tabacum* P. H. SR1) se emplea como planta modelo debido a que su cultivo *in vitro* es fácil, posee un periodo de crecimiento corto y tiene métodos de transformación genética ya establecidos, lo que facilita el estudio de genes involucrados en resistencia ante patógenos (Ganapathi *et al.*, 2004).

El uso de promotores constitutivos es esencial para llevar a cabo el estudio de genes de resistencia, el más empleado actualmente fue aislado del virus de mosaico de la coliflor (CaMV35S, por sus siglas en inglés) y es utilizado frecuentemente como herramientas en los ensayos de expresión de genes en plantas dicotiledóneas. Esto ha permitido hasta el momento sobre expresar genes en diferentes tejidos de las plantas. Sin embargo, la sobre expresión constitutiva de ciertos genes ha generado cambios que generan malformaciones en las plantas y en algunos casos el silenciamiento de los genes estudiados (Vaucheret *et al.*, 1998).

El gen *RAR1* fue identificado por primera vez en la planta de cebada y se demostró que le confiere resistencia contra el patógeno *Blumeria graminis*. Este gen presenta solo una copia en plantas como cebada (*HvRAR1*), arroz (*OsRAR1*), soya (*GmRAR1*), *Arabidopsis* (*AtRAR1*), tabaco (*NtRAR1*) y trigo (*TaRAR1*) (Muskett *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008; Bhaskar *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2009 y Wang *et al.*, 2015). Hasta el momento existe un reporte en soya en donde el silenciamiento del gen *GmRAR1* generó un cambio en la coloración del tallo de la planta, no obstante la planta se desarrolló igual al control silvestre no demostrando cambios en su desarrollo (Fu *et al.*, 2009).

En nuestro laboratorio un gen tipo *RAR1* fue aislado de la variedad de plátano Tuu gia que presenta resistencia a la enfermedad Sigatoka negra, nombrado *MaRAR1* (Canul, 2010). Posteriormente Martin-Cocom (2014) realizó la transformación genética de tabaco con el gen *MaRAR1* de plátano cuya expresión fue conducida por el promotor CaMV35S. En este estudio se analizaron cuatro líneas transgénicas que presentaron diferente número de copias y que expresaron a *MaRAR1*. Esta evaluación molecular fue realizada en plantas transgénicas de tabaco de la generación T1.

Por tal motivo en el presente capítulo se planteó evaluar las líneas transgénicas de tabaco de la generación T2, para conocer la estabilidad del transgen *MaRAR1* en la progenie de la generación T2, sus niveles de expresión y su efecto en el fenotipo de las plantas transgénicas (*in vitro* y *ex vitro*).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Germinación de las semillas de la generación T2 de plantas de tabaco transformadas con el gen *MaRAR1*

Se germinaron semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. 'Petite Havana SR1') correspondientes a la generación T2 de las cuatro líneas transgénicas (L1-L4), la silvestre (WT) y líneas transformadas con el vector pCAMBIA 2200 (vector vacío) obtenidas a partir de plantas de la generación T1. Para la germinación se siguió el protocolo descrito por Clemente (2006). Previo a la germinación se desinfectaron las semillas colocándolas en etanol al 100% por 1 min, después en una solución de hipoclorito de sodio (CLORALEX) al 3%, con 50 μ L de Tween (SIGMA) por 5 min. Por último, se realizaron 3 lavados con H₂O destilada estéril.

Las semillas se sembraron en cajas petri con medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa 30 g L⁻¹ y 150 mg L⁻¹ de kanamicina como antibiótico de selección. La línea WT se germinó en medio MS sin antibiótico y como control negativo también se germinaron en MS con antibiótico. Las cajas se mantuvieron a 25 °C con fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad. Las plantas enraizadas se trasplantaron en magentas con medio MS, adicionado con 75 mg L⁻¹ de kanamicina. Después de dos meses, las plantas se trasplantaron a "peat moss" y perlita (PRO-MIX), a 25 °C \pm 2 °C, fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad. La intensidad lumínica fue de 75 μ mol m⁻²s⁻¹ (PHILIPS T5HO).

2.2.2 Análisis morfológico de las plantas de tabaco

Para el ensayo se tomaron semillas de una semana de edad post germinación, los individuos se trasplantaron a cajas petri con 25 mL de MS y 150 mg L⁻¹ de kanamicina. Se mantuvieron a 25 °C, con fotoperiodo de 16 /8 h luz/oscuridad. Se monitoreo el crecimiento de las plantas por 6 semanas.

Para la evaluación morfológica de las raíces de las líneas transgénicas, se trasplantaron plantas de una semana a cajas petri con 75 mL de medio MS. Las cajas se posicionaron de forma vertical con las condiciones de temperatura y fotoperiodo anteriormente

descritas. El crecimiento radicular fue monitoreado durante tres semana. Finalmente se realizo la medición de las raíces. El experimento se realizó por triplicado. Se realizó una prueba ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza, $n=3$.

2.2.3 Extracción de ácidos nucleicos

Se colectaron hojas de tabaco de la generación T2 (L1-L4 y WT) de plantas de 2 meses de edad. Se usó el método CTAB, de la siguiente manera: se maceró 100 mg de tejido en N (L). Posteriormente se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le agregó 600 μ L de CTAB caliente (65 °C). Las muestras se incubaron a la misma temperatura por 10 min. Posteriormente, se adicionó 600 μ L de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1), se homogenizaron las muestras en vortex y se centrifugaron a 14 000 rpm por 5 min. Se colectó el sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Para precipitar los ácidos nucleicos se agregó 600 μ L de isopropanol frío (4 °C) + 100 μ L de acetato de sodio 3 M. Se incubaron las muestras en hielo por 5 min. Se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min. Después se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70%. Se retiró el sobrenadante y las pastillas se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente la pastilla se resuspendió en 60 μ L de H₂O UP (INVITROGEN).

ADN

Se tomó 30 μ L de ácido nucleico y se trató con 1 μ L RNAsaA (1 mg mL⁻¹) a 37 °C por 30 min, para obtener ADN.

ARN

Para obtener ARN, se usó 39 μ L de ácido nucleico y se agregó 5 μ L de DNAsa (RQ1 Rnase-Free Dnase 1 Ug μ L⁻¹) + 5 μ L de amortiguador de DNAsa 10X (PROMEGA) + 1 μ L de RNaseOUT 40 U μ L⁻¹ (INVITROGEN). Se homogenizó la mezcla de reacción y se incubaron a 37 °C por 30 min.

Para calcular la concentración y la pureza del ADN y ARN extraído se utilizó un espectrofotómetro SmartSpect plus (BIORAD). Para cuantificar la concentración se tomó 5 μ L de muestra más 95 μ L de H₂O UP (dilución 1:20). Para medir la pureza se tomó 5 μ L de muestra más 95 μ L Tris HCl 10 mM pH 7.5 y se calculó la relación de lecturas de

absorbancias de A260/A280. Finalmente se verificó la integridad del ADN y ARN en un gel de agarosa al 1.2%.

2.2.4 Amplificación de *MaRAR1* por PCR en las líneas transgénicas de tabaco

Se empleó 400 ng de ADN_g como plantilla y se usaron oligonucleótidos específicos para la amplificación de una región interna de 240 pb del gen (Cuadro 2.1). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 μ L. La mezcla de reacción fue la siguiente: 5 μ L de templado, 1 μ L del primer forward 10 μ M, 1 μ L del primer reverse 10 μ M, 5 μ L de amortiguador 10X, 1.5 μ L de MgCl₂ 50 mM, 1 μ L de dNTPs 10 mM, 0.2 μ L de Taq polimerasa recombinante 5U μ L⁻¹ (INVITROGEN) y 35.3 μ L de H₂O UP. Las condiciones de termociclación fueron las siguientes: 1. Se usó 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 por 1 min. Los pasos 2-4 se repitieron 39 veces; 6. Extensión final: 72 °C por 5 min. Se usó el plásmido pCAMBIA 2200 35S::*MaRAR1*::NOS que contiene el gen de interés como control positivo. Como control negativo se utilizó ADN de tabaco WT que no contiene el gen *MaRAR1* de plátano y H₂O UP, para descartar contaminación en los reactivos de PCR.

Cuadro 2.1 Oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *MaRAR1*

Secuencia	Secuencia de los oligonucleótidos diseñados
<i>MaRAR1</i>	Sentido 5'- CGTCTCTGATCATGGATCACAAAGG -3'
	Antisentido 5'- TCACAGCATTTCACCCTCT -3'

Amplifican una región interna de 240 pb del gen *MaRAR1*

2.2.5 Evaluación del número de copias de *MaRAR1* en plantas de tabaco de la generación T2 mediante un ensayo Southern blot

El ensayo de Southern blot se llevó a cabo con el protocolo reportado por Martin-Cocom (2014), que a su vez es deriva de una modificación del método de Sambrook y Russell, (2001).

Digestión con la enzima *EcoRI*

La enzima de restricción con la que se digirió el ADN de las plantas fue *EcoRI*. Se digirieron 10 µg de ADN empleando 1U de enzima por cada µg de ADN, en un volumen de 30 µL con el amortiguador 3 10X (NEW ENGLAND BIOLABS). La reacción de digestión se incubó a 37 °C por 12 h. 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 85 por 90 min.

Southern blotting

El gel de agarosa con el ADN genómico fraccionado con *EcoRI* se introdujo en una solución de depurinación (1.1% HCl) por 10 min. A continuación se trató en una solución de desnaturalización (1.5 M NaCl; 0.5 M NaOH) por 30 min y posteriormente en una solución de neutralización (1.5 M NaCl; 0.5 M Trizma base) por 30 min. La transferencia del ADN hacia la membrana de nylon (ROCHE) se realizó con una solución de citrato de tri-sodio 0.3 M y 3 M NaCl (20xSSC) por 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).

Marcaje de la sonda de ADN

La sonda se marcó con digoxigenina por medio de PCR. Para esto fue necesario introducir en la reacción de PCR desoxirribonucleótidos (dNTPs) precursores marcados. Se utilizó dUTP unido a digoxigenina (Dig-dUTP) (ROCHE). Para el marcaje de la sonda del gen *MaRAR1* se utilizó como template el plásmido pC35SMa. El volumen de la reacción fue de 20 µL y la proporción de precursor marcado con respecto al no marcado (Dig-dUTP: dTTP) fue de 1 a 3. La concentración final de los componentes de la reacción fueron los siguientes: 100 pg de ADN, amortiguador 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 por 1 min; 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 cortó la banda correspondiente a la sonda y se purificó con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), para evitar que la presencia de nucleótidos DIG-dUTP no incorporados en el ADN generen un exceso de señal de fondo tras las hibridaciones.

Prehibridación e hibridación

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

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 maleíco, 0.15 M NaCl pH 7.5, 0.3% Tween 20) durante 5 min para equilibrarla. Posteriormente se sumergió la membrana en la solución de bloqueo (ROCHE) (dilución 10X solución de bloqueo 1:10 con el amortiguador de ácido maleíco) durante 30 min, bloqueándose así los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo. Posteriormente 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 por 30 min con agitación suave.

La eliminación del anticuerpo no unido al ADN se realizó por medio de 2 lavados con el amortiguador de lavado por 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 10 min y se reveló la película empleando el revelador (RP X-OMAT) y el fijador (RP X-OMAT).

2.2.6 Evaluación de la expresión del transgen *MaRAR1* en plantas de tabaco de la generación T2 mediante RT-PCR de punto final

La expresión del gen *MaRAR1* fue verificada en la generación T2 por RT-PCR, para ello se realizó la síntesis de ADNc a partir de ARN previamente extraído de hojas. Para la síntesis de ADNc se partió de una muestra de 5 µg de ARN total, se agregó 1 µL de oligo dT primer 50 µM (5'-GCTGTCAACGATACGCTAACGTAACG-3', INVITROGEN) y se adicionó H₂O hasta llegar a 20 µL. Se calentó la muestra a 75°C por 5 min para linealizar el RNAm y posteriormente se enfrió en hielo por 3 min. A los 20 µL se agregaron 8 µL de amortiguador de la enzima transcriptasa reversa 5 X first strand, 4 µL 0.01 M de DTT 0.1 M, 2 µL de dNTPs 10 mM y 2 µL de RNaseOUT 40 U MI⁻¹ INVITROGEN). Los 38 µL de reacción se dividieron en dos tubos diferentes con 19 µL cada uno. En el primer tubo se agregó 1 µL de enzima transcriptasa reversa (Super Script III 200 U µL⁻¹, INVITROGEN) y en el segundo tubo se agregó 1 µL de H₂O UP como control negativo, para descartar contaminación por ADN genómico. La reacción se incubó por 90 min a 50 °C, después se inactivó la enzima incubando la muestra a 75 °C por 15 min. Seguidamente se agregaron 2 µL de RNasa A (1mg mL⁻¹) 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.

Para realizar la reacción de RT-PCR se tomó 5 µL de ADNc de cada muestra con el programa previamente descrito usando los oligonucleótidos de *MaRAR1*. A su vez, se colocó como control positivo de la síntesis de ADNc oligonucleótidos que amplifican el factor de elongación 1 alfa de tabaco (*NtEF1α*) (Cuadro 3.1) y como control negativo se

utilizó ADNc de tabaco WT que no posee el gen *MaRAR1*, también se utilizaron los mismos oligonucleótidos de *NtEF1 α* con la muestra de ADNc que no contiene retrotranscriptasa, por lo que no debería observarse amplificación.

Cuadro 2.2 Oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *NtEF1 α*

Secuencia	Secuencia de los oligonucleótidos reportados	
<i>NtEF1α</i>	Sentido	5' TCACATCAACATTGTGGTCATTGGC 3'
	Antisentido	5' TTGATCTGGTCAAGAGCCTCAAG 3'

Lee *et al.*, 2001

2.2.7 Evaluación de los niveles de expresión de *MaRAR1* en las líneas transgénicas generación T2 por RT-PCR de tiempo real

Se evaluó la expresión de *MaRAR1* en las plantas transgénicas de tabaco por qRT-PCR (Power SYBR[®] Green) con los oligonucleótidos *MaRAR1F* y *MaRAR1R* (Cuadro 2.1), siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Los oligonucleótidos *NtEF1 α F* y *NtEF1 α R* (Cuadro 2.2) fueron diseñados para amplificar al gen *NtEF1 α* de tabaco, que fue usado como gen normalizador para evaluar los datos de expresión (Lee *et al.*, 2001). Los niveles de expresión relativa de *MaRAR1* fueron evaluados de acuerdo al método de Pfaffl (2001).

Para el ensayo de expresión se tomó 5 μ L de cDNA (por muestra) en un volumen de reacción final de 50 μ L, con 300 nM de oligonucleótido sentido, 300 nM de oligonucleótido antisentido, 10 μ L de master mix 1X y 4.8 μ L de H₂O UP. El programa utilizado fue 95 °C 10 min, y 40 ciclos a 95 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos y 72 °C 30 segundos, seguido se evaluó la curva de disociación tomando como referencia una temperatura de 55 °C hasta 95 °C, donde cada 0.3 °C el programa toma los datos para calcular la curva. Para llevar a cabo la qRT-PCR se utilizó el StepOne[™] Real-Time PCR System y el software StepOne Software v 2.3 (Invitrogen/Life Technologies). La qRT-PCR de *MaRAR1* en las cuatro líneas transgénicas fue realizado por triplicado y el experimento fue hecho por duplicado observándose resultados similares.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Germinación de semillas de la generación T2 de líneas transgénicas de tabaco que presentan al gen *MaRAR1* de plátano

Las semillas que corresponden a la generación T2 de las líneas L1-L4 germinaron en medio MS con el antibiótico de selección a los 5 días, por su parte, las semillas de la línea WT fueron capaces de germinar en MS normal, sin embargo las semillas de la línea WT germinadas en presencia de antibiótico mostraron una coloración blanca en sus hojas y las plantas no prosperaron (Figura 2.1).

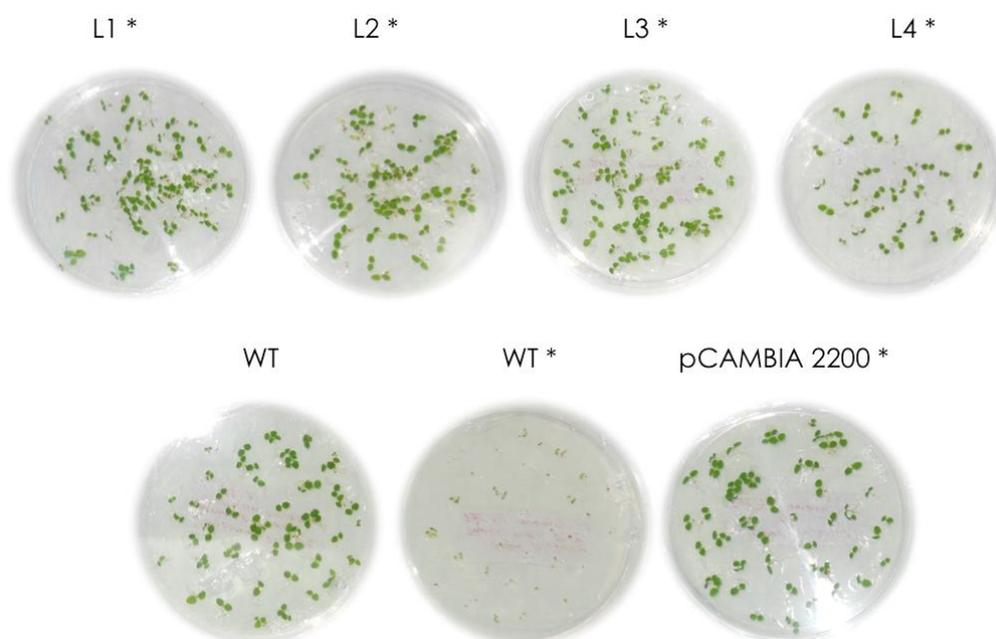


Figura 2.1 Germinación de semillas de tabaco transgénicas generación T2 con el gen *MaRAR1* de plátano. Se muestra semillas de una semana de edad post germinación, donde se observa que las cuatro líneas transgénicas L1-L4 y la que contiene el vector de transformación pCAMBIA 2200 vacío son capaces de crecer en medio MS con 150 mg/l de kanamicina (*) a diferencia del control en donde las plantulas germinaron pero mostraron un fenotipo de hojas blancas. Como control positivo se germinaron semillas de una planta silvestre (WT).

2.3.2 Análisis morfológico de las líneas transgénicas generación T2

Para la caracterización morfológica se evaluó el desarrollo de las líneas transgénicas que sobre-expresan el gen *MaRAR1* con un promotor constitutivo 35S, observando que las plantas de las líneas L2, L3 y L4 se desarrollaron de manera muy similar al control WT a diferencia de la línea L1, la cual mostró un desarrollo más lento (Figura 2.2). Interesantemente esta línea fue la que reportó Martin-Cocom (2014) con un mayor número de copias introducidas al genoma de tabaco en la generación T1, lo que sugiere que el fenotipo observado podría ser resultado de la sobre-expresión de muchas copias del transgen o la posición del transgen en el genoma.

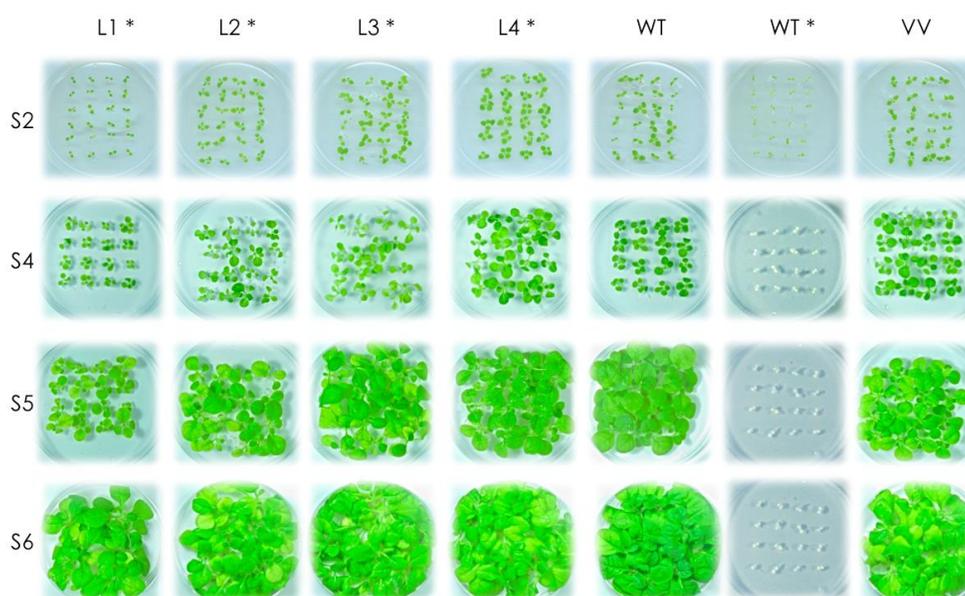


Figura 2.2 Evaluación morfológica del crecimiento de plantas transgénicas generación T2 que sobre-expresan al gen *MaRAR1* de plátano. El monitoreo del crecimiento se realizó durante las 2, 4, 5 y 6 semanas posterior a su germinación. La línea L1 exhibió un menor crecimiento en comparación con las otras líneas transgénicas y el control WT crecido en medio sin antibiótico. Como control negativo la línea WT fue incapaz de crecer en medio selectivo (*kanamicina 150 mg/L) y la línea transformada con el vector de expresión pCAMBIA 2200 vacío demuestra que el fenotipo observado es resultado de la sobre-expresión del gen *MaRAR1*. Este resultado fue realizado por triplicado demostrando ser reproducible.

Por su parte la evaluación del crecimiento radicular de las cuatro líneas de tabaco mostró una diferencia significativa en la línea L1 que corresponde a la línea que mayor número de copias presentó en la generación T1 en comparación con el control WT (Figura 2.3); Recientemente se reportó que el silenciamiento génico de un gen *RAR1* en soya

(*GmRAR1*) generó cambios en la coloración del tallo durante el desarrollo de la planta a diferencia del control WT (Fu *et al.*, 2009). En cuanto a la sobre-expresión este fenotipo ha sido observado en plantas de tabaco donde el uso de promotores constitutivos pueden tener un efecto en el crecimiento y desarrollo de la planta (Li *et al.*, 2013).

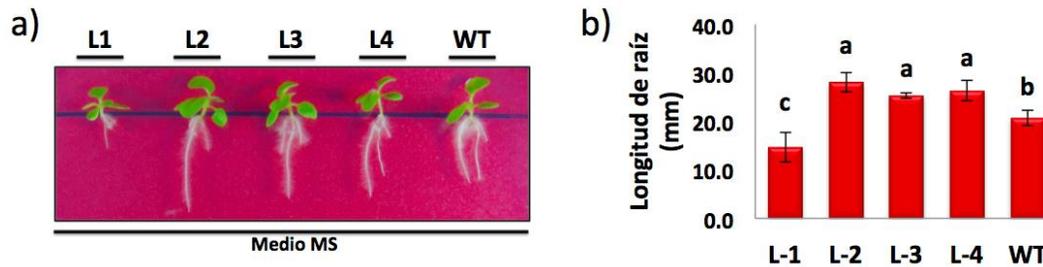


Figura 2.3 Medición del crecimiento radicular de las cuatro líneas transgénicas de tabaco que sobre-expresan el gen *MaRAR1*. a) Las líneas L2, L3 y L4 desarrollaron las raíces de manera similar al el control WT, siendo la línea L1 la que desarrolló más lento mostrando diferencia significativa. b) El crecimiento observado fue más evidente en la línea L1 que fue la que desarrollo raíces en menor cantidad. Se reportan los datos con una \pm desviación estándar ($n=3$). Diferentes letras indican diferencia significativa ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza.

Las plantas de un mes de edad mantenidas *in vitro* fueron trasplantadas en macetas y crecidas en el cuarto de cultivo (Figura 2.4), se monitoreó su crecimiento durante seis semanas donde las plantas mantuvieron un crecimiento homogéneo entre los 16-18 cm, fue en la séptima semana donde una de las líneas transgénicas (L2) comenzó a desarrollar la inflorescencia en forma de panícula de forma temprana a diferencia de la línea WT, donde este evento ocurre en las semanas 12-14 (Wang *et al.*, 2012).

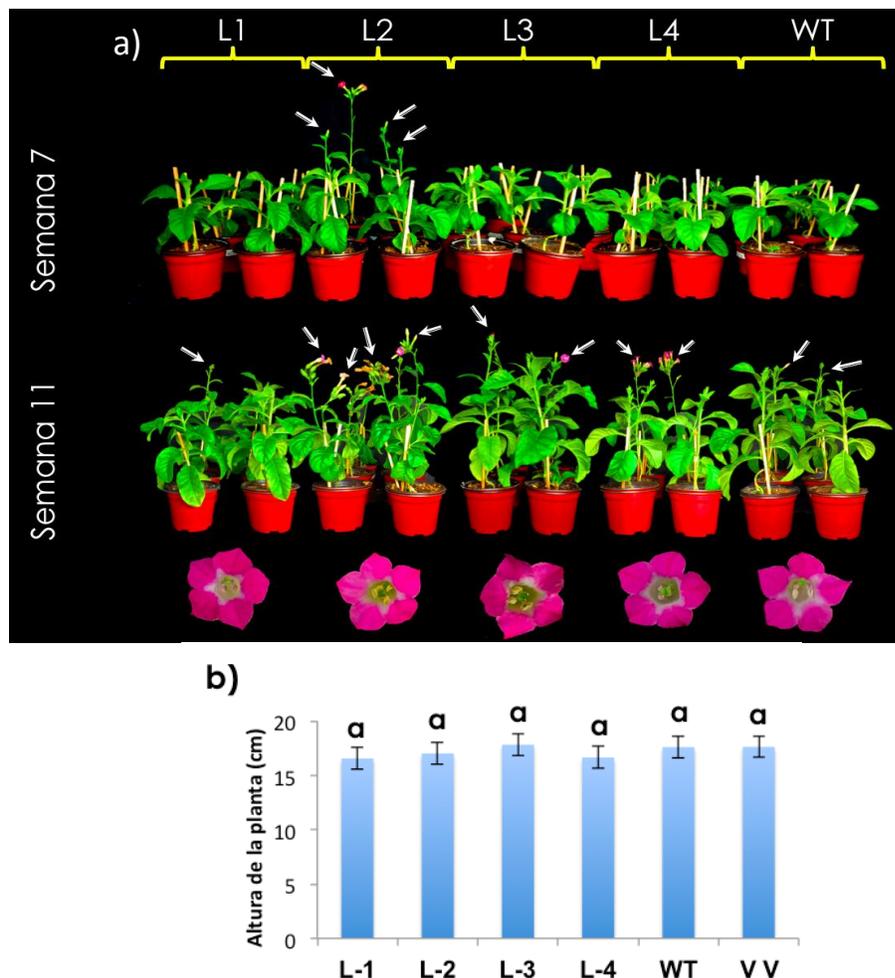


Figura 2.4 Características fenotípicas de las plantas transgénicas generación T2. a) Plantas evaluadas en la semana 7 y 11 de edad. b) La altura de las plantas L1, L2, L3 y L4 de 7 semanas de edad mantuvieron un desarrollo muy semejante oscilando entre los 16 a 18 cm de altura una floración temprana fue presentada en la línea L2 (flechas blancas). Se reportan los datos con una \pm desviación estándar ($n=6$). Diferentes letras indican diferencia significativa (ANOVA, LSD de Fisher con 95% de confianza).

2.3.3 Perfiles de los ácidos nucleicos aislados de las líneas transgénicas de tabaco generación T2

Los resultados del aislamiento de ADN genómico de tabaco mostraron bandas íntegras, con una concentración de $3.60 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ observándose que no se encuentra degradado. Por otra parte, en el ARN aislado se pudieron observar las bandas de ARN ribosomal 25S y 18S íntegras, indicando que los ARN mensajeros no están degradados siendo útiles para realizar la síntesis de ADNc. La concentración fue de $1.6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, ambas muestras

obtuvieron una pureza dentro de los parámetros requeridos de 1.8 y 2 (Figura 2.5).

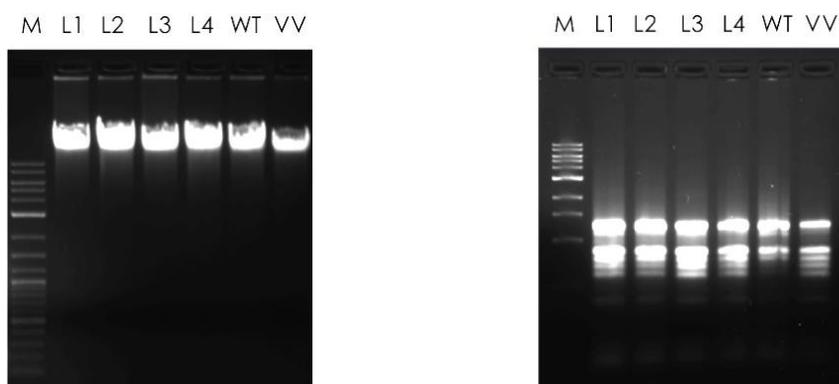


Figura 2.5 Electroforesis en gel al 0.8% de ácidos nucleicos de las plantas transgénicas de tabaco a) ADN genómico de las cuatro líneas transgénicas de tabaco (L1-L4, control silvestre (WT) y vector vacío (VV), b) ARN ribosomal de las cuatro líneas transgénicas de tabaco (L1-L4, control silvestre (WT) y vector vacío (VV).

2.3.4 Análisis de la presencia de *MaRAR1* en las líneas transgénicas de tabaco generación T2 por PCR

Las hojas de plantas de tabaco (un mes de edad) fueron tomadas como muestra para la extracción de ADN, el cual fue utilizado como plantilla para la reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos que amplifican 240 pb de la región interna del gen *MaRAR1* (Cuadro 2.1). Se puede observar la amplificación correspondiente al gen *MaRAR1* en las cuatro líneas transgénicas seleccionadas (L1-L4) a diferencia de una planta silvestre utilizada como control negativo (Figura 2.6). Estos resultados son consistentes con los reportados por Martin-Cocom (2014) correspondientes a la generación T1 de las líneas transgénicas. Por lo que podemos concluir que la generación T2 de estas plantas mantienen al transgen *MaRAR1* de plátano.



Figura 2.6 Análisis de PCR de las cuatro líneas transgénicas de la generación T2 de tabaco *N. tabacum* (L1-L4). Se observó la amplificación de un fragmento de 240 pb en las líneas L1-L4 a diferencia de la línea WT (sin transformar). El control positivo (+) del plásmido pCAMBIA 2200 35S::MaRAR1::NOS correspondió al peso esperado. El control negativo (-) descarta contaminación en la reacción.

2.3.5 Análisis del número de copias del transgen *MaRAR1* en las líneas transgénicas de tabaco generación T2

El ensayo de Southern blot, se realizó en una planta correspondiente a cada línea experimental (L1-L4) con sus controles respectivamente, se utilizó 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 L1, una copia en la línea L2, tres copias en la línea L3 y dos copias en la línea L4. 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 (Figura 2.7). Este resultado es consistente a lo reportado por Martin-Cocom (2014) en la generación T1, indicando que la herencia de *MaRAR1* en la generación T2 fue estable.

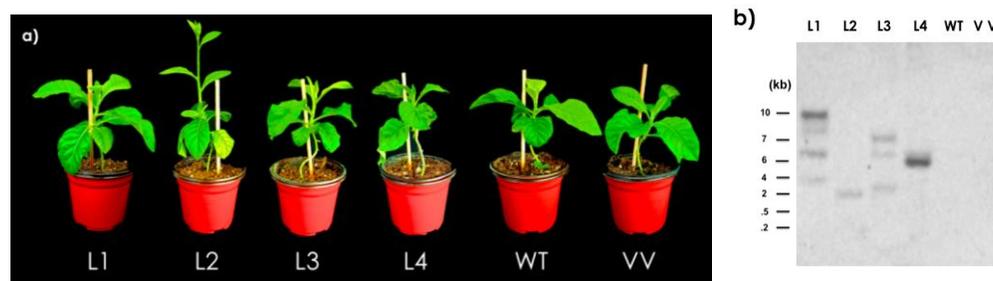


Figura 2.7 Southern blot de cuatro líneas transgénicas de tabaco generación T2 que contienen al gen *MaRAR1* de plátano. a) Líneas transgénicas T2 de seis semanas de edad utilizadas para realizar el Southern blot . b) Southern blot de las líneas L1 -L4 utilizando como sonda un fragmento de 240 pb del gen de *MaRAR1*; WT, línea de tabaco silvestre como control negativo; VV, línea de tabaco transformada con el vector vacío (pCAMBIA 2200 sin la construcción experimental) como control negativo.

2.3.6 Evaluación de la expresión de *MaRAR1* en líneas transgénicas de la generación T2 por RT-PCR de punto final

La expresión de *MaRAR1* de plátano fue observada en las líneas transgénicas de tabaco de la generación T2, descartando silenciamiento génico debido a la presencia del gen endógeno de *NtRAR1* de tabaco. El control positivo de *NtEF1 α* se observó en todas las líneas incluido el control negativo de la WT. Por su parte, se puede observar un fragmento

de 240 pb correspondiente a *MaRAR1* en las cuatro líneas transgénicas de tabaco de la generación T2 a diferencia del control negativo con la planta WT (Figura 3.1).

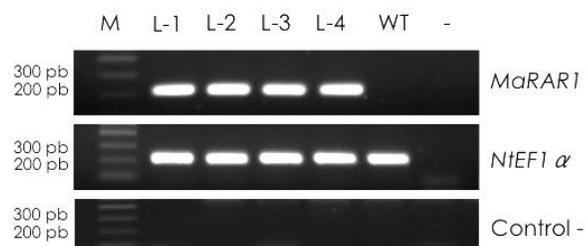


Figura 2.8 Amplificación por medio de RT-PCR del gen *MaRAR1* en las líneas transgénicas de la generación T2 de *Nicotiana tabacum* cv. petit havana SR1 (L1-L4). M, marcador de peso molecular 2-Log (New England Biolabs), carriles L1 a L4, se observó un amplicón de 240 pb correspondiente a un fragmento interno del gen *MaRAR1*. Como control positivo de la reacción se amplificó un fragmento interno del gen *NtEF1α* de tabaco. El control negativo corresponde a la planta WT y H₂O para descartar contaminación. Se muestra el control negativo de la síntesis de cDNA RT-.

2.3.7 Evaluación de la expresión de *MaRAR1* en las líneas transgénicas generación T2 por RT-PCR en tiempo real

En la evaluación de expresión mediante qRT-PCR, se observó que el gen *MaRAR1* se expresa en todas las líneas transgénicas, excepto en la WT, que no posee el transgen. El máximo valor de expresión de *MaRAR1* se observa en la línea L2 y el menor en L1 y L4. Es interesante notar que la máxima expresión de *MaRAR1* se da en la línea transgénica que contiene una sola copia del transgen insertado en su genoma (Figura 2.7b), mientras que en las que tiene más copias, la expresión es menor. Esto sugiere que existe un mecanismo de silenciamiento activo en las plantas transgénicas de tabaco, tal como se ha reportado en (Hoobs, 1990).

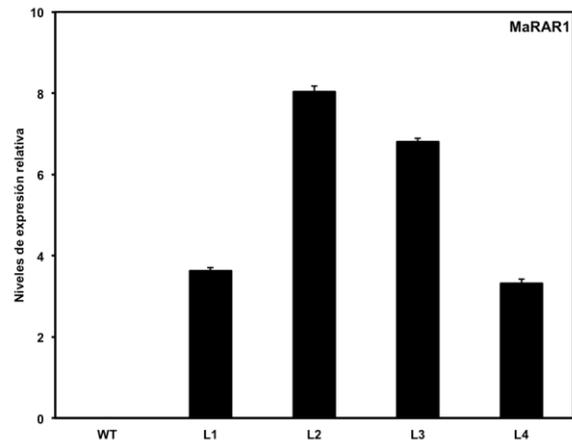


Figura 2.9 qRT-PCR de MaRAR1 en las cuatro líneas transgénicas de tabaco. Los niveles de expresión fueron evaluados en plantas de 6 semanas de edad. Las barras representan \pm SD de tres replicas técnicas. el experimento fue realizado por duplicado obteniéndose resultados similares.

2.4 DISCUSIÓN

Recientemente el ADN complementario de un gen tipo *RAR1* fue aislado en plátano cv. Tuu gia, el cual es resistente a Sigatoka negra, la enfermedad foliar más devastadora de este cultivo causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Este gen se nombró como *MaRAR1*. Presentó un tamaño de 648 pb, y su expresión se observó en tejidos vegetativos y reproductivos de la planta (Canul, 2010), tal como se observó en soya (Fu *et al.*, 2009) y trigo (Wang *et al.*, 2017). En soya, se observó la expresión de *GmRAR1* en las raíces, tallos, cotiledones, hojas y flores, mientras que en el trigo, se detectó la expresión de *TaRAR1* en las hojas de las plántulas, raíces, tallos, hojas bandera, flósculos y espiguillas. Estos resultados son consistentes con el patrón de expresión de *MaRAR1* observado en tejidos vegetativos y reproductivos (Canul, 2010). La expresión de *MaRAR1* concuerda con el hecho de que los genes de una sola copia en angiospermas generalmente se expresan a niveles más altos y en más tejidos que los genes de copias múltiples, y a menudo participan en funciones esenciales del metabolismo basal (De Smet *et al.*, 2013).

La secuencia del genoma de *M. acuminata* ssp. *malaccensis* reveló un gen del tipo *RAR1*, cuya proteína deducida es muy similar a otras proteínas *RAR1* de plantas. Contiene residuos de unión a zinc (cisteínas e histidinas) (Fig. 1.10), identificados previamente en cebada *HvRAR1* (Shirasu *et al.*, 1999) y *A. thaliana* *AtRAR1* (Heise *et al.*, 2007). Se identificaron en *MaRAR1* los dominios característicos de esta proteína: CHORDI, CCCH y CHORDII. Del mismo modo, los sitios de unión *SGT1* y *HSP90* (Zhang *et al.*, 2010), se encontraron en este gen de plátano, lo que permitió la construcción de un modelo tridimensional (Martin- Cocom, 2014). Por lo tanto, es muy probable que *MaRAR1* pueda interactuar con los homólogos *HSP90* y *SGT1* en plátano para formar un complejo *MaRAR1-MaHSP90-MaSGT1* que establezca el estado de reconocimiento competente de las proteínas *NBS-LRR*, similar al complejo correspondiente en *A. thaliana* (Hubert, 2003; Takahashi *et al.*, 2003; Kadota *et al.*, 2010, Kadota y Shirasu, 2012). En el presente trabajo de tesis se detectaron nueve genes *MaHSP90* y tres genes *MaSGT1* en el genoma del banano (datos no mostrados), lo que indica que contiene los componentes del complejo *R-H-S*, pero solamente una copia de *RAR1*, lo que es consistente con los resultados de estudios previos en arroz (Goff *et al.*, 2002) y *A. thaliana* (Muskett *et al.*,

2002). Esto nos sugiere el papel central y limitante de esta co-chaperona en los diferentes mecanismos de respuesta a estrés. De hecho, recientes análisis genómicos de genes de copia única revelaron que RAR1 está presente como una copia única en numerosas gimnospermas y angiospermas (Duarte *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017), lo que sugiere una falta de duplicación y eventos de diversificación durante la evolución de este gen. Es importante destacar que, de forma similar a las proteínas codificadas por la mayoría de los genes de copia única analizados en estos estudios, RAR1 presenta actividades de unión.

Con la finalidad de verificar si MaRAR1 ejerce la misma función en la inmunidad de plantas que sus ortólogos estudiados en otras especies, en nuestro grupo de trabajo se transformaron plantas en tabaco (*Nicotiana tabacum*) con este gen. La expresión de *MaRAR1* estuvo bajo el control del promotor CaMV35S y el terminador NOS (Nopalina sintasa, por sus siglas en inglés). Se obtuvieron cuatro líneas transgénicas (T1) que sobre expresaron el transgen (Martin-Cocom, 2014).

En este capítulo se presenta la evaluación morfológica y molecular de las cuatro líneas de plantas de tabaco de la generación T2, que presentaron al gen *MaRAR1* de plátano. La primera observación de la naturaleza transgénica de estas plantas se observó en el momento de su germinación, donde las semillas fueron capaces de crecer en medio MS + kanamicina (150 mg/L), a diferencia del control silvestre (WT), en donde se observó un fenotipo de hojas blancas (Figura 2.1). Esto se debe a que las líneas transformadas son capaces de crecer en presencia de niveles tóxicos de kanamicina para una célula que no contiene el gen de selección que codifica para la enzima Neomicina fosfotransferasa (NPTII; Conner *et al.*, 1991).

El crecimiento de las plántulas fue monitoreado a partir de la segunda semana de la germinación, observándose un crecimiento de las líneas L2, L3 y L4 muy similar al control WT, no obstante, la línea L1 exhibió un crecimiento inferior mostrando diferencia significativa con los controles (Figura 2.2); sin embargo, en el fenotipo de las plantas adultas no hubieron diferencias en el desarrollo. Este fenotipo ha sido observado en las etapas iniciales del desarrollo en plantas de tabaco transgénicas que sobre-expresan ciertos genes, como el caso de una expansina de trigo, bajo la regulación de un promotor constitutivo fuerte, ya que se observó que repercute sobre el desarrollo de la planta, por lo

que se recomienda el uso de un promotor inducible (Li *et al.*, 2013). Otra explicación para el fenotipo observado en la línea L1, se puede explicar en función del número de eventos de transformación de *MaRAR1* en su genoma, ya que fue la línea que mayor copias presentó (Figura 2.3). Se ha reportado en tabaco, usando el gen reportero GUS, que el número de copias de inserción de T-DNA, la posición y la metilación tienen un efecto sobre la expresión del gen reportero y sobre el desarrollo de la planta (Hobbs *et al.*, 1990). En plantas RAR1 está presente como copia única en el genoma, como en plátano, tabaco trigo, maíz, cebada y soya.

Se observó en la línea L2 que tuvo una floración precoz (siete semanas; Figura 2.3), cuando normalmente existen reportes que indican que la floración se lleva a cabo entre las 12-14 semanas (Wang *et al.*, 2012). Esta planta fue en donde se encontró sólo una copia del gen *MaRAR1* y en una de las que mayor expresión tuvo de este gen. Es interesante que se ha reportado un vínculo entre estrés y floración. El caso de la sobreexpresión de PtGT1 (putative poplar glycosyltransferase) en tabaco incrementa el contenido de lignina, ocasionando a su vez una floración temprana (Wang *et al.*, 2012). Otro caso es el vínculo entre el estrés hídrico y la floración encontrado en *Mangifera indica* L (Bally *et al.*, 1999). Llama la atención que en el análisis de los genes vecinos se encontró un factor de transcripción (FT ASR1; Figura 3.8) relacionado en la respuesta al ácido abscísico, que involucra procesos de desarrollo, crecimiento y floración. Sería interesante indagar más en cuál la relación entre RAR1 y floración. Desde el punto de vista biotecnológico, sería de suma importancia que la sobre expresión de *MaRAR1* pudiera inducir una floración temprana y a su vez aminorar los tiempos de producción de frutos, porque tendría interesantes aplicaciones en la industria de producción agrícola.

Se evaluó la integración del gen *MaRAR1* en la generación T2 por Southern blot y se comparó el resultado con el previamente obtenido por Martin Cocom (2014). Se observó un patrón de integración y un número de copias similar (Figura 2.7). Las líneas L1 y L3 tuvieron el mayor número de copias, mientras que la L2 sólo una. En el caso de la L4, por la intensidad de la banda, y por el nivel de expresión de *MaRAR1*, es probable que tenga más de una copia. Estos resultados nos confirman que efectivamente estas son cuatro líneas transgénicas diferentes.

Para la caracterización de estas plantas de tabaco, se evaluó la expresión de MaRAR1 por RT-PCR de punto final, para verificar que el transgen se esté expresando (Figura 2.9) y posteriormente por qRT-PCR, para medir los niveles de expresión en cada línea de tabaco de la generación T2. Como se puede observar, en la planta WT no se encontró la expresión del transgen, como sería de esperar (Figura 2.10). Con respecto a las plantas transgénicas de tabaco, las líneas L1 y L4 fueron en las que menor nivel de expresión de *MaRAR1* se encontró, en comparación con las líneas L2 y L3. Es notable que la línea L2, la de mayor expresión, fue la que tuvo una única copia de MaRAR1, mientras que en la L1, en la que mayor número de copias hay, se observa menor expresión. Este fenómeno se ha reportado en plantas de tabaco (Hobbs *et al.*, 1990).

CAPÍTULO III

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DE *MaRAR1* EN LA TOLERANCIA CONTRA EL ESTRÉS BIÓTICO

3.1 INTRODUCCIÓN

El sistema inmune de las plantas está constituido por una inmunidad innata que actúa de dos formas fundamentales: la primera fase consiste en el reconocimiento de PAMPs mediante receptores tipo cinasa que reconocen proteínas PRR que se encuentran anclados en la membrana de las células, cuando estos receptores son activados se desencadena una cascada de señalización que induce un mecanismo de defensa llamado inmunidad activada por PAMPs, lo que promueve que factores de transcripción induzcan la expresión de genes de defensa que eviten la infección del patógeno. No obstante, cierto tipo de patógenos han logrado ser capaces de producir y liberar moléculas efectoras con el objetivo de inhibir este tipo de resistencia y causar la susceptibilidad de la planta. Por tal motivo las plantas han desarrollado mecanismos de defensa que pueden reconocer moléculas efectoras mediante proteínas de resistencia (R) tales como la familia de proteínas NB-LRR, estas proteínas son un punto crucial para activar de manera directa o indirecta un mecanismo de muerte celular programada llamado HR que se da en el sitio de infección de manera muy localizada. A esta segunda barrera de defensa innata de la planta se le denomina inmunidad activada por efectores (Chisholm *et al.*, 2006).

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 este tipo de proteínas R requieren de otras proteínas que permitan estabilizar su actividad, una de ellas es la proteína RAR1 (Shirasu, 2009).

El gen *RAR1* fue identificado por primera vez por su papel esencial en la función de un subconjunto de los genes *Mla* que pertenecen a la familia NBS-LRR y que confieren resistencia al patógeno *Blumeria graminis* en cebada. Este gen codifica para una proteína

co-chaperona que posee dos módulos ricos en repeticiones de histidinas y cisteínas (CHORD1 y CHORD2) unidos a Zinc²⁺, así como un motivo CCCH que posee tres cisteínas y una histidina (Bhaskar *et al.*, 2008; Shirasu, 2009; Zhang *et al.*, 2010).

En varios estudios se ha demostrado que RAR1 juega un papel muy importante en la regulación de proteínas R, interactuando con otro grupo de chaperonas HSP90 y SGT1 con las que forma un complejo que permite estabilizar los cambios conformacionales que las proteínas R presentan cuando detectan a algún patógeno, operando como receptores inmunes a nivel de ensamblaje y mantenimiento de proteínas (Kadota, *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Por su parte mutaciones realizadas a este gen sugieren que también juega un papel muy importante en la defensa basal de la planta, esto ha sido demostrado en *Arabidopsis* donde mutantes *rar1* son susceptibles a patógenos de tipo bacteriano y fúngico (Muskett *et al.*, 2002). En cuando al silenciamiento de este gen, recientemente Fu y colaboradores en el (2009) reportaron que el silenciamiento de un gen ortólogo de *RAR1* en soya genera susceptibilidad al virus del mosaico en la planta y a su vez cambios en el desarrollo de la misma. Por el contrario, la sobre-expresión del gen *OsRAR1* en arroz dio como resultado una mayor resistencia basal hacia el hongo *Magnaporthe oryzae* sin alterar el fenotipo de la planta (Young *et al.*, 2013). Existe una patente del gen *OsRAR1* de arroz que codifica para una proteína RAR1 involucrada en la resistencia (patente o. US7098378B2), la sobreexpresión de este gen reporto la resistencia al siguiente grupo de patógenos; *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizoctonia* spp., *Magnaporthe* spp., *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Sclerotinia* spp. La resistencia en organismos que desarrollan estilos de vida de tipo biótrofo, hemibiótrofo y necrótrofo con un mismo gen, indica que probablemente estos mecanismos de defensa tienen un punto de convergencia que le otorga a esta secuencia un gran potencial biotecnológico para generar plantas resistentes a otras especies de patógenos.

En nuestro laboratorio un gen tipo *RAR1* fue aislado de una variedad de plátano resistente a diferentes enfermedades y fue nombrado *MaRAR1* (Canul, 2010). Posteriormente Martin-Cocom en el 2014 logró obtener cuatro líneas transgénicas de *Nicotiana tabacum* que sobre expresan el gen *MaRAR1* de plátano obteniendo las líneas hasta la generación T1.

El objetivo de este capítulo de investigación fue evaluar la función del gen MaRAR1 y su relación en la tolerancia al estrés biótico, para ello se hizo uso de las plantas transgénicas de la generación T2 previamente evaluadas en el presente trabajo, Los resultados obtenidos demostraron que la sobreexpresión de este gen en plantas de tabaco transgénicas (T2) mejoró la resistencia al patógeno bacteriano *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. La nueva información obtenida en este trabajo ha ampliado nuestro conocimiento de RAR1 en la familia Musaceae y ha proporcionado herramientas útiles para mejorar la resistencia a enfermedades en el plátano y otros cultivos.

Interesantemente se encontró que *MaRAR1* estaba rodeado de muchos genes que codifican para factores de transcripción y otras genes cuyos homólogos en *Arabidopsis thaliana* y el arroz se han visto implicados en las respuestas de estrés biótico o abiótico. Por lo tanto, el potencial biotecnológico de este gen abre un panorama para ser utilizado con la finalidad de incrementar los niveles de resistencia de plátano u otro cultivo comercial contra el ataque de patógenos, de esta manera disminuir los costos económicos para el control de las enfermedades como la Sigatoka negra, el mal de Panamá y el moko que actualmente son enfermedades devastadoras para este cultivo, así como contribuir al cuidado del ambiente disminuyendo el uso extensivo de pesticidas.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado para este trabajo consistió en plantas de tabaco WT silvestres (*Nicotiana tabacum* L cv Petite havana SR1) y plantas que transgénicas que sobre-expresan el transgen *MaRAR1* generación T2 (L1-L4). Previamente Las semillas de tabaco fueron germinadas en cajas petri con medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con sacarosa 30 g/L y 150 mg/L de kanamicina como antibiótico de selección; Las semillas de la línea WT se germinaron en medio MS sin antibiótico y como control negativo también se germinaron en MS con antibiótico. Las cajas fueron mantenidas a 25 °C con fotoperiodo de 16 hrs luz y 8 hrs oscuridad. Una vez obtenidas plantas enraizadas se trasplantaron en magentas con 50 ml de medio MS que contenían 75 mg/L de kanamicina, una vez que las plantas crecieron durante un periodo de 6 semanas fueron trasplantadas en sustrato de una mezcla comercial “peat moss” y perlita (Pro-Mix), a una temperatura ambiente de 25 °C ± 2 °C bajo un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. La intensidad lumínica (75 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) fue suministrada con lámparas Philips T5HO. Una vez transcurrido 6 semanas en condiciones *ex vitro* las plantas fueron utilizadas en el ensayo de resistencia.

3.2.2 Verificación de la cepa *P. syringae* pv. *tabaci*

La cepa de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* fue proporcionada por el Dr. Mario Rocha del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se realizó la reactivación de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* en medio King (King *et al.*, 1954) + 10 mg/L de cloranfenicol y se incubó a 30 °C por dos días. Mediante PCR se verificó la expresión de los genes *tbIA* y *tabA* que codifican para proteínas (tabtoxinas) de avirulencia de esta bacteria con oligonucleótidos ya reportados por Lydon y Patterson en el 2001 (Cuadro 3.3), se tomó como muestra el ADN de la bacteria según el protocolo descrito por Chen y Kuo (1993). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 1. Desnaturalización inicial de 95 °C por 10 min; 2. Desnaturalización: 94 °C por 30 segundos; 3. Alineamiento: 58 °C por 30 segundos; 4. Extensión: 72 °C durante 30 segundos; repetición del paso 2-4 por 10 veces; 6. Extensión final: 72 °C por 5 min.

Cuadro 3.1 Oligonucleótidos específicos para la amplificación de genes de *P. syringae* pv. *tabaci*

Secuencia	Secuencia de los oligonucleótidos reportados	
<i>tblA</i>	Sentido	5' CTGGT- CACTGCGCTAGGC 3'
	Antisentido	5' CGTGATTGACT- CAGGGCACTAG 3'
<i>tabA</i>	Sentido	5' GTGCCAATATCCGAAAGCTT 3'
	Antisentido	5' ACTTGTCAAAGTTCTCGCAC 3'

Lydon y Patterson, 2001

3.2.3 Evaluación de la curva de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Para evaluar la curva de crecimiento de *P. syringae* pv *tabaci* y poder realizar el conteo de unidades formadoras de colonia por mL (cfu/mL) se inocularon hojas de tabaco de plantas silvestres de seis semanas de edad, esto con el objetivo de tener una concentración de cfu/ml de referencia para poder evaluar la resistencia en las plantas transgénicas (L1-L4) tomando como control a tabaco WT. La recuperación de las bacterias del tejido infectado consistirá en obtener tejido de la hoja previamente infectada con la ayuda de un sacabocado de 1 cm de diámetro, colocándose en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se agregó 500 μ L de H₂O destilada estéril para posteriormente macerar el tejido con un micropistilo. Se colectó 100 μ L del sobrenadante y se realizaron diluciones seriadas de 0.1 hasta 1×10^{-8} , posteriormente se plaqueó 100 μ L del contenido en cajas petri con medio King con 10 mg/L de cloranfenicol como agente selectivo. Las cajas se incubaron a 30 °C por dos días, por último se realizó el conteo de UFC de todos los ensayos.

Como control de la infección se realizará el conteo de UFC/mL para los ensayos de resistencia en plantas silvestres (WT) probando las siguientes diluciones: 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , que ya han sido previamente reportadas para tabaco por Thilmony *et al*, 1995. Esto con el objetivo de obtener un fenotipo de infección con la dilución mínima en las plantas WT que nos permita evaluar la resistencia con respecto a las líneas transgénicas (L1-L4). Para ello se realizó una curva de crecimiento en cuanto a la infección con *P. syringae* con las plantas WT donde se evaluaron los días 0, 1, 2, 3 y 4 en las plantas

infectadas considerando tres plantas (réplicas) por día, haciendo un total de 30 plantas a evaluar para este ensayo. La inoculación se realizará en tres sectores de la 3er hoja nueva de cada planta, como control + de la infección se inoculará *P. syringae* 1×10^6 y como control - de la infección se inoculó 10 mM MgCl₂. Las muestras se colectaron en los días ya mencionados, tomando como muestras representativas tres círculos de 1.2 cm de diámetro para poder hacer la recuperación de bacterias de las hojas y su posterior análisis. Este ensayo es esencial para ya tener una concentración de UFC/cm² conocida en la planta WT para ser tomada como referencia al momento de evaluar las líneas transgénicas (L1-L4). Durante la infección las plantas fueron mantenidas a 27 °C \pm 1 °C con 100% de humedad relativa con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad (Thilmony *et al.*, 1995; Taguchi *et al.*, 2006).

3.2.4 Ensayo de resistencia de las líneas transgénicas generación T2 ante la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

La inoculación del patógeno en las plantas de tabaco se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Thilmony *et al.*, 1995. *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* fue crecida en medio King adicionado con cloranfenicol 10 µg/mL. Las células bacterianas en suspensión (1×10^6 cfu/mL) fueron infiltradas delicadamente usando una jeringa de insulina en la zona abaxial de las hojas de tabaco correspondientes a las líneas transgénicas (L1-L4) y el control silvestre de seis semanas de edad. El crecimiento bacteriano fue medido a los dos días posterior a la inoculación. Para el ensayo, se emplearon cinco réplicas biológicas de cada línea transgénica y la WT. El diseño experimental empleado fue completamente al azar y realizado por duplicado en experimentos independientes. Las plantas inoculadas fueron mantenidas a 26 °C \pm 1 °C en un cuarto de crecimiento bajo un fotoperiodo de 16 h luz.

3.2.5 Evaluación de la viabilidad celular y la producción de H₂O₂ a las líneas transgénicas de tabaco durante la interacción con *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Como parte de la evaluación de la resistencia de las plantas transgénicas (L1-L4) ante *P. syringae* pv. *tabaci*, se evaluaron parámetros fisiológicos para observar el daño de la infección de manera cuantitativa, que nos permitirá ver si existe algún cambio en el daño

de la membrana celular de las plantas WT infectadas cn respecto a las transgénicas (L1-L4).

La tinción con azul de tripano se empleó para observar el daño en membrana y la tinción con diaminobenzidina (DAB) para la detección de H₂O₂, estos ensayos fueron realizados según lo descrito por Peterhänsel *et al.*,1997 y Thordal-Christensen *et al.* 1997 respectivamente. Las muestras fueron visualizadas con un estereomicroscopio Stemi DV4 (Carl Zeiss) y las imágenes fueron capturadas con una cámara AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss).

3.2.7 Evaluación de la expresión de genes marcadores *NtPR1* y *NtPR3* en las líneas transgénicas por RT-PCR de punto final

Para evaluar la expresión de genes marcadores del respuesta de resistencia al estrés biótico se tomó una muestra del ADNc previamente sintetizado de las líneas transgénicas de tabaco, siguiéndose las mismas condiciones que se emplearon para ver la expresión de *MaRAR1*. Los oligonucleótidos empleados amplifican una región interna de los genes *NtPR1* y *NtPR3* de tabaco (Cuadro 3.2). Como control positivo de la reacción se amplificó al gen *NtEF1 α* y como negativos se empleó ADNc de tabaco WT y ADNc, que no contiene retrotranscriptasa por lo que no debería observarse amplificación.

Cuadro 3.2 Oligonucleótidos específicos para la amplificación de genes marcadores

Secuencia	Secuencia de los oligonucleótidos reportados	
<i>NtPR1</i>	Sentido	5' CATAACACAGCTCGTGCAGATGTAG 3'
	Antisentido	5' AACCCACCTGAGTATAGTGTCCACAC 3'
<i>NtPR3</i>	Sentido	5' GGTTCTATTGTAACGAGTGAC 3'
	Antisentido	5' TTCTATGTAACGAAGCCTAGC 3'

Lee *et al.*, 2001; Kulye *et al.*, 2012

3.2.6 Evaluación de la expresión de *NtPR1* en las líneas transgénicas generación T2 por RT-PCR en tiempo real

Se evaluó la expresión del gen marcador de resistencia *NbPR1* en las plantas transgénicas de tabaco por qRT-PCR (Power SYBR[®] Green) con los oligonucleótidos NbPR1F y NbPR1R (Cuadro 2.3), siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Los oligonucleótidos NtEF1 α F y NtEF1 α R (Cuadro 2.2) fueron diseñados para amplificar al gen NtEF1 α de tabaco, que fue usado como gen normalizador para evaluar los datos de expresión (Lee *et al.*, 2001). Los niveles de expresión relativa de *NtPR1* fueron evaluados de acuerdo al método de Pfaffl (2001).

Para el ensayo de expresión se tomó 5 μ L de cDNA (por muestra) en un volumen de reacción final de 50 μ L, con 300 nM de oligonucleótido sentido, 300 nM de oligonucleótido antisentido, 10 μ L de master mix 1X y 4.8 μ L de H₂O UP. El programa utilizado fue 95°C 10 min, y 40 ciclos a 95 °C 30 segundos, 55 °C 30 segundos y 72 °C 30 segundos, seguido se evaluó la curva de disociación tomando como referencia una temperatura de 55 °C hasta 95 °C, donde cada 0.3 °C el programa toma los datos para calcular la curva. Para llevar a cabo la qRT-PCR se utilizó el StepOne[™] Real-Time PCR System y el software StepOne Software v 2.3 (Invitrogen/Life Technologies). La qRT-PCR de NbPR1 en las cuatro líneas transgénicas fue realizado por triplicado y el experimento fue hecho por duplicado observándose resultados similares.

3.2.7 Evaluación de la organización genómica de *MaRAR1*

Para poder entender el posible papel que el gen *MaRAR1* desempeña en conjunto con otros genes involucrados en el mecanismo de resistencia de la planta, un fragmento de 314,072 pb localizado en el cromosoma 3 de la secuencia genómica de *Musa acuminata* ssp. *malaccensis* (<http://banana-genome-hub.southgreen.fr>) fue analizado para identificar los genes que rodean a *MaRAR1*. El programa FGENESH (<http://www.sorfberry.com>) fue utilizado para predecir las secuencias codificantes de 20 genes río arriba y río abajo de *MaRAR1*. Las funciones de los 40 genes fue predecida basado en la búsqueda de secuencias similares en las bases de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y TAIR (<https://www.arabidopsis.org>).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Verificación de la cepa *P. syringae* pv. *tabaci*

Como parte de la verificación de la cepa *P. syringae* pv. *tabaci*, se demostró que el cultivo en placa permitió observar colonias redondas aisladas que emiten fluorescencia ante luz UV que es un fenotipo característico de *Pseudomonas* (Figura 3.1a). Por otra parte, la presencia de los genes que codifican para las proteínas de avirulencia (*tbA* y *tbIA*) fueron verificados mediante PCR (Figura 3.1b), los resultados obtenidos fueron consistentes a los reportados por Chen, 1993. Por último el fenotipo observado en las hojas de tabaco infectadas con la bacteria (Figura 3.1d) corresponde a los observados en otros reportes donde agroinfiltran *P. syringae* pv. *tabaci* en tabaco (Thilmony *et al.*, 1995).

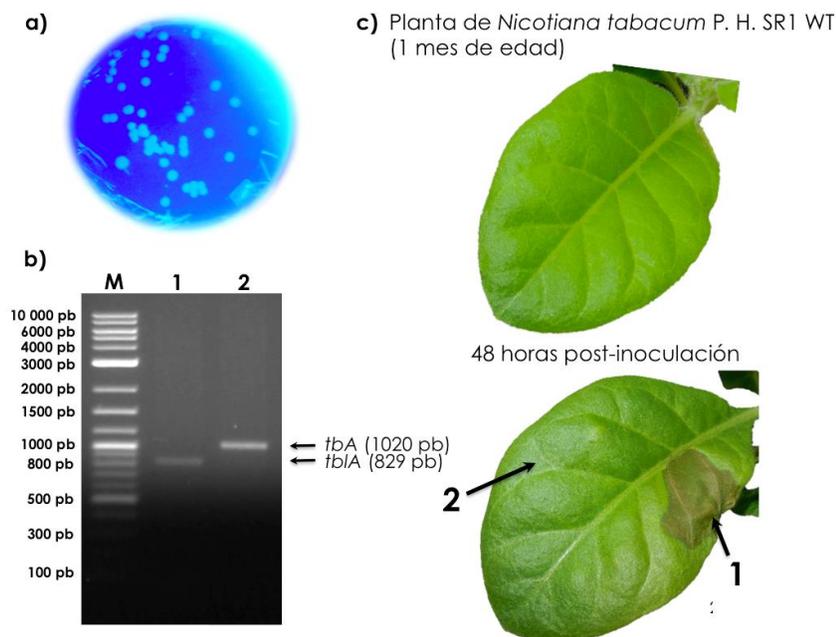


Figura 3.1 Análisis molecular y fenotípico de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. a) La cepa muestra fluorescencia b) PCR de fragmentos internos de genes que codifican para tabtoxinas de avirulencia, c) Necrosis observada en el sitio de infección con *P. syringae* pv. *tabaci* 48 hpi (1) a diferencia del control negativo con H₂O (2).

3.3.3 Evaluación de la curva de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

El conteo de CFU para *P. syringae* pv. *tabaci* se realizó por triplicado reportándose una concentración de 20 millones de UFC/mL, a una densidad óptica de 0.1, el conteo se llevó a cabo en las diluciones 1:100 000 (1×10^6) y en la dilución de 1:1 000 000 (1×10^7) obteniéndose diferencias en el número de UFC evaluadas.

Thilmony *et al.* (1995), reportaron que en las hojas de tabaco infectadas con *Pst* se hace visible la necrosis a partir de un rango de diluciones que van de 1×10^3 a 1×10^8 . En nuestro caso, se realizó una curva dosis-respuesta de infección en las plantas WT a lo largo de ocho días con 1×10^6 CFU. Se observó un incremento en el crecimiento de la bacteria en las hojas de tabaco a partir del segundo día post infección (Figura 3.2b), por lo tanto se usó esta cantidad de bacteria, a los dos días, para evaluar la resistencia de las líneas transgénicas L1-L4 (Figura 3.2c).

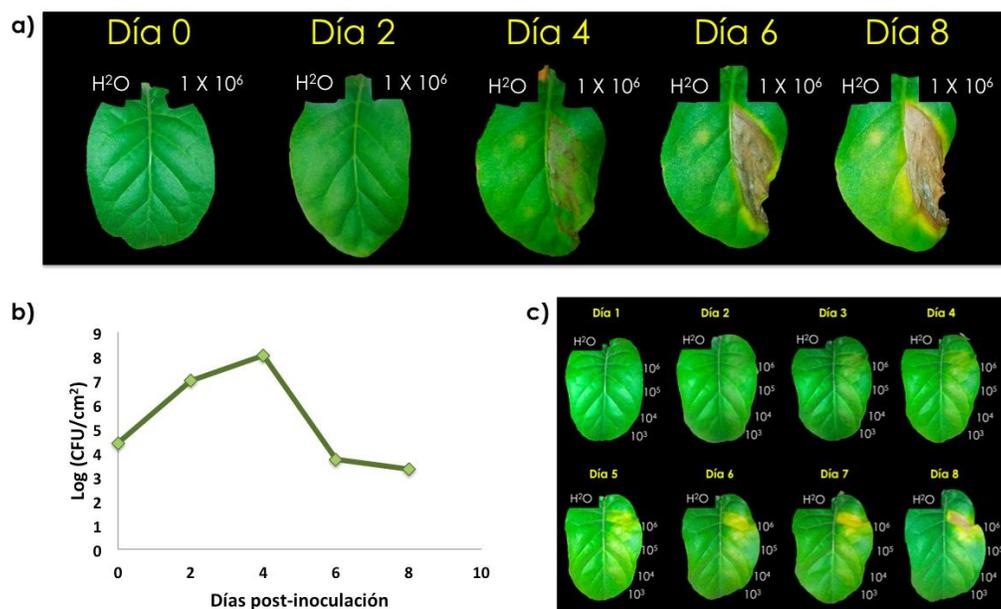


Figura 3.2 Infección de *Nicotiana tabacum* Petit Havana SR1 con *Pseudomonas syringae*. a y b) Plantas de 8 semanas de edad inoculadas con 10^6 UFC/mL obtuvieron su mayor crecimiento al día 4 en donde se observó el inicio de áreas necrosadas en la hoja. c) Infección de tabaco con $10^6, 10^5, 10^4$ y 10^3 UFC/mL de *P. syringae*, los resultados sugieren que 10^5 y 10^4 exhiben un fenotipo de clorosis indicativo de la infección.

3.3.4 Ensayo de resistencia de las líneas transgénicas generación T2 ante la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

Para determinar si la sobre-expresión de *MaRAR1* aumenta la resistencia en estrés biótico de las plantas transgénicas de tabaco, las hojas de cuatro líneas transgénicas de la generación T2 (L1,L2,L3 y L4) y el control silvestres WT fueron infiltrados con *P. syringae* pv. *tabaci* (1×10^6 cfu/mL). Como se puede observar en la Figura 3.3, todas las líneas transgénicas exhibieron una disminución significativa ($P < 0.05$) en el crecimiento de *P. syringae* pv. *tabaci* en comparación con la planta silvestre a los dos días posterior a la inoculación, indicando que *MaRAR1* juega un papel importante en el mecanismo de defensa de tabaco ante esta bacteria.

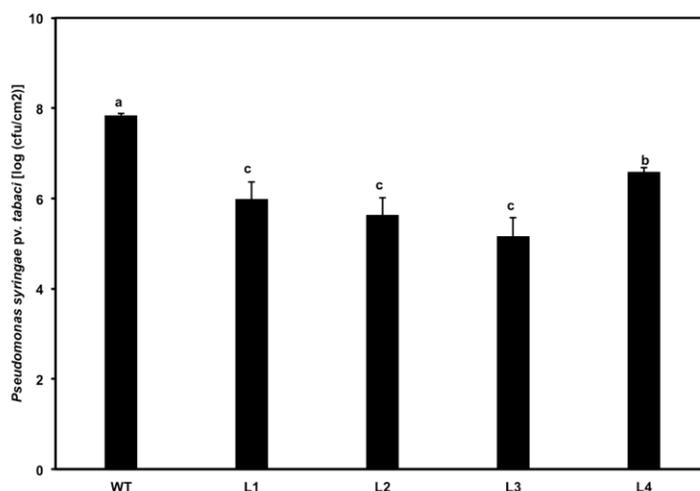


Figura 3.3. Crecimiento de *Pst* en plantas de tabaco transformadas con *MaRAR1*. Se evaluó el crecimiento de *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* en *Nicotiana tabacum* L cv. Petite Havana SR1 (WT) y en las líneas transformadas con *MaRAR1* (L1-L4), de ~6 semanas de edad, a los 2 DPI y con un inóculo de 10^6 CFU mL⁻¹. Los valores representan el promedio ($n=5$) \pm SD, proveniente de un experimento de dos, en los que se obtuvieron resultados similares. Las letras diferentes representan diferencia significativa, con una probabilidad de 95% (F de Fisher).

3.2.5 Evaluación de la viabilidad celular y la producción de H₂O₂ a las líneas transgénicas de tabaco durante la interacción con *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*

El análisis visual de las plantas de tabaco transformadas con *MaRAR1* se llevó a cabo en plantas de seis semanas de edad debido a que una línea transgénica (L2) presentó de manera temprana el desarrollo de la inflorescencia (Figura 2.4) y para evitar que este evento de desarrollo influyera en el ensayo de resistencia este se llevó a cabo dos semanas antes a lo ya establecido en el control WT que fueron 8 semanas. Se observó que las cuatro líneas transgénicas (L1-L4) fueron más resistentes a la infección con *Pst*, debido a que se observó un mayor daño en la WT (Figura 3.4a). De igual manera se midió la viabilidad celular y la cantidad de peróxido de hidrógeno generado en las hojas a los 2 días posteriores a la inoculación. Como se aprecia en la figura 3.4b y c, las plantas con menos viabilidad y mayor producción de peróxido; es decir, la que mayor daño sufrió fue la WT, en comparación con las cuatro líneas transgénicas, en las que se observó una menor tinción de Azul de tripano y DAB. Sin embargo, las hojas que presentaron mayor muerte celular, después de la WT, fueron las de la L4 y las menos dañadas fueron los de la L2. Es decir, existe una correlación positiva entre la expresión de *MaRAR1* y la resistencia a *Pst*. Estos datos son consistentes al resultado obtenido en el conteo de cfu/mL (Figura 3.3).

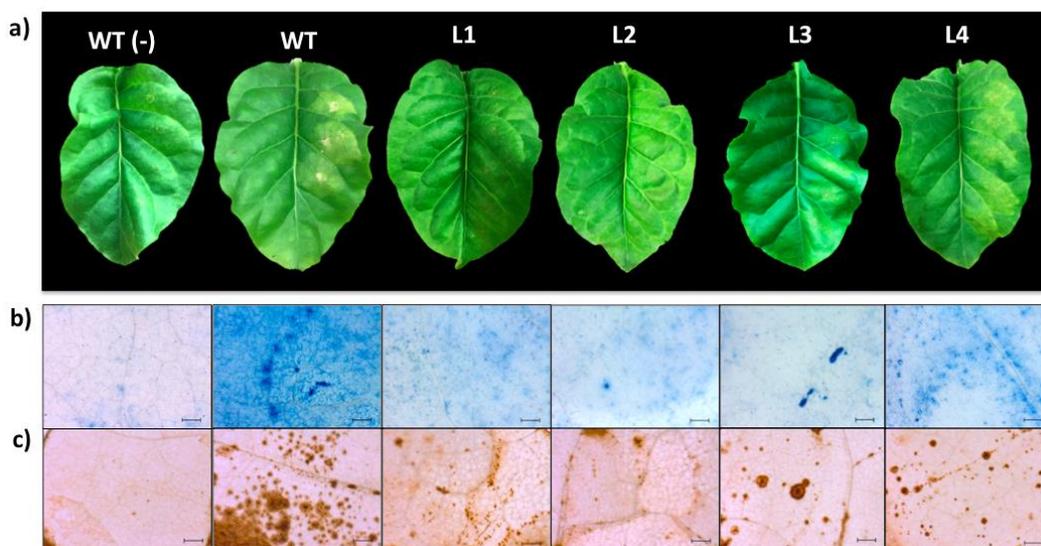


Figura 3.4 Evaluación cualitativa de la infección en las plantas transgénicas de tabaco. a) Hojas de tabaco de las líneas transgénicas infectadas con *Pst* dos días post-inoculación. b) Tinción de azul de tripano 48 hrs después de la infección ante *Pst*, Barra de escala 1000 μm . c) Detección de peróxido de hidrógeno en células mediante tinción con DAB, barra de escala 1000 μm .

3.2.6 Evaluación de la expresión de *NtPR1* y *NtPR3* en las líneas transgénicas

Se evaluó la expresión de un gen marcador de resistencia *NtPR1* en las líneas transgénicas de tabaco (L1-L4) y en la WT, mediante qRT-PCR. En la figura 3.5 se observa que el gen *NtPR1* tiene un patrón de expresión que se correlaciona con la expresión de *MaRAR1* (Figura 2.9), pues los máximos valores de *NtPR1* se observan en las líneas L2 y L3 (la mayor expresión fue en L2), mientras que L1 y L4 tienen un valor de expresión menor, pero similares entre ellas. Lo que sugiere que la expresión de *MaRAR1* activa el SAR en las plantas transgénicas de tabaco. De igual forma los niveles de expresión de *NtPR1* tienen puntos de coincidencia en los resultados del análisis de resistencia a la infección con *Pseudomonas syringae* (Figura 3.6).

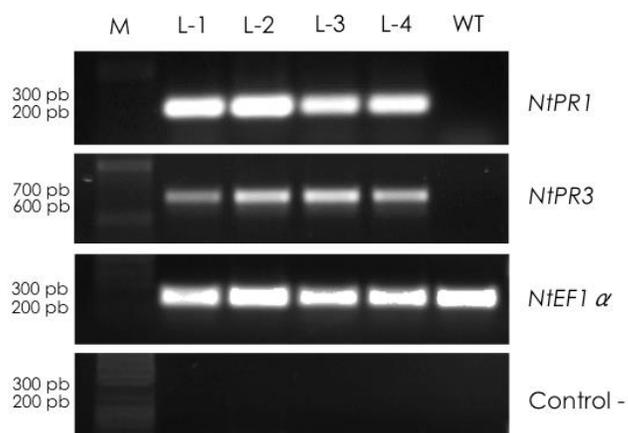


Figura 3.5 La sobre-expresión del gen *MaRAR1* de plátano en tabaco causa la inducción de genes PR. El ARN total fue extraído de las plantas transgénicas generación T2 con un mes de edad, la RT-PCR mostró la activación de genes marcadores *NtPR1* (proteínas antimicrobianas) y *NtPR3* (quitinasas) involucrados en resistencia a patógenos de tipo bacteriano y fúngico en tabaco. Como control positivo se amplificó el gen *NtEF1 α* y como negativo a la línea WT. Se muestra el control negativo de la síntesis de cDNA RT-.

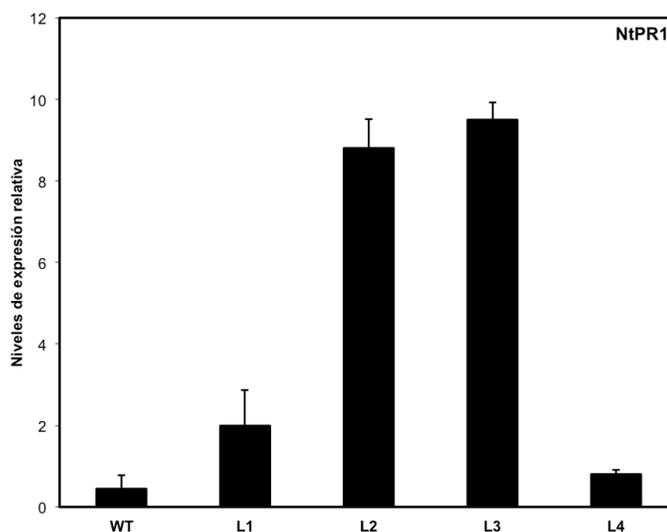


Figura 3.6 qRT-PCR de *NtPR1* en las cuatro líneas transgénicas de tabaco. Los niveles de expresión fueron evaluados en plantas de 6 semanas de edad. Las barras representan \pm SD de tres replicas técnicas. El experimento fue realizado por duplicado obteniéndose resultados similares.

3.3.7 Evaluación de la organización genómica de *MaRAR1*

Con la finalidad de tener un panorama más amplio de la función de *MaRAR1* y que nos ayuden a explicar los resultados encontrados en este trabajo de tesis, se realizó un análisis de los genes vecinos a nuestro gen de interés, en el cromosoma de *M. acuminata* ssp. *Malaccensis*, que es de donde se aisló. *MaRAR1* se encontró en el cromosoma 3 del genoma. Para examinar la organización *MaRAR1* dentro del genoma, se analizó un fragmento de ADN de 314,072 pb, que contiene 20 genes río arriba y río debajo de *MaRAR1* (Figura 3.7). Interesantemente, de esos 40 genes identificados, 10 (25%) codifican para factores de transcripción (TFs; Figura 3.8), incluidos los de AP2/ERF, bZIP, dedos de zinc (C2H2) y familias trihelix. Miembros de esas familias de FT tienen un papel importante en la respuesta ante estrés biótico y abiótico en *A. thaliana* y arroz (Kaplan-Levy *et al.*, 2012; Kielbowicz-Matuk, 2012; Seo y Choi, 2015; Wang *et al.*, 2016). Otros genes cercanos a *MaRAR1* que podrían estar involucrados en respuesta a estrés codifican para proteínas relacionadas a varias actividades, incluyendo la transducción de señales, metabolismo redox, apoptosis y metabolismo en la pared celular. Por lo tanto, *MaRAR1* está incrustado en un grupo de genes no homologos que codifican para

proteínas con funciones putativas en respuesta a estrés biótico y abiótico, haciendo de este gen un candidato para futuras investigaciones en donde posibles interacciones con *MaRAR1* tengan un papel en la respuesta a estrés en plátano.



Figura 3.7. La organización y arquitectura de clústeres de genes cercanos a *MaRAR1*. Las proteínas predichas codificadas por los genes vecinos de *MaRAR1* (flecha negra) en una región de ~ 314 kb de *M. acuminata* ssp. cromosoma 3 de *malasaccensis*. Los factores de transcripción están indicados con asteriscos.

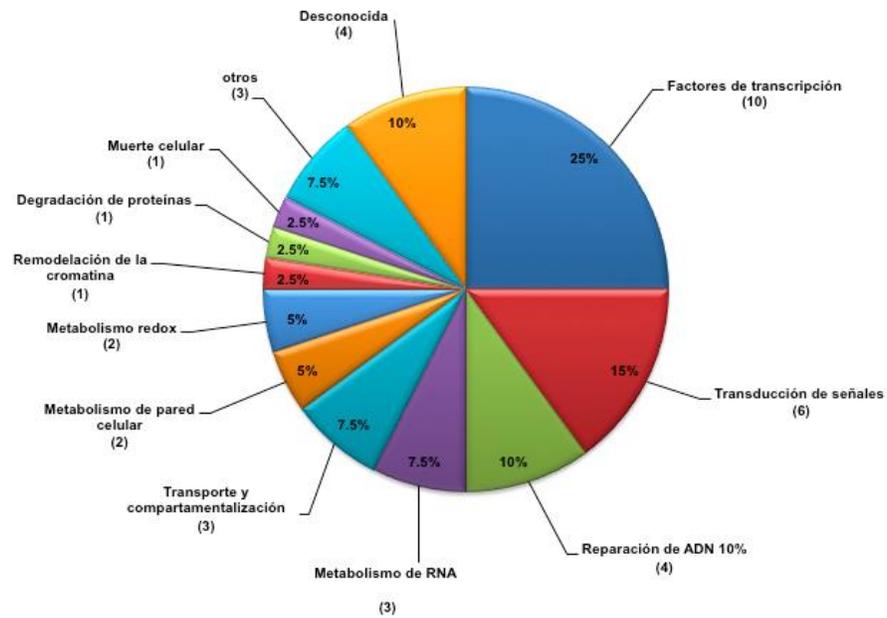


Figura 3.8. Clasificación de los genes vecinos encontrados según su función.

3.4 DISCUSIÓN

Se ha demostrado que RAR1 juega un papel en la acumulación de proteínas de resistencia NBS-LRR para desencadenar respuestas efectivas de resistencia a enfermedades (Bieri *et al.*, 2004), y junto con la chaperona HSP90 y co-chaperona SGT1, se requiere a RAR1 para la estabilización de muchas proteínas de resistencia NBS-LRR (Kadota y Shirasu, 2012). Después de la caracterización molecular y fenotípica de las líneas transgénicas de tabaco que expresan a *MaRAR1*, realizado en el capítulo anterior, en este nos avocamos a analizar la resistencia al estrés biótico de estas plantas, usando a *Pseudomonas syringae* como patógeno modelo. Lo más destacable fue que la resistencia conferida contra *Pst* (Figura 3.3) por parte de *MaRAR1*, se correlacionó con la expresión de este último gen (Figura 2.9). Esto a su vez es consistente con los datos de viabilidad celular, medidos con el azul de Tripano (Figura 3.4b) y con los datos de producción de peróxido de hidrógeno, medido mediante un ensayo de tinción con DAB (Figura 3.4c). Los que nos demuestra que donde hubo mayor crecimiento bacteriano, se encontró mayor daño y muerte celular. Incluso los datos de expresión de *NtPR1* tienen un patrón de expresión (Figura 3.6) muy similar a los datos de crecimiento de *Pst*; es decir, las plantas que tuvieron mayor expresión de *NtPR1* (L2 y L3) fueron en donde menor número de cfu se encontró.

Se evaluaron los patrones de expresión de genes marcadores de resistencia (Figura 3.5), *NtPR1* es un marcador de la Respuesta Sistémica Adquirida (SAR) que es activado por patógenos de tipo bacteriano por la vía del ácido salicílico (SA) y codifica para proteínas de secreción antimicrobianas (Kulye *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014). Por otra parte, el gen *NtPR3* codifica para proteínas quitinasas y presenta una vía de activación de defensa que involucra una actividad sinérgica entre el ácido jasmónico y etileno, fitohormonas involucradas en iniciar una respuesta de defensa contra patógenos de tipo fúngico (Lee *et al.*, 2001).

La función de RAR1 en la inmunidad de las plantas se ha evaluado principalmente mediante el uso de líneas mutantes *rar1* en cebada, arroz y líneas de *A. thaliana* (Shirasu *et al.*, 1999; Muskett *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2013) o silenciamiento en trigo y soja (Fu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Además, la sobreexpresión de *OsRAR1*

en el arroz aumenta significativamente la resistencia de esta planta a la bacteria *X. oryzae* pv. *oryzae* y hongo *M. oryzae* (Sainz y Salmeron, 2006; Wang *et al.*, 2008). Además, las plantas de trigo que sobreexpresan *OsRAR1* son resistentes a los hongos patógenos *Puccinia triticina*, *Septoria tritici* y *B. graminis* (Sainz y Salmeron, 2006).

Teniendo en cuenta la función de RAR1 en la inmunidad de las plantas, la sobreexpresión de *MaRAR1* en tabaco pudo haber actuado como un desencadenante que mejoró los mecanismos de defensa de las plantas transgénicas contra *P. syringae* pv. *tabaci*. En un análisis transcriptómico reciente en plantas de arroz que sobreexpresan el gen *OsHSP18.0-CI*, que codifica una chaperona de clase pequeña (HSP pequeña), se observó la regulación positiva de varios genes PR y otros implicados en SAR en plantas no retadas con algún patógeno (Ju *et al.*, 2017). Las plantas transgénicas de arroz que expresaron esta chaperona mostraron una mejora en la resistencia a la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc). Si la sobreexpresión de *sHSP18.0-CI* en arroz desencadenó la regulación positiva de este conjunto de genes implicados en la inmunidad de las plantas, entonces es probable que la sobreexpresión de *MaRAR1* en tabaco pueda conducir a una activación similar de este tipo de genes de defensa. La regulación positiva del gen PR1 en la mayoría de nuestras líneas de tabaco transgénicas sugiere el papel de un mecanismo SAR que explique la resistencia a *Pst*. Se ha demostrado en *Arabidopsis* y soja que el silenciamiento de RAR1 conduce a una disminución en los niveles de transcripción de PR1 y a la supresión de SAR (Fu *et al.*, 2009). En nuestro caso, después de sobreexpresar *MaRAR1* en tabaco, observamos la respuesta opuesta con respecto a la expresión de PR1 en tres de las cuatro líneas transgénicas (Figura 3.6). Estos resultados indican que *MaRAR1* actúa cadena arriba de la activación del gen PR1 y que su sobreexpresión puede conducir a la regulación positiva del marcador de SAR (PR1).

En conjunto, los resultados de este trabajo revelaron el papel positivo de *MaRAR1* de plátano en la respuesta inmune de la planta, que podría jugar un papel esencial como punto de convergencia clave que permita activar la resistencia ante patógenos de tipo bacteriano como *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Figura 1.11) y de tipo fúngico como *Fusarium oxysporum* f sp. *nicotianae* que afectan a esta planta modelo. Estos resultados serán de gran utilidad para posteriormente ser aplicados en cultivos comerciales de plátano, tal es el caso de Enano Gigante que son constantemente atacados por

patógenos, con el objetivo de generar cultivares resistentes a enfermedades como la Sigatoka negra, el mal de Panamá, el Moko y posiblemente estreses del tipo abiótico.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

- En términos generales la sobre expresión de *MaRAR1* en tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. 'Petite Havana SR1') no comprometió de forma negativa el desarrollo y floración de las plantas en la generación T2.
- *MaRAR1* confirió resistencia contra el patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tabaco* en las diferentes líneas transgénicas generadas.
- Las plantas de tabaco transformadas con *MaRAR1* presentaron mayor nivel de expresión de *NtPR1*, lo que sugiere que la resistencia contra *Pseudomonas syringae* puede deberse a SAR.
- El gen de *MaRAR1* de *Musa acuminata* ssp. *Malaccensis* (DH-Pahang) se encuentra en una región del cromosoma 3 que está rodeada de varios genes de factores transcripcionales y otras proteínas implicadas en respuestas de estrés abiótico o biótico.

PERSPECTIVAS

- Estudiar la interacción proteína-proteína entre MaRAR1 y los homólogos de MaSGT1 y MaHSP90 encontrados en el genoma de *Musa acuminata* ssp. *Malaccensis* (DH-Pahang), o bien descubrir nuevas proteínas con las que pueda estar interactuando esta proteína en plátano, mediante la técnica de dos híbridos.
- Validar la posibilidad de que los genes que se encuentran en la vecindad de MaRAR1 pudieran estarse regulando como un cluster.
- Realizar un análisis de complementación de la función de *MaRAR1*, en plantas mutantes *atar1* de *A. thaliana* y observar si se puede recuperar la función de resistencia contra patógenos. La alta identidad entre las secuencias *MaRAR1* y *AtRAR1* nos sugiere que podría observarse un comportamiento similar al utilizar *MaRAR1* expresando en la mutante *atar1* y de esta forma recuperar la función de resistencia en *A. thaliana*.
- Generar plantas cisgénicas de plátano que sobreexpresen al 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.

BIBLIOGRAFIA

- Arias, P., Dankers, C., Liu, P., Pikauskas, P. (2003). The world Banana Economy, 1985-2002. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Bally, I. S. E., Harris, M., Whiley, A. W. (1999). Effect of wáter stress on flowering and yield of 'Kensington Pride'mango (*Mangifera indica* L.). En VI International Symposium of Mango 509 (pp. 277-282)
- Becker, D.K., Dugdale, B., Smith. M.K. (2000). Genetic transformation of Cavendish banana (*Musa* spp. AAA group) cv Grand Nain via microprojectile bombardment. Plant Cell Reports. 19:229-234.
- Bhaskar, P. B., Raasch, J. A., Kramer, L. C, Neumann, P., Wielgus S. M., Austin, P. S. y 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.
- Bieri, S., Mauch, S., Shen, Q.H., Peart, J., Devoto, A., Casais, C., Ceron, F., Schulze, S., Steinbib, H.H., Shirasu, K., Schulze-Lefert, P., (2004). RAR1 positively controls steady state levels of barley MLA resistance proteins and enables suf cient MLA6 accumula- tion for effective resistance. Plant Cell 16:3480–3495.
- Boller, T., He, S. Y. (2009). Effectors in microbial pathogens pattern recognition receptors in plants and innate immunity in plants: An arms race between. Science. 324: 742-44.
- Camarena, G.G. (2006). Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 12:25-30.
- Camarena, G.G., Torre A.R. (2007). Resistencia Sistemática Adquirida en plantas: estado actual. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 13:157-162.
- 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.

- Carvalho. H., Silva. P., Mendes. G., Brustolini. O., Pimenta. M. Gouveia. B., Valente. M., Ramos. H., Soares. J., Fontes. E. (2014). The Endoplasmic Reticulum Binding Protein BiP Displays Dual Function in Modulating Cell Death Events. *Plant Physiology*. 164:654-670.
- Chang. S., Martin G. (2010). Effector- triggered immunity mediated by the PTO kinase. *Cell*. 20:1-9.
- Chen. W., Kuo. T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram- negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*. 21:9.
- Cheng. D. D., Liu. M.J., Sun. X.B., Zhao. M., Chow. W., Sun. G., Zhang. Z. And Hu. Y. (2016). Light suppresses bacterial population though the acumulation of hydrogen peroxide in tobacco leaves infected with *pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1-11.
- 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*. 1-22.
- Clemente T. (2006) *Nicotiana* (*Nicotiana tobaccum*, *Nicotiana benthamiana*). *Methods Molecular Biology*. 343:143-154.
- Collinge, DB., Gregersen, P., Thordal-Christensen, H. (1994). The induction of gene expression in response to pathogenic microbes in *Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches*. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker. p. 391-433.
- Conner A., Williams M., Gardener R., Derolles 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.
- De Langhe, E. (1996). Banana and plantain: The earliest fruit crops?. In *INIBAP Annual Report 1995*. Montpellier, France, INIBAP. pp. 6-8.

- De Smet, R., Adams, K.L., Vandepoele, K., Van-Montagu, M.C.E., Maere, S., Van de Peer, Y., (2013). Convergent gene loss following gene and genome duplications creates single-copy families in flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 110:2898–2903.
- Dita, M.A., Echegoyen, P.E., Pérez-Vicente, L. (2013). Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense en un país de la región del OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria – OIRSA. 155pp. San Salvador, El Salvador, julio de 2013.
- Duarte, J.M., Wall, P.K., Edger, P.P., Landherr, L.L., Ma, H., Pires, J.C., dePamphilis, C.W., Leebens-Mack, J., (2010). Identification of shared single copy nuclear genes in *Arabidopsis*, *Populus*, *Vitis* and *Oryza* and their phylogenetic utility across various taxonomic levels. *BMC Evolutionary Biology*. 10:61.
- Durrant, W.E., Dong X. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 42:185-209.
- D'Hont, A., Denoeud, F., Aury, J., Baurens, F., Carreel, F., Garsmeur, O., Noel, B., Bocs, S., Droc, G., Rouard, M., Da, C., Jabbari, K., Cardi, C., Poulain, J., Souquet, M., Labadie, K., Jourda, C., Lengellé, J., Rodier, M., Alberti, A., Bernard, M., Correa, M., Ayyampalayam, S., Mckain, M., Leebens, J., Burgess, D., Freeling, M., Mbéguié, D., Chabannes, M., Wicker, T., Panaud, O., Barbosa, J., Hribova, E., Heslop, 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., Dievart, A., Jaillon, O., Leclercq, J., Argout, X., Lyons, E., Almeida, A., Jeridi, M., Dolezel, J., Roux, N., Risterucci, A., Weissenbach, J., Ruiz, M., Glaszmann, J., Quériér, F., Yahiaoui, N., Wincker, P. (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*. 488:213-219.
- Drenth, A., Guest, D.I., (2016). Fungal and oomycete diseases of tropical tree fruit crops. *Annual Review of Phytopathology*. 54:373–395.
- FAOSTAT, 2016. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (accessed 11 March 2018).
- Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) (2014): http://www.fhia.org.hn/htdocs/banano_y_platano.html revisado el 15 de octubre del

2014.

- 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.
- Ganapathi. T., Suprasanna. P., Rao. P. and Bapat. V. (2004). Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology*. 3:171-184.
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T.C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Mary Miller, R., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalima, T., Oliphant, A., Briggs, S., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *japonica*). *Science*. 296:92–100.
- Häkkinen, M. (2013). Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (*Musaceae*). *TAXON* 62: 809-813.
- 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.
- Han, F., Peng, Y., Xu, L., Xiao, P., (2014). Identification, characterization, and utilization of single copy genes in 29 angiosperm genomes. *BMC Genomics*. 15:504.
- He, P.S., Sheen, J. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. *Cellular Microbiology*. 9:1385-96
- 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, L., Vit, P. (2009). El plátano: un cultivo tradicional con importancia nutricional. *Fuerza Farmacéutica*. 2:11-14.

Hoobs, S.L., Kpodar, P., DeLong, C.M., (1990). The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Molecular Biology*. 15(6):851-864.

Hubert, D.A. (2003). Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *The EMBO Journal*. 22:5679–5689.

Jones, J.D., Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*. 444:323-329.

Ju, Y., Tian, H., Zhang, R., Zuo, L., Jin, G., Xu, Q., Ding, X., Li, X., Chu, Z., (2017). Overexpression of OsHSP18.0-CI enhances resistance to bacterial leaf streak in rice. *Rice* 10, 12.

Kadota, Y., Shirasu, K., Guerois, R., (2010). NLR sensors meet at the SGT1-HSP90 crossroad. *Trends in Biochemical Sciences*. 35:199–207.

Kadota, Y., Shirasu, K., (2012). The HSP90 complex of plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1823:689–697.

Kaplan-Levy, R.N., Brewer, P.B., Quon, T., Smyth, D.R., (2012). The trihelix family of transcription factors –light, stress and development. *Trends in Plant Science*. 17:163–171.

Kasperbauer. M. (1973). Effect of Pretransplant Lighting on Post-transplant Growth and Development of Tobacco. *Agronomy Journal*. 65:447-450.

Khanna, H., Becker, D., Kleidon, J., Dale, J. (2004). Centrifugation assisted *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (CAAT) of embryogenic cells suspensions of banana (*Musa* spp. Cavendish AAA and Lady finger AAB). *Molecular Breeding*. 14:239-252.

- Kielbowicz-Matuk, A., 2012. Involvement of plant C₂H₂-type zinc finger transcription factors in stress responses. *Plant Science*. 186, 78–85.
- King, E.O., Ward. W.K., Raney. D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 44:301-307.
- Kulye. M., Liu. H., Zhang. Y., Zeng. H., Yang. X., Qiu. D. (2012). Hrip1, a novel protein elicitor from necrotrophic fungus, *Alternaria tenuissima*, elicits cell death, expression of defense-related genes and systemic acquired resistance in tobacco. *Plan Cell and Environment*. 35:2104-2120.
- Lee. J., Klessig. D., Nürnberger. T. (2001). A harpin site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *The Plant Cell*. 13:1079-1093.
- 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.
- Li. F., Han. Y., Feng. Y., Xing. S., Zhao. M., Chen. Y., Wang. W. (2013). Expression of wheat expansin driven by the RD29 promoter in tobacco confers water-stress tolerance without impacting growth and development. *Journal of Biotechnology*. 163:281-291.
- Li, Z., De la Torre, A.R., Sterck, L., Canovas, F.M., Avila, C., Merino, I., Cabezas, J.A., Cervera, M.T., Ingvarsson, P.K., Van de Peer, Y., (2017). Single-copy genes as molecular markers for phylogenomic studies in seed plants. *Genome Biology and Evolution*. 9:1130–1147.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., Dinesh-Kumar S. P. (2002). Tabaco *RAR1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* Like Genes are Required for N-mediated Resistance to Tabaco mosaic virus. *Plant Journal*. 30:415-429.
- Lydon. J. Y, Patterson. C. (2001). Detection of tabtoxin-producing strains of *Pseudomonas syringae* by PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 32:166-170.
- Marcelino, L., Gonzáles, V., Ríos D. (2004). El cultivo de plátano en Panamá. Impresora

Pacífico. pp.21-21.

- Marshall, D. S. (1956). The settlement of Polynesia. *Scientific Amer.* 1195:59-72.
- Martin-Cocom, Merly A. (2014). Generación y caracterización molecular de plantas de Tabaco (*Nicotiana tabacum*) transformadas con el gen *MaRAR1* de plátano (*Musa acuminata*). Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Martínez, B. L. (2013). Moko bacteriano del plátano *Ralstonia solanacearum* raza 2. SENASICA. 1-21.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plants.* 15:473-497.
- Muskett,, P., Kahn, K., Austin, M., Moisan, L., Sadanandom, A., Shirasu, K., Jones, J., Parker, J. (2002). Arabidopsis *RAR1* Exerts Rate-Limiting Control of R Gene-Mediated Defenses against Multiple Pathogens. *The Plant Cell.* 14:979-992.
- Navarro, C., Escobedo, R. M., Mayo, A. (1997). *In vitro* plant regeneration from embryogenic cultures of a diploid and a triploid, Cavendish banana. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 51:17-25.
- Peterhänsel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R., Schulze-Lefert, P. (1997). Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *Plant Cell.* 9:1397–1409.
- Pieterse, C.M., León, R.A., Van, der Ent S., Van, W.S. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology.* 5:103-316.
- Plan Rector del Sistema Nacional del Plátano. (2010). SAGARPA. México.
- Ploetz, R.C., Kema, G.H.J., Ma, L.J., (2015). Impact of diseases on export and smallholder production of banana. *Annual Review of Phytopathology.* 53:269–288.
- Pontie. D., Tronchet. M., Rogowsky. P., Lam. E., Roby. D. (1998). Activation of hsr 203, a Plant Gene Expressed During Incompatible Plant-Pathogen Interactions, Is Correlated with Programmed Cell Death. *Molecular Plant Microbe Interactions*

11:544-554.

Reynolds. P.K. (1927). The banana: Its History, Cultivation and Place Among Staple Foods. Cambridge, MA, Houghton Mifflin. p. 13-38.

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.

Rodríguez, M., Morales, J., Chavarría, J. (1985). Producción de Plátanos (Musa AAB, ABB). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. p.2-7.

Rosales, E. F., Pocasangre E. L. (2002). Mejoramiento convencional de banano y plátano: Estrategias y logros. Memorias XV reunión. Pp.31-43

Sági, L., Remy, S., Verelst, B., Panis, B., Cammue, B., Volckaert, G., Swennen, R. (1995). Transient gene expression in transformed banana (*Musa* cv. Bluggoe) protoplasts and embryogenic cell suspensions. The Methodology of Plant Genetic Manipulation. 3:89-95.

Sainz, M., Salameron, J. Transgenic plants comprising nucleic acid molecules encoding RAR1 disease resistance proteins and uses thereof. U.S., 7,098,378 B2. (CI 800/279) 29 de agosto de 2006 . Appl. 11/011, 906, 14 de diciembre 2004. 62 p.

Sambrook J., Russell D. W. (2001). Molecular Cloning a Laboratory Manual 3ra ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Seo, E., Choi, D. (2015). Functional studies of transcription factors involved in plant defenses in the genomic era. Brief Funct. Genomics. 14:260–267.

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., 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.

Shirasu, K., Schulze-Lefert, P., (2003). Complex formation, promiscuity, and multifunctionality: protein interactions in disease resistance pathways. *Trends in Plant Science*. 8:252-258.

Shirasu. K. (2009). The HSP90-SGT1 Chaperone Complex for NLR Immune Sensors. *Annual Reviews. Plant Biology*. 60:139-64.

Simmonds, N.W. Shepherd, K. (1955). The taxonomy and origins of cultivated bananas. *Journal of the Linnean Society of London Botany*. 55:302-312.

Simmonds, N.W. (1987). *Babanas*. Longman Group UK Ltd. Third edition pp.2-5.

Simmonds, N.W. (1995). *Bananas in evolution of Crop Plants*. 2 ed. Smart, J; Simmonds, N.W. Ed. Essex, England, Longman Scientific and Technical. pp. 370-375.

Sistema de Informacion de Precio y Abastecimiento del Sector Agropecuario (2014). El cultivo del plátano (*Musa paradisiaca*), un importante alimento para el mundo.

[Online] (Actualizado Junio 2014).

Disponible en:
https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/insumos_factores_de_produccion_abr_2014.pdf

[Acceso 8 de diciembre 2017].

Song, M., Yeol, C., Han, M., Ryu, H., Lee, S., Sun, L., He, Z., Seo, Y., Canal, P., Ronald, P., Jeon. J. (2013). Differential Requirement of *Oryza sativa* *RAR1* in Immune Receptor-Mediated Resistance of Rice to *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Cell*. 35:327-334.

Taguchi. F., Takeuchi. K., Katoh. E., Murata. K., Suzuki. T., Marutani. M., Kawasaki. T., Eguchi. M., Katoh. S., Kaku. H., Yasuda. C., Inagaki. Y., Toyoda. K., Shiraishi. T., Ichinose. Y. (2006). *Cellular Microbiology*. 8:923-938.

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. *Proceedings of National Academy of Science USA*. 100:11777–11782.

- 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., Chen. Z., Bressan. R., Martin. G. (1995). Expression of the Tomato *Pto* Gene in Tobacco Enhances Resistance to *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* Expressing *avrPto*. *The Plant Cell*. 7:1529-1536.
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei YD, Collinge DB. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley–powdery mildew inter- action. *Plant J* 1997;11:1187–94.
- Tizaoui. K. Y, Elyes. M. (2012). Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. *Genetics and Molecular Biology*. 35:640-649.
- Torres, J., Rodriguez, H. A., Rodriguez, E., Arango, R. (2009). Aspectos bioquímicos de la resistencia del banana (*Musa acuminata*) al ataque del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *TUMBAGA*. 4:85-96.
- Van, Verk M.C., Gatz, C., y Linthorst, H. (2009). Transcriptional Regulation of Plant Defense Responses. *Advances in Botanical Research*. 51:397-348.
- Vaucheret. H., Béclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J., Mourrain P., Palauqui. J., Vernhettes. S. (1998). Transgene induced gene silencing in plants. *The Plant Journal*. 16:651-659.
- Young. M., Yeol. C., Han. M., Ryu. H., Lee. S., Sun. L., He. Z., Seo. Y., Canal. P., Ronald. P., Jeon. J. (2013). Differential Requirement of *Oryza sativa* *RAR1* in Immune Receptor-Mediated Resistance of Rice to *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Cell*. 35:327-334.
- 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.

- Wang. Y., Wang. W., Jin. S., Wnag. J., Wang. B., Hou. B. (2012). Over-expression of a putative poplar glycosyltransferase gene, PtGT1, in tobacco increases lignin content and causes early flowering. *Journal of Experimental Botany*. 63:2799-2808.
- Wang, G., Fan, R., Wang, X., Wang, D., Zhang, X., (2015). TaRAR1 and TaSGT1 associate with TaHsp90 to function in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling growth and stripe rust resistance. *Plant Molecular Biology*. 87: 577-589.
- Wang, H., Wang, H., Shao, H., Tang, X. (2016). Recent advances in utilizing transcription factors to improve plant abiotic stress tolerance by transgenic technology. *Front in Plant Science*. 7, 67.
- Wang, X., Wang, Y., Liu, P., Ding, Y., Mu, X., Liu, X., Wang, X., Zhao, M., Huai, B., Huang, L., Kang, Z., (2017). TaRAR1 is involved in wheat defense against stripe rust pathogen mediated by *YrSu*. *Frontier in Plant Science*. 8:156.
- 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.