

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTUDIO DE MECANISMOS DE DEFENSA INDUCIDOS EN PLÁNTULAS *in vitro* DE COCOTERO

(Cocos nucifera L.)

Tesis que presenta

MARÍA DEL CARMEN SILVERIO GÓMEZ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

22 de febrero del 2021

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 María del Carmen Silverio Gómez, titulado "Estudio de mecanismos de defensa inducidos en plántulas *in vitro* de cocotero (*Cocos nucifera* L.)", fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de cocotero, en los laboratorios de Cocotero de del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Carlos Oropeza Salín, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Esta tesis tiene orientación al desarrollo socioeconómico de la región porque está orientada hacia la economía basada en conocimiento.

Atentamente:

Custor

Dra. Cecilia Hernández Zepeda Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 11 de noviembre del 2020

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma:

Nombre: María del Carmen Silverio Gómez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "TROPIC SAFE (Clave 727459-2)" bajo la dirección del Dr. Carlos M. Oropeza Salín.

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesor, el Dr. Carlos M. Oropeza Salín, por su orientación, apoyo incondicional y por darme la confianza para realizar este trabajo de investigación y por permitirme aprender de él y de todo el grupo del laboratorio de cocotero. ¡Gracias Doctor!
- Al proyecto titulado "TROPIC SAFE" (Clave 727459-2) bajo la dirección del Dr. Carlos M. Oropeza Salín y al CONACyT (Beca otorgada No. 286531) por los apoyos brindados y que fueron fundamentales para la realización de este trabajo de investigación.
- Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por las instalaciones prestadas para llevar a cabo la realización de este trabajo de investigación y por la oportunidad de formarme como Dra. Ciencias.
- Al comité tutorial, conformado por: Dr. Carlos M. Oropeza Salín, Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dr. Carlos Fredy Ortiz García y Dr. Denis Israel Magaña Ortíz, por sus observaciones, comentarios y sugerencias para la exitosa conclusión de este trabajo de investigación.
- Al comité revisor, conformado por: Dr. Carlos M. Oropeza Salín, Dr. Julio C.
 Vega Arreguín, Dr. Santy Peraza Echeverría, Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dr.
 Carlos Fredy Ortiz García, Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado y Dr. Javier
 Orlando Mijangos Cortes, gracias por sus observaciones y sugerencias para
 la conclusión de este documento.

- Al Dr. Luis Angel Xoca Orozco, por su valiosa aportación en la publicación del artículo científico y por brindarme su amistad, permitiéndome aprender valiosos conocimientos y consejos durante la etapa de mi formación académica ¡Gracias Xoca!
- Al Dr. José Germán Nic Matós, por su apoyo en el diseño de las sondas y cebadores para el estudio de expresión y por sus aportaciones en la revisión y redacción del artículo científico. ¡También por siempre darme ánimos para avanzar y prepararme siempre mas! ¡Gracias Nic!
- A la Dra. María del S. Narváez Cab, por su orientación, ayuda y por su amistad, brindados en todo momento durante este proceso. Agradezco todos los momentos dificultosos en los que recibí su apoyo y consejos para seguir adelante. ¡Gracias Mary!
- A todos los compañeros y ex-compañeros del laboratorio de cocotero ¡Gracias!

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado especialmente a mi madre **Carmela** pues ella es el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, ya que su amor, paciencia y apoyo incondicional ha estado conmigo siempre impulsando mi desarrollo profesional y sobre todo enseñándome a ser un mejor ser humano. Se la dedico también a mi hermana **Victoria** quien con sus consejos y buen sentido del humor me ha impulsado para seguir adelante durante este importante proceso. A mis amigos y compañeros, por el apoyo que siempre me brindaron día a día para finalizar esta etapa de mi vida. ¡Gracias!

ÍNDICE	i
LISTADO DE ABREVIATURAS	v
LISTADO DE FIGURAS	vi
LISTADO DE TABLAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
1.1 ANTECEDENTES	3
1.1.1 EL COCOTERO (Cocos nucífera L.)	3
1.1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA PALMA DE COCOTERO	4
1.1.3 ENFERMEDADES QUE AFECTAN AL CULTIVO DE COCOTERO	5
1.1.3.1 AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO	6
1.1.3.2 ANILLO ROJO	7
1.1.3.3 PUDRICIÓN DE COGOLLO	7
1.1.4 MANEJO INTEGRAL DEL CULTIVO DE COCOTERO	8
1.1.4.1 PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN INTEGRAL DE COCOTERO EN CICY	8
1.1.4.1.1 BÚSQUEDA DE ECOTIPOS RESISTENTES	9
1.1.5 MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS	10
1.1.5.1 MECANISMOS DE DEFENSA INDUCIDOS	11
1.1.5.1.1 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA	12
1.1.5.1.2 RESISTENCIA SISTÉMICA INDUCIDA	13
1.1.6 GENES INVOLUCRADOS EN LOS MECANISMOS DE DEFENSA EN	
PLANTAS	17
1.1.7 USO DE HERRAMIENTAS ÓMICAS PARA EL ESTUDIO DE MECANISMOS	
DE DEFENSA	19
1.1.7.1 ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS	19
1.1.8 ESTUDIOS RELACIONADOS CON MECANISMOS DE DEFENSA EN	
COCOTERO	20
1.2 JUSTIFICACIÓN	21
1.3 HIPÓTESIS	22
1.4 OBJETIVOS	22
1.4.1 OBJETIVO GENERAL	22
1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22

1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR E in silico DE GENES QUE	
PARTICIPAN EN UNA RESPUESTA TIPO-ISR EN Cocos nucifera L	25
2.1 INTRODUCCIÓN	25
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	26
2.2.1 CARACTERIZACIÓN IN SILICO DE GENES CLAVE EN LA RESPUESTA	
ISR	26
2.2.2 DISEÑO DE CEBADORES Y SONDAS	26
2.2.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES CnCHIB, CnCOI1, CnMYC2, CnNPR1,	
CnNPR3, CnPR2, CnPR3, CnPR5 y CnSERK	26
2.2.3.1 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE <i>CnMYC</i> 2	28
2.2.4 EXTRACCIÓN DE RNA	28
2.2.4.1 TRATAMIENTO CON DNAsa	29
2.2.5 SÍNTESIS DE cDNA	29
2.2.6 ANÁLISIS DE EFICIENCIA Y ESPECIFICIDAD DE CEBADORES Y	
SONDAS DISEÑADOS	29
2.2.6.1 CURVA ESTÁNDAR PARA CnCHIB, CnCOI1, CnMYC2, CnNPR1,	
CnNPR3, CnPR2, CnPR3, CnPR5, CnSERK y 18S	29
2.2.7 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	30
2.3 RESULTADOS	31
2.3.1 CARACTERIZACIÓN DE GENES CLAVE EN LA RESPUESTA ISR	31
2.3.1.1 CARACTERIZACIÓN DE CnCHIB, CnCOI1 y CnMYC2	32
2.3.2 CEBADORES DE LOS GENES CnCHIB, CnCOI1 y CnMYC2	38
2.3.2.1 PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE LOS GENES CnCHIB, CnCOI1 y	
CnMYC2	39
2.3.2.2 PRODUCTO CLONADO DE CnMYC2	40
2.3.3 SONDAS DE LOS GENES CnCHIB y CnMYC2	41
2.3.4 RNA EXTRAÍDO Y cDNA SINTETIZADO	44
2.3.5 EFICIENCIA Y ESPECIFICIDAD DE CEBADORES Y SONDAS DISEÑADOS	45
2.3.5.1 CURVA ESTÁNDAR DE CEBADORES Y SONDAS DISEÑADOS	45
2.3.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	46
2.4 DISCUSIÓN	48

CAPÍTULO III. RESPUESTA TIPO-ISR INDUCIDA EN PLÁNTULAS in vitro DE	
COCOTERO	51
3.1 INTRODUCCIÓN	51
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.2.1 ENSAYO DE TOXICIDAD DE MeJA EN PLANTULAS in vitro DE	
COCOTERO	52
3.2.2 Phytophthora capsici	52
3.2.2.1 ACTIVACIÓN Y RESIEMBRA DE Phytophthora capsici	52
3.2.2.2 EVALUACIÓN DE LAS DIFERENTES FORMAS DE INOCULACIÓN DE	
Phytophthora capsici EN PLÁNTULAS DE COCOTERO	52
3.2.2.3 INOCULACIÓN DE PLÁNTULAS DE COCOTERO CON Phytophthora	
<i>capsici</i> PRETRATADAS CON MeJA (50-600 μM)	53
3.2.2.3.1 TRATAMIENTO CON MeJA	53
3.2.2.3.2 INOCULACIÓN CON Phytophthora capsici	54
3.2.2.4 CONFIRMACIÓN DEL MÉTODO DE INFECCIÓN DE Phytophthora capsici	
EN PLÁNTULAS INOCULADAS	55
3.2.3 Phytophthora palmivora	55
3.2.3.1 ACTIVACIÓN DE LA CEPA DE Phytophthora palmivora	55
3.2.3.2 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE Phytophthora palmivora	56
3.2.3.2.1 CONSERVACIÓN POR SUSPENSIÓN EN AGUA DESTILADA	56
3.2.3.2.2 CONSERVACIÓN POR SUSPENSIÓN EN MEDIO LÍQUIDO V8 Y	
GLICEROL	56
3.3 RESULTADOS	57
3.3.1 ENSAYO DE TOXICIDAD DE MeJA EN PLANTULAS in vitro DE	
COCOTERO	57
3.3.2 Phytophthora capcisi	58
3.3.2.1 EVALUACIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE INOCULACIÓN CON	
Phytophthora capsici EN PLÁNTULAS DE COCOTERO	58
3.3.2.2 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON MeJA (50-600 μ M) EN	
PLÁNTULAS DE COCOTERO INOCULADAS CON Phytophthora capsici	59
3.3.2.3 CONFIRMACIÓN DE LA INFECCIÓN POR Phytophthora capsici EN	
PLÁNTULAS INOCULADAS	62

3.3.3 Phytophthora palmivora	62
3.3.3.1 PROPAGACIÓN DE Phytophthora palmivora	62
3.3.3.2 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE Phytophthora palmivora	63
3.4 DISCUSIÓN	64
CAPÍTULO IV. TRANSCRIPTOME ANALYSIS REVEALS KEY DEFENSE-	
RELATED GENES UPON SA INDUCTION IN Cocos nucifera L	67
4.1 ABSTRACT	67
4.2 INTRODUCTION	68
4.3 MATERIALS AND METHODS	69
4.3.1 PLANT MATERIALS AND SAMPLE PREPARATION	69
4.3.2 RNA EXTRACTION, LIBRARY CONSTRUCTION AND ILLUMINA	
SEQUENCING	69
4.3.3 DE NOVO SEQUENCE ANALYSIS	70
4.3.4 QUANTIFICATION OF DIFFERENTIALLY GENES AND FUNCTIONAL	
ANNOTATION	70
4.3.5 REAL-TIME PCR GENE EXPRESSION VALIDATION	71
4.4 RESULTS	72
4.4.1 ILLUMINA SEQUENCING, ALIGNMENT AND DE NOVO	
ASSEMBLY	72
4.4.2 DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN RESPONSE TO SALICYLIC	
ACID	73
4.4.3 FUNCTIONAL ANNOTATION AND CLASSIFICATION BY ONTOLOGICAL	
TERMS	75
4.4.4 KEGG PATHWAYS ANALYSIS OF DEUs	77
4.4.5 UNIGENES INVOLVED IN SA SIGNALING DEFENSE RELATED	77
4.4.6 VALIDATION OF DATA THROUGH qRT-PCR	79
4.5 DISCUSSION	80
4.6 CONCLUSION	89
4.7 DECLARATIONS	89
4.8 SUPLEMENTARY MATERIAL	90
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	97
5.1 CONCLUSIONES	97

5.2 PERSPECTIVAS	98
5.3 BIBLIOGRAFÍA	98

LISTADO DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	ADN complementario
ALC	Amarillamiento Letal del Cocotero
RNA	Ácido ribonucleico
BD	Dominio de unión a ADN, del inglés "binding domain"
bHLH	Del inglés "basic helix loop helix"
CnCHIB	Quitinasa B o endoquitinasa de Cocos nucifera
CnMYC2	Factor de transcripción MYC2 de Cocos nucifera
CnNPR1	Por sus siglas en ingles non-expressor of PR1 de Cocos nucifera
CONACOCO	Comité Nacional Sistema Producto Palma de Coco A. C.
ET	Etileno
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FT	Factor de transcripción
GESPLAN	Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación
HFMA	Hongos formadores de micorrizas arbusculares
ISR	Respuesta Sistémica Inducida
JA	Ácido jasmónico
P. capsici	Phytophthora capsici
P. palmivora	Phytophthora palmivora
PCA	Autoridad de Coco de Filipinas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGPR	Bacterias rizógenas promotoras de crecimiento
PR	Proteínas relacionadas con la patogénesis
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RGAs	Análogos de genes de resistencia
RH	Respuesta de hipersensibilidad

ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico
SAR	Respuesta Sistémica Adquirida

LISTADO DE FIGURAS

CAPÍTULO I	3
Figura 1.1 Usos y productos derivados de la palma de cocotero	5
Figura 1.2 Principales enfermedades que afectan al cocotero	6
Figura 1.3 Líneas de investigación integral de cocotero en CICY	9
Figura 1.4 Grafica de mortalidad	10
Figura 1.5 Mecanismos de defensa en plantas	11
Figura 1.6 Resistencia sistémica adquirida	13
Figura 1.7 Representación esquemática del estado no inducido e inducido de	
ISR	15
Figura 1.8 Resistencia sistémica inducida	16
Figura 1.9 Esquema representativo de las respuestas de defensa inducibles	18
Figura 1.10 Estrategia experimental general del trabajo de investigación	23
CAPÍTULO II	25
Figura 2.1 Se muestra el ORF de CnCHIB y su secuencia de aminoácidos	33
Figura 2.2 Representación esquemática de la estructura de CnCHIB	34
Figura 2.3 Se muestra el ORF de CnCOI1 y su secuencia de aminoácidos	35
Figura 2.4 Representación esquemática de la estructura de CnCOI1	36
Figura 2.5 Se muestra el ORF de CnMYC2 y su secuencia de aminoácidos	37
Figura 2.6 Representación esquemática de la estructura de CnMYC2	38
Figura 2.7 Productos amplificados con los cebadores de CnCHIB, CnCOI1 y	
CnMYC2	40
Figura 2.8 Producto de CnMYC2 a partir de DNA genómico con los cebadores	
sentido <i>CnMYC2</i> -A y antisentido <i>CnMYC2</i> -B	41
Figura 2.9 Esquema representativo de la ubicación de la sonda CnCHIB	42
Figura 2.10 Esquema representativo de la ubicación de la sonda CnMYC2	43

Figura 2.11 Imagen de muestra de RNA y cDNA fraccionado en un gel de	
agarosa 1.5%	4
Figura 2.12 Imagen representativa de la curva estándar de CnCHIB, CnCOI1,	
CnMYC2, CnNPR1, CnNPR3, CnPR2, CnPR3, CnPR5 y CnSERK	4
Figura 2.13 Niveles de expresión relativa de los nueve genes evaluados en tejido	
de hoja y raíz, junto comparado con el control (18S)	4
CAPÍTULO III	5
Figura 3.1 Proceso de inoculación con Phytophthora capsici en plántulas in vitro	
de cocotero	5
Figura 3.2 Estudio de toxicidad a MeJA en plántulas in vitro de cocotero	5
Figura 3.3 Tipos de inoculación y propagación de Phytophthora capsici en	
plántulas <i>in vitro</i> de cocotero	5
Figura 3.4 Proceso de infección de plántula inoculada con Phytophthora capsici	
por medio de herida con micelio en tallo	5
Figura 3.5 Plántulas de cocotero pretratadas con MeJA (0-200 µM) e infectadas	
con Phytophthora capsici	6
Figura 3.6 Plántulas de cocotero pretratadas con MeJA (0-600 µM) e infectadas	
con Phytophthora capsici	6
Figura 3.7 Reaislamiento de Phytophthora capsici a partir de tejido necrosado de	
las plantas de los diferentes tratamientos	6
Figura 3.8 Crecimiento de la cepa Phytophthora palmivora en medio V8	6
Figura 3.9 Representación del crecimiento de Phytophthora palmivora	6
CAPÍTULO IV	6
Fig. 4.1 Differential expression of coconut unigenes of each comparison	7
Fig. 4.2 Gene ontology of DEUs in leaf and root of coconut palm. Molecular	
function, Cellular component and Biological process	7
Fig. 4.3 Gene ontology Biological process of DEUs in (A) leaf and (B) root of	
coconut palm	7
Fig. 4.4 KEGG classifications of DEUs in leaf and root of coconut palm under SA	
induction	7
Fig. 4.5 Analysis of gene expression by RNA-Seq and validation by qRT-PCR of	
defense-related unigenes selected to coconut transcriptome	8

Fig. 4.6 Sequence of events from SA recognition to defense gene induction	87
Fig. S4.1 Multidimensional Scaling Plot of Distances	92
Fig. S4.2 Venn diagram of DEUs that are up-regulated and down-regulated in	
both tissues evaluated	92

LISTADO DE TABLAS

CAPÍTULO I	3
Tabla 1.1 Principales países productores de cocotero en el mundo	4
Tabla 1.2 Trabajos de investigación relacionados con mecanismos de defensa en	
cocotero	21
CAPÍTULO II	25
Tabla 2.1 Reactivos utilizados para la amplificación por PCR de los cebadores de	
CnCHIB, CnCOI1 y CnMYC2 en DNA genómico y cDNA	27
Tabla 2.2 Condiciones de temperatura empleadas para la amplificación de	
CnCHIB, CnCOI1 y CnMYC2	27
Tabla 2.3 Reactivos utilizados para la mezcla de reacción de PCR en tiempo real	
en los estudios de expresión de CnPR2, CnPR3 y CnPR5 en cDNA	30
Tabla 2.4 Genes que participan en las vías de señalización de JA identificados en	
el transcriptoma de cocotero	32
Tabla 2.5 Análisis comparativo de CnCHIB con otras especies en GenBank	33
Tabla 2.6 Análisis comparativo de CnCOI1 con otras especies en GenBank	36
Tabla 2.7 Análisis comparativo de CnMYC2 con otras especies en GenBank	38
Tabla 2.8 Cebadores diseñados a partir de las secuencias de CnCHIB, CnCOI1 y	
CnMYC2	39
Tabla 2.9 Cebadores y sondas de CnCOI1, CnPR2, CnPR3 y CnPR5, CnMYC2,	
CnCHIB, CnNPR1 y CnSERK	44
CAPÍTULO III	51
Tabla 3.1 Tratamientos con MeJA y Phytophthora capsici en plántulas in vitro de	
cocotero	53
Tabla 3.2 Porcentaje de incidencia y severidad evaluados a los 14 días en	60

plántulas in vitro de cocotero pretratadas con MeJA e inoculadas con Phytophthora	
capsici	
Tabla 3.3 Porcentaje de incidencia y severidad evaluados a los 21 días en	
plántulas in vitro de cocotero pretratadas con MeJA e inoculadas con Phytophthora	
capsici	62
CAPÍTULO IV	67
Table 4.1 Sequencing, de novo assembly and mapping results of leaf and root	
samples	72
Table 4.2 Differentially expressed unigenes in tissues of coconut plantlets treated	
and untreated with SA	73
Table 4.3 Defense-related genes induced by SA	79
Table 4.4 Analysis of gene expression and validation by qRT-PCR of unigenes	
selected to coconut transcriptome	80
Table S4.1 Comparison of mapped sequences of different treatments using the	
Cocos nucifera L. transcriptome	90
Table S4.2 Primers designed for real-time PCR validation of the Cocos nucifera L.	
transcriptome	91
Table S4.3 Some Up and Down regulated unigenes in response to SA of coconut	
palm	93

х

RESUMEN

La palma de cocotero es considerado un cultivo de alto impacto económico debido a sus múltiples usos y productos. Sin embargo, a pesar de ser un cultivo con ecotipos resistentes, es afectado por diversos patógenos que impacta su productividad. Por otro lado, las plantas poseen dos principales mecanismos de defensa capaces de ayudarlas a combatir dichos patógenos. La resistencia sistémica adquirida (SAR) y resistencia sistémica inducida (ISR), señalizados por la acumulación de dos fitohormonas, el ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA) respectivamente. Hasta la fecha existen pocas evidencias sobre la presencia de mecanismos de defensa en cocotero. Sin embargo, aunque hay estudios que reportan la posible presencia de un mecanismo de defensa tipo-SAR en cocotero, aún no existe evidencia alguna sobre el mecanismo de defensa ISR. Por lo tanto, existe la necesidad de realizar estrategias de estudio sobre los mecanismos de defensa con la finalidad de combatir las enfermedades que afectan a este cultivo. En base a lo mencionado anteriormente, el presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la posible presencia de algún mecanismo de defensa tipo-SAR y tipo-ISR en plántulas in vitro de cocotero. Como resultados de este estudio, se logró la caracterización molecular de genes homólogos clave que participan en la activación de una respuesta tipo-ISR, se obtuvo el perfil transcriptómico de genes se expresan en respuesta a la aplicación de SA, la validación por PCR en tiempo real del perfil transcriptómico, la caracterización sintomatológica de la interacciones entre Cocos nucifera L. vs Phytophthora capsici ante la aplicación de MeJA y caracterización sintomatológica de la interacción entre Cocos nucifera L. vs Phytophthora palmivora. Entre los genes caracterizados molecularmente están CnCHIB, CnCOI1 y CnMYC2. Se determinó la presencia de CnCHIB, CnCOI1, CnMYC2, CnNPR1, CnNPR3, CnPR2, CnPR3, CnPR5 y CnSERK en el transcriptoma. Se realizó la validación de TLP1, GUN6, WRKY51, WRKY57 y TRXM. Se observó que la aplicación de SA a plántulas in vitro por 48 h es capaz de inducir la expresión de numerosos genes homólogos que podrían estar participando en la activación de una respuesta inmune innata en la palma de cocotero. Así también, se observó que las plántulas con aplicación exógena de MeJA a presentaron menor daño (30%) causado por el patógeno, lo que sugiere la existencia de un posible mecanismo de defensa inducido tipo-ISR en palma de cocotero. Este estudio representa el primer análisis sobre la relación de los posibles mecanismos de defensa SAR e ISR en palma de cocotero.

ABSTRACT

Coconut palm is considered an economic important crop due to its many uses and products. However, despite being a crop with resistant ecotypes, it is affected by various diseases, reducing its productivity. On the other hand, plants have two main defense mechanisms capable of helping them fight these diseases. Systemic Acquired Resistance (SAR) and Induced Systemic Resistance (ISR), indicated by the accumulation of two phytohormones, Salicylic Acid (SA), and Jasmonic Acid (JA) respectively. Currently, there is little evidence of the presence of defense mechanisms in coconut. However, although studies have been reported the possible presence of a SAR-like defense mechanism in coconut, there is still no evidence about the ISR defense mechanism. Therefore, there is a need to carry out study strategies on defense mechanisms to combat the diseases that affect this crop. Based on the aforementioned, the purpose of this work was to evaluate the possible presence of some SAR-like and ISR-like defense mechanisms in vitro coconut plantlets. As results of this study, molecular characterization of key homologous genes that participate in the activation of an ISR-like response was achieved, the transcriptomic profile of genes differentially expressed in response to exogenous SA application was obtained, validation by real-time PCR of the transcriptomic profile, the symptomatic characterization of the interaction between Cocos nucifera L. vs Phytophthora capsici under MeJA application and symptomatic characterization of the interaction between Cocos nucifera L. vs Phytophthora palmivora. Among the molecularly characterized genes are CnCHIB, CnCOI1, and CnMYC2. The presence of CnCHIB, CnCOI1, CnMYC2, CnNPR1, CnNPR3, CnPR2, CnPR3, CnPR5, and CnSERK in the transcriptome was determined. TLP1, GUN6, WRKY51, WRKY57, and TRXM were validated. It was observed that the exogenous SA application to plantlets in vitro for 48 h is capable of inducing the expression of numerous homologous genes that could be participating in the activation of an innate immune response in the coconut palm. In addition, it was observed that plantlets with exogenous MeJA application presented less damage (30%) caused by the pathogen, which suggests the existence of a possible ISRlike defense mechanism in the coconut palm. This study represents the first analysis of the correlation between SAR and ISR defense mechanisms in the coconut palm.

INTRODUCCIÓN

La palma de coco (Cocos nucifera L.) es una planta que tiene la capacidad de vivir bajo condiciones bióticas y abióticas estresantes. Esta capacidad se le adjudica a que este cultivo ha desarrollado diversas estrategias para sobrevivir, una de éstas son los mecanismos de defensa, estos son capaces de proteger a la planta ante condiciones adversas. Estos mecanismos se dividen generalmente en dos tipos, los constitutivos y los inducidos (Blanco-Labra and Mancilla 2002). Los constitutivos representan las barreras físicas y químicas y los inducidos son aquellos que activa la planta ante el ataque de invasores externos, entre los más conocidos están el SAR (Resistencia Sistémica Adquirida) e ISR (Resistencia Sistémica Inducida) (Fu and Dong 2013; Pieterse et al. 2014). Estos mecanismos son capaces de combatir el ataque de patógenos importantes mediante la activación de rutas de señalización mediadas por fitohormonas, como el ácido salicílico (SA) y ácido jasmónico (JA), las cuales a su vez, inducen la expresión de genes de defensa específicos que promueven la resistencia de la plantas ante un amplio espectro de patógenos (Howe 2004; Gómez and Rodríguez 2012) como son los fitoplasmas, hongos, oomicetos, nematodos, virus, entre otros (Joseph and Radha 1975; Griffith 1987; Rohde et al. 1990; Cao Hui et al. 1994; Durrant and Dong 2004; Harrison and Oropeza 2008). Cada ruta de defensa, SAR o ISR, se activan de manera antagónica o sinérgica, de acuerdo a la naturaleza del patógeno (biotrofo, hemibiotrofo y necrotrofo) (Pieterse et al. 2014; Carvalhais et al. 2017; Cui et al. 2018) y a la acumulación de fitohormonas presentes durante el ataque (Pieterse et al. 2009). Además, el SA y el JA alteran la síntesis o señalización de otras hormonas tales como, auxinas, brasinoesteroides, etileno (ET), ácido abscísico (ABA), ácido giberélico (GA) entre otras, que se comunican entre ellas, proporcionando a la planta una eficaz capacidad para regular su respuesta inmune (Pieterse et al. 2009; Doornbos et al. 2011).

Actualmente, existe poca información relacionada a los mecanismos de defensa en la palma de cocotero, sin embargo, poco a poco, se han ido realizando trabajos que ayudan a comprender la posible presencia de un mecanismo de defensa contra patógenos (Lizama-Uc et al. 2007). Un primer estudio realizado por Zizumbo-Villarreal et al. (2008) ayudó a identificar variedades de cocotero con resistencia a fitoplasmas, sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado determinar la posible causa de ésta resistencia, por lo que se ha estado realizando diferentes estudios moleculares, con la

finalidad de entender si la causa de esta resistencia observada, es debido a un mecanismo de defensa previamente activado por la palma de cocotero. Estos estudios lograron reportar la presencia de genes candidatos a genes de resistencia, así como la presencia de genes homólogos a genes claves involucrados en la activación de una posible respuesta de defensa tipo SAR en plántulas *in vitro* de cocotero (Nic-Matos et al. 2017, Puch-Hau et al. 2015, Narváez, 2010. Tesis de maestría).

Con la finalidad de conocer los posibles mecanismos de defensa en el cultivo de cocotero, la estrategia llevada a cabo en este trabajo fue caracterizar molecularmente genes claves que participan en la ruta de activación de estas respuestas inducidas, analizar *in silico* y experimentalmente el perfil transcriptómico de genes involucrados en la defensa inducida por ácido salicílico y evaluar las respuestas de defensa en la interacción planta-patógeno, de *Cocos nucifera* L. inoculada con *Phytophthora capsici* y *Phytophthora palmivora*.

CAPÍTULO I

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 EL COCOTERO (Cocos nucifera L.)

El cocotero, también llamado palma de coco, tiene como nombre científico *Cocos nucifera* L., forma parte de la familia Arecaceae. La palma de coco es un árbol que alcanza una altura de 15-30 metros de altura y se caracteriza por tener inflorescencias que nacen de las axilas de las hojas con un eje central y hasta 40 ramas laterales por eje. La floración comienza entre los tres y cuatro años, existiendo algunas variedades que varían en su tiempo de floración, sin embargo una vez que se da la floración, la palma sigue floreciendo durante todo el año al mismo tiempo que da frutos, los cuales morfológicamente son ovoides y que se pueden diferenciar principalmente por el color amarillo o verde, siendo esta última característica la que permite diferenciar a groso modo las variedades o ecotipos de la palma (Ángel and Rámirez 2008). Es un cultivo originario de la costa del pacífico de América tropical que fue llevado hacia el oeste hasta Asia. Este cultivo está distribuido en las zonas tropicales de todo el mundo, en continentes como África, Asia, América Norte y Central, Oceanía y Sudamérica (FAO 2018).

De los principales países productores de cocotero en el mundo, el mayor porcentaje de área mundial cultivada lo tienen los países de Filipinas, Indonesia y la India con un 70% aproximadamente, siendo Filipinas el principal exportador a nivel mundial principalmente de aceite de coco (FAO 2018). En contraste, se reporta que Estados Unidos es el país con mayor importación de la producción de coco en el mundo (Singh and Puri 2020). México se encuentra dentro de los primeros diez lugares en cuanto a porcentaje de hectáreas cultivadas, con 185,708 ha que constituyen el 1.5% del porcentaje mundial (FAO 2018) (Tabla 1.1). La producción de coco en México se da en dos regiones, el golfo de México está representada por los estados de Quintana Roo, Veracrúz y Yucatán, la región del mar pacífico, la cual constituye aproximadamente el 77% de la producción en México, está representada por los estados de Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, y Sinaloa (Astudillo et al. 2019).

Posición	País	Área (ha)	% Área mundial
1	Filipinas	3,628,134	29.3
2	Indonesia	3,247,986	26.2
3	India	2,098,946	17.0
4	República Unida de Tanzania	799,910	6.5
5	Sri Lanka	455,330	3.7
6	Papúa Nueva Guinea	204,986	1.7
7	Brasil	198,715	1.6
8	Tailandia	194,448	1.6
9	México	185,708	1.5
10	Vietnam	154,684	1.2
Total mundial		12,381,051	

Tabla 1.1 Principales países productores de cocotero en el mundo.

1.1.2 IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA PALMA DE COCOTERO

La importancia económica de este cultivo radica en la amplia variedad de productos que pueden ser obtenidos a partir de éste, ya que se pueden utilizar todas las partes del cultivo, desde las hojas hasta las raíces, lo que le ha dado el distintivo de "Árbol de la Vida". Los más aprovechados son los frutos, de los cuales se utiliza el endospermo liquido o agua de coco, el endocarpio como fuente de combustible, el mesocarpio para fibra de coco y por último el endospermo sólido que se usa para la obtención de aceite (Lantican et al. 2019). (Figura 1.1). En los últimos años ha incrementado el consumo mundial del agua de coco como bebida para los deportistas y como bebida saludable para el bienestar humano, paralelamente la leche de coco, aceite virgen de coco, azúcar de coco, se encuentran catalogados como productos con propiedades beneficiosas para la salud, lo que ha incrementado su demanda mundial (Astudillo et al. 2019, Lantican et al. 2019). También está, el uso de la fibra de cocotero que se dado en la construcción como los geotextiles para el control de la erosión, mallas para pavimentos, empaques de alta duración, etc. y actualmente para hacer partes de autos (Astudillo et al. 2019). Otro subproducto es la copra de coco, que sirve para producir aceite de coco, que está constituido por ácido láurico (44-51%), ácido mirístico (13.1-18.1%), ácido palmítico (7.5-10.5%), ácido caproico (0.2-0.5%), ácido archidínico, ácido oleico y ácido linoleico, que le confieren características únicas y por ello actualmente se utiliza para la producción de biodiesel o también llamado cocodiésel, como una fuente alternativa de combustible (Singh and Puri 2020, Lao 2008).

Adicionalmente, la pulpa seca del coco restante del proceso de obtención de aceite se utiliza como producto alimenticio en forma de harina de coco (pca.da.gov.ph, 2016).



Figura 1.1 Usos y productos derivados de la palma de cocotero. Figura elaborada por Oropeza Salín Carlos, 2017.

1.1.3 ENFERMEDADES QUE AFECTAN AL CULTIVO DE COCOTERO

Lamentablemente, este cultivo se ha enfrentado a diferentes patógenos que han afectado gravemente la producción mundial, entre los agentes perjudiciales se encuentran a los virus, viroides, protozoos, hongos, nematodos (Rohde et al. 1990, Griffith 1987, Joseph and Radha 1975) y fitoplasmas que causan enfermedades tales como el anillo rojo, el ataque del mayate prieto y el ALC (Figura 1.2), esta última se estima que ha devastado miles de hectáreas de plantaciones de cocotero (Harrison and Oropeza 2008).

Por otro lado, el cultivo de cocotero presenta un problema global de plantaciones viejas con productividad decreciente y que, además, son susceptibles a

enfermedades. Una alternativa para la solución de estos problemas es el estudio integral del cocotero, abarcando, la mejora en las condiciones de cultivo, hasta investigar cuáles son las enfermedades que le afectan, además de la activación de los mecanismos de defensa en el cocotero, para enfrentar, estas enfermedades.



Figura 1.2 Principales enfermedades que afectan al cocotero. Elaboración propia y recuperado de Ángel and Rámirez 2008; Zizumbo-Villarreal et al. 2008; Dollet et al. 2012; Vargas 2019.

1.1.3.1 AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO

Como se mencionó anteriormente, una de las enfermedades de mayor importancia en el cocotero es el ALC, debido a que es una enfermedad destructora de palmas de cocotero, al no contar con métodos eficaces para el control de la enfermedad, en los últimos 50 años se han perdido millones de palmas, lo que ha provocado grandes pérdidas económicas. La afectación por el ALC se ha mostrado en millones de palmas de cocotero en diversos zonas tropicales del mundo, principalmente en Latinoamérica y el Caribe (Gurr et al. 2016), teniendo como consecuencia la fuerte afectación de la industria del cocotero. La sintomatología general que presenta la palma al ser infectada es la caída de los frutos, necrosamiento de las inflorescencias y finalmente la senescencia de las hojas (Maust et al. 2003). Esta enfermedad tiene como vector el insecto *Haplaxius crudus* y el patógeno que transmite este vector es un fitoplasma (Harrison et al. 1999) (Figura 1.2).

1.1.3.2 ANILLO ROJO

El anillo rojo es una de las principales enfermedades que ataca a la palma de cocotero y a otras palmas de importancia económica como la palma de aceite (Dollet et al. 2012). Esta enfermedad de reportó por primera vez en Brasil, sin embargo, se ha extendido por varias regiones del mundo limitando la producción de la palma de coco (Griffith 1987; Dollet et al. 2012). En México la presencia de esta enfermedad se reportó desde 1951 (del Prado-Vera et al. 2018). La sintomatología típica de esta enfermedad en la palma de coco se presenta con caída prematura de los frutos, marchitamiento de las inflorescencias, amarillamiento o necrosis en las hojas, sin embargo el principal síntoma se presenta a nivel de tallo, el cual al seccionarlo transversalmente muestra un anillo rojo, finalmente las palmas de coco afectadas por esta enfermedad mueren aproximadamente a los dos meses de ser infectadas (Griffith 1987). El agente causal es Bursaphelenchus cocophilus, el cuál es un nematodo que se puede encontrar en cualquier etapa del desarrollo de la enfermedad y que es transmitido por el vector llamado Rhynchophorus palmarum, llamado comúnmente "picudo de la palma de coco", que facilita la colonización de este endoparásito en varias palmas al mismo tiempo (Griffith 1987; Dollet et al. 2012; del Prado-Vera et al. 2018) (Figura 1.2).

1.1.3.3 PUDRICIÓN DE COGOLLO

La pudrición de cogollo es una enfermedad causada por oomicetos del género *palmivora*, está de especial importancia debido que debilita a la palma de coco hasta provocar su muerte causando grandes pérdidas económicas debido a que afecta a palmas jóvenes desde que se encuentran en viveros o hasta aquellas que ya se encuentran en campos (Rajeswari et al. 2020). Esta enfermedad se reportó en las islas del Gran Caimán, posteriormente se fue esparciendo por todo el mundo en lugares como Jamaica, Puerto Rico, África, Malasia, Filipinas, India, Sri Lanka, América central entre otros (Dollet et al. 2012). En México aún no se cuenta con un estudio oficial donde se reporte pudrición de cogollo en palma de coco. La sintomatología principal se muestra con el amarillamiento inicial de las hojas maduras, hasta llegar al coloramiento café pardo, extendiéndose hasta el cogollo de la palma, la caída de frutos y finalmente la hoja espada tiende a mostrar una inclinación debido a la podredumbre interna, causando una muerte inevitable a las palmas (Vargas 2019).

La pudrición de cogollo es una enfermedad que se produce normalmente por oomicetos de genero *Phytophthora*, de los cuales se conocen hasta ahora 100 especies que afectan a diversos cultivos de importancia económica, por ejemplo *Phytophthora palmivora* que afecta principalmente a las palmas de coco y aceite (Joseph and Radha 1975; Dollet et al. 2012; Rajeswari et al. 2020) (Figura 1.2).

1.1.4 MANEJO INTEGRAL DEL CULTIVO DE COCOTERO

1.1.4.1 PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN INTEGRAL DE COCOTERO EN CICY

En la Unidad de Biotecnología (UBT) del CICY, específicamente en el laboratorio de cocotero, se han realizado varios proyectos de investigación novedosos e importantes para el desarrollo integral del cultivo del cocotero, entre las líneas de investigación se encuentran, el cultivo *in vitro* del cocotero, donde a la fecha se ha logrado el desarrollo de un protocolo para la micropropagación de plantas de cocotero a partir de tejidos como plúmula e inflorescencias, con este protocolo se pueden obtener plantas seleccionadas por su resistencia a las enfermedades y por su alta productividad, llegando a producir una gran cantidad de estas plantas en un menor tiempo.

Otro tema de estudio es el ALC y el modo de acción de esta enfermedad, en donde se han realizado estudios sobre los efectos fisiológicos y bioquímicos que causa en la planta, métodos de detección, estudios de transmisión, evaluación de variedades resistentes al ALC y estudios de los mecanismos de defensa como son la respuesta sistémica adquirida (SAR) y los análogos de genes de resistencia (RGAs). Además, se han llevado a cabo estudios sobre el aprovechamiento integral del cocotero y se está trabajando con la cadena productiva con el fin de mejorar las condiciones de cultivo, apoyando asesoría técnica para el manejo de las plantaciones, replantación para mejorar la producción y la comercialización del cocotero (ver figura 1.3).



Figura 1.3 Líneas de investigación integral de cocotero en CICY. Elaboración propia.

1.1.4.1.1 BÚSQUEDA DE ECOTIPOS RESISTENTES

En la búsqueda de ecotipos resistentes, Zizumbo y colaboradores (Zizumbo-Villarreal et al. 2008), realizaron un ensayo, en el cual colocaron palmas de la variedad Enano Malayo Amarillo, Alto del Pacífico Mexicano y Alto del Atlántico Mexicano (MYD, MXPT y MXAT, por sus siglas en inglés) en una plantación afectada por el ALC, con el fin de observar cuál de las variedades presentaban resistencia a la enfermedad, los resultados que se obtuvieron muestran que las variedades que mostraron un cierto nivel de resistencia fueron Enano Malayo Amarillo y Alto del Pacífico Mexicano, ya que se observó que el tiempo de muerte era mayor comparado con la variedad que se catalogó como susceptible, Alto del Atlántico Mexicano (Figura 1.4), la cual mostraba palmas muertas en un rápido lapso de tiempo (Zizumbo-Villarreal et al. 2008). Este estudio ha orientado la investigación del cocotero hacia la producción de híbridos que muestren resistencia al ALC, y como se mencionó anteriormente, también se han desarrollado protocolos de micropropagación mediante embriogénesis somática de estos ecotipos. También se presenta el interés de estudiar a fondo los ecotipos resistentes debido a la posibilidad de que la resistencia de estos, este dada por algún mecanismo de defensa que se activa al ser infectada la palma de coco con el patógeno, en este caso los fitoplasmas. Por lo que también, podría ser objeto de estudio el estudio de genes claves para la activación de estos mecanismos de defensa.



Figura 1.4 Grafica de mortalidad. Se puede observar el grado de mortalidad de las diferentes variedades probadas, MYD (enano malayo amarillo), MXPT1 y MXPT2 (alto del pacífico mexicano 1 y 2), presentaron menor mortalidad ante la enfermedad del ALC (Zizumbo-Villarreal et al. 2008).

1.1.5 MECANISMOS DE DEFENSA EN PLANTAS

Las plantas, al igual que el ser humano tienen un sistema inmune innato, este sistema inmune ha sido ampliamente estudiado a lo largo de los años ya que confiere a las plantas una increíble capacidad de defensa ante el ataque de patógenos de todas las naturalezas, como lo son los biotrofos, que se alimentan de células vivas de su planta hospedante, los necrotrofos, que se nutren a partir de células muertas y los hemibiotrofos, que tienen ambas características (Pieterse et al. 2014; Carvalhais et al. 2017; Cui et al. 2018). También cabe mencionar que las plantas poseen sistemas de defensa ante el ataque de plagas (Chini et al. 2009; Zhang et al. 2015). Estos mecanismos de defensa con complejos y no están basados en un solo componente, más bien son una combinación de acciones internas que tiene la planta para modificar su metabolismo y contrarrestar el ataque del patógeno o plaga. Es importante mencionar que la planta ya posee un sistema de defensa con características

preexistentes, este sistema se le conoce como constitutivo y al sistema que se activa ante el ataque de un patógeno se le conoce como inducido (Blanco-Labra and Mancilla 2002).

El sistema de defensa constitutivo se subdivide a su vez en físico, con componentes como la pared celular, ceras, tricomas, suberinas, entre otros, y al sistema químico se le atribuyen alcaloides, glucósidos, enzimas inhibidoras, es decir, está basado en compuestos biológicamente activos (Pieterse et al. 2009; Fawke et al. 2015). Cabe mencionar que la defensa constitutiva también puede ser incrementada ante el ataque de un patógeno, lo que la convierte en un mecanismo de defensa inducido, un ejemplo es la lignina (Zehra et al. 2017). Por último cabe mencionar que el mecanismo de respuesta de defensa en algunas plantas es semejante frente a cualquier tipo de estrés, ya sea biótico como un patógeno de hongo, virus, nematodo, bacteria, fitoplasma, insecto, viroides, ácaro o abiótico como helada, sequía, salinidad, fitotoxicidad, alta temperatura (Vlot et al. 2009; Gómez and Reis 2011; Pieterse et al. 2014; Barre et al. 2019). Sin embargo, durante el proceso evolutivo, las plantas han desarrollado adaptaciones que les han permitido establecerse de manera exitosa (ver figura 1.5).



Figura 1.5 Mecanismos de defensa en plantas (Durrant and Dong 2004; Vlot et al. 2009; Fu and Dong 2013; Pieterse et al. 2014).

1.1.5.1 MECANISMOS DE DEFENSA INDUCIDOS

La defensa inducida se activa, ante el ataque de un patógeno o ante estímulos externos como los inductores (Blanco-Labra and Mancilla 2002). Existen diferentes mecanismos de respuesta inducida, los principales se pueden dividir en SAR y la ISR, mencionadas anteriormente (Figura 1.5), estos mecanismos generalmente comienzan por medio de la respuesta hipersensible (RH) que se caracteriza por la muerte celular estimulada por especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células infectadas y en respuesta la planta reacciona acumulando metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y enzimas hidrolíticas (Collinge et al. 2001). Además se relaciona la RH en el mecanismo SAR, con la acumulación de fitoalexinas, lignina, suberina, hidroxiprolina y proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Ezziyyani et al. 2005; Albertazzi et al. 2009; Zehra et al. 2017).

1.1.5.1.1 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA

En un estudio se mostró que en plantas de tabaco con virus del mosaico (TMV, siglas en inglés) desarrollaron subsecuentemente resistencia secundaria en tejidos distales (Van Loon and Van Kammen 1970). Esta propagación de la resistencia en todos los tejidos de la planta fue denominada resistencia sistémica adquirida (SAR). Ahora se sabe que SAR puede ser activada en muchas especies de plantas por patógenos que causan necrosis, ya sea como parte de HR o como síntomas de la enfermedad (Fu and Dong 2013). La SAR, es una respuesta inducida por el aumento en la concentración de la fitohormona SA, la cual se inicia su acumulación por el ataque de patógenos como, hongos, bacterias, virus y fitoplasmas, entre otros (Durrant and Dong 2004; Pieterse et al. 2009; D'Amelio et al. 2010). Esta respuesta de defensa está señalizada mediante la acumulación de SA y el transporte sistémico de metil-salicilato (MeSA), éster del SA, a través de los tejidos distantes de las plantas, finalizando con la expresión de proteínas relacionadas a la patogénesis (PRs), entre otros genes (Vlot et al. 2009). La SAR, es una respuesta de larga duración debido a la memoria inmune de las plantas (Fu and Dong 2013), contra un amplio espectro de diferentes patógenos y se dispersa por la planta en dirección apical hacia las yemas, provocando un engrosamiento de la pared celular y síntesis de fitoalexinas (Camarena-Gutiérrez and Torre-Almaráz 2007; Fu and Dong 2013).
La transducción de las señales en SAR se da por medio de una infección primaria a nivel local, la cual desencadena la muerte celular programada de las células infectadas, al mismo tiempo se da la producción de SA por medio de enzimas de biosíntesis de SA, como la isocorismato sintasa (ISC) (Durrant et al. 2007), posteriormente se producen señales móviles de los análogos de SA, como el MeSA (Vlot et al. 2009) entre otros. La acumulación de SA modifica las reacciones redox en la célula y provoca la translocación hacia el núcleo de NPR1 (Ding et al. 2018), el cual interactúa con factores de transcripción para activar la expresión de genes de los defensa mencionados anteriormente (Fu and Dong 2013) (Figura 1.6).



Figura 1.6 Resistencia sistémica adquirida. Figura editada de Fu and Dong 2013.

En resumen SAR es un mecanismo de defensa inducido que confiere protección contra un gran número de microorganismos, requiere de una molécula señalizadora el ácido salicílico y es asociado con la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) las cuales contribuyen a la resistencia de larga duración (Durrant et al. 2007; Fu and Dong 2013).

1.1.5.1.2 RESISTENCIA SISTÉMICA INDUCIDA

La ISR es potencializada por bacterias rizógenas promotoras de crecimiento (PGPR) o por HFMA (Van Wees et al. 2008), este tipo de defensa no involucra la síntesis de proteínas PR y la ruta de señalización a realiza a través de jasmonatos y etileno, algunos de los genes de defensa que se expresan tienen funciones distintas comparados con los expresados en la respuesta de defensa SAR (Pieterse et al. 2014; Carvalhais et al. 2017). Se reporta un amplio espectro de efectividad que puede ser inducido por organismos patógenos y activado en órganos distantes de una planta en respuesta a una infección localizada (Howe 2004).

En esta respuesta, el ácido jasmónico y el etileno juegan un papel importante y la eficiencia en la regulación de la respuesta dependen del tipo específico de planta, la cantidad de hormona y el tiempo de identificación de la señal que produce la activación de genes de defensa (Figura 1.7). La mayoría de los genes de respuesta vía ácido jasmónico activados por cada atacante son específicos para la combinación planta-patógeno, una estrategia de conocer estos mecanismos es aplicar el ácido jasmónico para evaluar las estrategias empleadas por la planta frente a patógenos (Carvalhais et al. 2017).

La figura 1.7 muestra una representación esquemática de la regulación de la vía de señalización de JA en un estado inducido y en un estado no inducido; en este último la concentración de JA se encuentra a nivel basal, por lo cual COI1 no se une a JAZ, evitando así la expresión de genes de respuesta de defensa, por el contrario en un estado inducido, el aumento de la concentración de JA provoca la formación de un complejo entre COI1 y JAZ que promueve la degradación de JAZ y permite la liberación de *MYC2*, regulador maestro de la señalización vía JA contra estrés biótico y abiótico (Chini et al. 2009; Pieterse et al. 2009; Carvalhais et al. 2017).



Figura 1.7 Representación esquemática del estado no inducido e inducido de ISR. Modificado de Chini et al. 2009.

La inducción de esta respuesta se puede llevar a cabo de tres maneras, principalmente por la interacción de la planta con microorganismos no patógenos, se puede inducir mediante el ataque de un patógeno, también por el ataque de insectos herbívoros y mediante la aplicación exógena de metil jasmonato. En en caso de los microorganismos benéficos se utiliza el término "priming", que se refiere a que en las plantas en estado de "priming" las respuestas de defensa no son activadas directamente por el agente del priming, pero son aceleradas después de la percepción de la señal de estrés, aumentando el nivel de resistencia (Van Wees et al. 2008; Pieterse et al. 2014). En la naturaleza cuando un patógeno ataca a la planta este mecanismo de defensa evita que se lleve a cabo la infección (Figura 1.8).

Adicionalmente, se han encontrado una relación entre los niveles de ácido jasmónico en tejidos de plantas micorrizadas con la protección tanto a nivel local como sistémico, esto sugiere que la simbiosis planta-HFMA, es una interacción benéfica (Pieterse et al. 2014) ya que las plantas presentan respuesta de defensa frente a posibles organismos patógenos (Gómez and Rodríguez 2012).



Figura 1.8 Resistencia sistémica inducida. Se presentan los tres métodos por los cuales se induce ISR. Figura editada de Carvalhais et al. (2017).

1.1.6 GENES INVOLUCRADOS EN MECANISMOS DE DEFENSA DE PLANTAS

Estudios evidencian la expresión de genes asociados con el mecanismo de defensa ISR, relacionados con la ruta de ácido jasmónico, como podemos ver este es el enfoque actual de los estudios de mecanismos de defensa. Entre los genes especialmente reportados están los factores de transcripción, los genes análogos de resistencia y por supuesto las proteínas relacionadas con la patogénesis (Pieterse et al. 2009, 2014; Vlot et al. 2009; Doornbos et al. 2011; Kazan and Manners 2013). Los factores de transcripción han sido ampliamente relacionados con las defensa de las plantas, ya que son proteínas que inducen o reprimen la expresión de genes clave en las rutas metabólicas relacionadas con las defensas inducidas (Desveaux et al. 2004; Fan et al. 2015; Cui et al. 2018).

Los genes análogos de resistencia son un tipo de genes R que son usados principalmente como marcadores de resistencia o susceptibilidad en cultivos de importancia económica, debido a sus características estructurales y dominios conservados (Puch-Hau et al. 2015, 2016). Por su parte las proteínas relacionadas con la patogénesis son las más ampliamente estudiadas, y han sido identificadas al menos 17 familias presentes en las plantas, con funciones de quitinasas, glucanasas, peroxidasas, entre otras (Balconi et al. 2012). Actualmente se están haciendo estudios en la búsqueda de otro tipo de genes que se relacionen directamente con la defensa de las plantas, por ejemplo en un estudio realizado por Jiang et al. (2016) sugiere que hay una comunicación cruzada entre las vías de señalización para los genes que activa ISR y SAR, específicamente el gen NPR1, conocido como el regulador maestro de la respuesta de defensa SAR (Durrant and Dong 2004).

En la figura 1.9 se observa la representación esquemática de los componentes y mecanismos moleculares, así como los genes, implicados en la resistencia sistémica adquirida, inducida por patógenos (SAR), la resistencia inducida por herbívoros (HIR) y la resistencia sistémica inducida (ISR) desencadenada por microorganismos beneficiosos del suelo. Las líneas negras continuas indican interacciones establecidas; las líneas discontinuas negras indican interacciones hipotéticas. Las flechas de colores indican la translocación sistémica de las señales moleculares o eléctricas de larga distancia (indicadas en el mismo color en la base de las flechas) (Pieterse et al. 2014).



Figura 1.9 Esquema representativo de las respuestas de defensa inducibles. De izquierda a derecha SAR, HIR e ISR. ABA, ácido abscísico; Ac, acetilación; DAMP, patrón molecular asociado al daño; ET, etileno; ETI, inmunidad desencadenada por efectores; Fe, hierro; HAMP; patrón molecular asociado a herbívoro; JA, ácido jasmónico; MAMP, patrón molecular asociado a microbio; Yo, metilación; NB-LRR, repetición rica en leucina que se une a nucleótidos; PCD, muerte celular programada; PRR, receptor de reconocimiento de patrones; PTI, inmunidad activada por PAMP; SA, ácido salicílico; TF, factor de transcripción; MO, microorganismos. Figura tomada de Pieterse et al. (2014).

1.1.7 USO DE HERRAMIENTAS ÓMICAS PARA EL ESTUDIO DE MECANISMOS DE DEFENSA

Una alternativa ampliamente usada para el estudio de la defensa en las plantas es el uso de las herramientas ómicas, como son la genómica, metabolómica, proteómica y transcriptómica, las cuales se caracterizan por el análisis masivo de datos de la especie en estudio (Guo et al. 2014; Xoca-Orozco et al. 2017; Lantican et al. 2019) contribuyendo en la generación de conocimiento relacionado con los mecanismos internos de defensa que utilizan las plantas ante el ataque de un patógeno, permitiendo con ello comprender las enfermedades de las plantas.

1.1.7.1 ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS

El estudio del transcriptoma se hace por medio de RNA-Seq, una herramienta útil y poderosa para el análisis de los niveles de expresión de genes de especies de plantas a una condición particular, permitiendo obtener una gran cantidad de información a un nivel genómico (Trapnell et al. 2010; Grabherr et al. 2011), lo cual es de gran importancia para el conocimiento y manipulación de cultivos resistentes a enfermedades, así como el de la interacción planta-patógeno.

En *Cocos nucifera* L. diversos estudios reportan el análisis transcriptómico por medio de RNA-Seq del cultivo de cocotero, generando conocimiento de genes que participan en el metabolismo de ácidos grasos, acerca de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos, la metilación del DNA en la maduración del endospermo, en la respuesta ante fitoplasmas y durante la embriogénesis somática (Fan et al. 2013; Huang et al. 2014; Nejat et al. 2015; Rajesh et al. 2016). Estos datos en conjunto con el análisis transcriptómico de cocotero expuesto a SA (Estudio actual), proporcionaría una base para análisis más detallados que pueden ayudar a las estrategias de mejoramiento molecular dirigidas a mejorar este importante cultivo tropical.

1.1.8 ESTUDIOS RELACIONADOS CON MECANISMOS DE DEFENSA EN COCOTERO

Actualmente, se tienen pocos reportes sobre los mecanismos de defensa en cocotero. Aunado a esto, los estudios reportados se han relacionado directamente con el mecanismo SAR y no a ISR. Por ejemplo en un estudio realizado por Lizama-Uc et al. (2007) encontraron que la adición de ácido salicílico a los callos de cocotero adicionados con quitosano para imitar la interacción que ocurre con un patógeno, influye en el mecanismo de respuesta de defensa del cocotero activando algunos genes que podrían ser expresados en respuesta al ataque de uno o más patógenos.

Por otro lado, Narváez Cab (2010), aportó de manera importante al entendimiento de cómo funcionan los mecanismos de defensa en cocotero, evaluando la presencia del mecanismo de defensa SAR inducido a partir de ácido salicílico en plantas de cocotero expuestas al patógeno *Phytophthora capsici*, mostrando como resultados que un sistema de plantas *in vitro* interactuando con un patógeno funciona como modelo para la evaluación de mecanismos de defensa; además, se encontró parcialmente la secuencia de un gen homólogo al gen NPR1 de *Arabidopsis thaliana* en cocotero, lo que podría sugerir que el mecanismo SAR podría estarse utilizando como mecanismo de defensa en la palma de cocotero.

Posteriormente Puch-Hau et al. (2015) analizaron 80 secuencias análogas a genes de resistencia por medio de análisis *in silico*, resultado en la presencia de los motivos característicos de las proteínas de resistencia del tipo NBS-LRR, los resultados del análisis filogenético agrupó a los genes de resistencia dentro de la familia Non-TIR-NBS-TRR. Finalmente, Nic-Matos et al. (2017), reportaron la presencia de dos genes homólogos a NPR1 de *A. thaliana* y otras especies (ver tabla 1.2)

Tabla 1.2 Trabajos de investigación relacionados con mecanismos de defensa en cocotero.

Estudio	Autor	
Aplicación de quitosano en callos de Cocos nucifera L.		
como alternativa para el estudio de las interacciones	Lizama-Uc et al. 2007	
entre la palma de coco y sus patógenos asociados.		
Evaluación de la presencia de la respuesta SAR en	Narváez, 2010 (Tesis de maestría)	
Cocos nucifera L. infectada con Phytophthora capsici.		
Clonación y caracterización molecular de secuencias de	Puch-Hau et al. 2015	
genes candidatos a resistencia (RGCs).		
Clonación y caracterización de genes homólogos clave		
en SAR (NPR1 y NPR3) y el análisis de expresión ante	Nic-Matos et al. 2017	
la aplicación de ácido salicílico (SA).		

En base a los antecedentes antes mencionados, es evidente la necesidad de la búsqueda de información que aclare cuales son los mecanismos de defensa de la planta de cocotero, valiéndose en la información reportada de que la interacción planta-patógeno desencadena una activación de los mecanismos SAR e ISR se propone realizar el estudio de los genes que pudieran expresarse como respuesta de defensa ante la inducción con SA y MeJA y el estudio de la interacción de la palma de coco con patógenos de genero *Phytophthora*.

1.2 JUSTIFICACIÓN

El cocotero es un cultivo de importancia mundial, sin embargo, es atacado por diversos patógenos limitando la sobrevivencia o afectando su productividad. Algunas plantas han desarrollado mecanismos de defensa capaces de combatir a estos patógenos, como son la resistencia sistémica adquirida (SAR) y la resistencia sistémica inducida (ISR). Dichas respuestas son mediadas por las fitohormonas SA y JA/ET, respectivamente. Por lo tanto, sería de suma importancia conocer si ambas fitohormonas son capaces de inducir cambios en la expresión de genes homólogos clave, que activan dichos mecanismos de defensa en plántulas de *Cocos nucifera* L., generando así, nuevo conocimiento en la búsqueda de alternativas para el control de enfermedades.

1.3 HIPÓTESIS

1.3.1 La aplicación de ácido salicílico (SA) en plántulas *in vitro* de cocotero es capaz de inducir cambios en los niveles de expresión de diferentes genes involucrados en la activación de la resistencia sistémica adquirida (SAR).

1.3.2 La aplicación de metil jasmonato (MeJA) en plántulas *in vitro* de cocotero es capaz de inducir la expresión de genes clave involucrados en la activación de la resistencia sistémica inducida (ISR).

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

1.4.1.1 Caracterizar la expresión *in silico* y molecular de genes homólogos que participan en la activación de la respuesta SAR, a partir del transcriptoma de plántulas de cocotero expuestas SA y caracterizar la expresión molecular de genes clave que participan en la activación de la respuesta ISR en plántulas expuestas a MeJA.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.4.2.1 Identificar en la literatura y en el transcriptoma de plántulas de cocotero, secuencias de genes homólogos que participan en la activación de las respuestas de defensa SAR e ISR.

1.4.2.2 Diseñar Sondas Taqman y cebadores específicos a partir de las secuencias previamente identificadas para el estudio de su expresión por PCR tiempo real.

1.4.2.3 Determinar el perfil transcriptómico de los genes que se expresan diferencialmente en respuesta a la inducción con SA y validar por PCR tiempo real los resultados obtenidos.

1.4.2.4 Inocular plántulas de cocotero previamente expuestas a MeJA con los patógenos *Phytophthora capsici* y *Phytophthora palmivora* para determinar mediante sintomatología la posible a presencia de una respuesta tipo ISR.

1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Figura 1.10 Estrategia experimental general del trabajo de investigación.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR E *in silico* DE GENES QUE PARTICIPAN EN UNA RESPUESTA TIPO-ISR EN Cocos nucifera L.

2.1 INTRODUCCIÓN

El cocotero es un cultivo capaz de proporcionar casi todas las necesidades básicas de la vida en las regiones tropicales, tales como alimentos, bebidas, aceite, fibra para construcción, entre otros, lo cual lo convierte en una fuente importante en la generación de empleos e ingresos de divisas. Sin embargo, el cultivo de cocotero es severamente afectado por plagas y enfermedades en diferentes etapas de su desarrollo, limitando la producción tanto para los pequeños productores, como a las grandes empresas, causando grandes pérdidas económicas. Por lo tanto, existe una necesidad de estudiar amenazas bióticas en el cocotero y diseñar estrategias para combatirlas. Las herramientas moleculares son útiles y esenciales para comprender y desarrollar estrategias de control. Se sabe que las plantas contienen genes que, al inducir su expresión, activan un sistema de defensa en toda la planta que le permite evitar o contrarrestar el ataque de organismos patógenos. Estos genes de defensa, son inducidos por la señalización de hormonas como el SA, JA y ET (Van Wees et al. 2008) activando mecanismos de defensa conocidos como SAR (Resistencia Sistémica Adquirida) e ISR (Resistencia Sistémica Inducida), que regulan la expresión de una gran variedad de genes de defensa con diferentes estructuras y funciones, entre ellos tenemos PRs, RGCs, FTs (Durrant and Dong 2004; Zhang et al. 2016; Belgacem et al. 2019). El presente trabajo tuvo como finalidad la caracterización molecular e in silico de genes que participan en la inducción de respuestas de defensa en la palma de cocotero, tales como CnCHIB, CnCOI1, CnMYC2, CnNPR1, CnNPR3, CnPR2, CnPR3, CnPR5 y CnSERK, generando nuevo conocimiento en el mecanismo de defensa ISR en palma de coco.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 CARACTERIZACIÓN *in silico* DE GENES CLAVE EN LA RESPUESTA ISR

Los genes fueron seleccionados con base en: a) la literatura, b) la base de datos NCBI (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov</u>), c) la base de datos Gene Ontology Consortium (http://www.geneontology.org) y d) los programas bioinformáticos GENEIOUS (Kearse et al. 2012) y PrfectBLAST (Santiago-Sotelo and Ramirez-Prado 2012) utilizando los parámetros por defecto. Se utilizaron los datos del transcriptoma de cocotero de plántulas in vitro expuestas a SA, el cual se construyó mediante la tecnología de secuenciación Illumina RNA-Seq, con un rendimiento total de 215,438,020 lecturas, que al ensamblarse se obtuvieron 150,486 transcritos con aproximadamente 809 bp de longitud (Datos no publicados). Se hizo la búsqueda de las secuencias de CnCHIB. CnCOI1 y CnMYC2, del transcriptoma de cocotero. Posteriormente, se compararon por medio del BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) con genomas de especies cercanas como Elaeis guineensis y Phoenix dactylifera, además de Arabidopsis thaliana. En cuanto a CnNPR1, CnNPR3 y CnSERK, estos genes ya han sido caracterizados en estudios anteriores (Nic-Matos et al. 2017; Rivera-Solís et al. 2018). En el caso de CnPR2, CnPR3 y CnPR5 las secuencias de los genes fueron tomados de Nejat et al. 2015.

2.2.2 DISEÑO DE CEBADORES Y SONDAS

Los cebadores y sondas fueron diseñados con los programas OligoPerfect Primer Filebuilder v.3.1 Thermo Fisher Designer V de Scientific (https://www.thermofisher.com), utilizando los parámetros por defecto. Se diseñaron cebadores específicos para el análisis de expresión de CnCHIB, CnCOI1 y CnMYC2. En el caso de CnPR2, CnPR3 y CnPR5 los cebadores de la literatura (Nejat et al. 2015). Las sondas de CnCHIB y CnMYC2 se diseñaron mediante un alineamiento de secuencias homólogas con los programas Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk) y (http://www.ch.embnet.org/software/BOX form.html), BoxShade utilizando los parámetros por defecto. En cuanto a CnCOI1 se diseñaron con la ayuda de softwares previamente mencionados. En cuanto a CnNPR1, CnNPR3 y CnSERK fueron tomados de la literatura (Nic-Matos et al. 2017; Rivera-Solís et al. 2018).

2.2.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES CnCHIB, CnCOI1, CnMYC2, CnNPR1, CnNPR3, CnPR2, CnPR3, CnPR5 y CnSERK

Los genes *CnCHIB*, *CnCOI1* y *CnMYC2*, fueron amplificados por PCR, empleando DNA genómico y cDNA de cocotero. En la tabla 2.1 se observa los volúmenes y concentraciones de la mezcla de reacción (ver tabla 2.1).

Tabla 2.1 Reactivos utilizados para la amplificación por PCR de los cebadores de*CnCHIB, CnCOI1* y *CnMYC2* en DNA genómico y cDNA.

Reactivos	Volumen
Agua estéril	12.3 μL
5X Buffer (-MgCl ₂)	5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1 µL
Mezcla de dNTPs (10 mM)	0.5 μL
Cebador Forward (10 pmol/µL)	2 µL
Cebador Reverse (10 pmol/µL)	2 µL
Mango Taq DNA Polymerase (5 U/µL)	0.2 µL
DNA genómico o cDNA	2 µL
Volumen Total	25 μL

Se probaron seis temperaturas diferentes de hibridación (62°C, 61°C, 59°C, 58°C, 56°C y 55°C) con la finalidad de encontrar una temperatura idónea para cada gen (ver tabla 2.2). Posteriormente se realizó la curva estándar para cada uno de ellos (*CnPR2*, *CnPR3*, *CnPR5*, *CnNPR1*, *CnNPR3* y *CnSERK*) y finalmente para el estudio de expresión.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	5 minutos	1
95	30 segundos	
55	30 segundos	35
72	1 minuto	
94	30 segundos	
56	30 segundos	35
72	1 minuto	
94	30 segundos	
58	30 segundos	35
72	1 minuto	
94	30 segundos	
59	30 segundos	35
72	1 minuto	
94	30 segundos	
61	30 segundos	35
72	1 minuto	
94	30 segundos	
62	30 segundos	35
72	1 minuto	
72	10 minutos	1

Tabla 2.2 Condiciones de temperatura empleadas para la amplificación de *CnCHIB, CnCOI1 y CnMYC2.*

2.2.3.1 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE CnMYC2

El producto amplificado de *CnMYC2* fue purificado con el kit QIAquick (QIAGEN) y posteriormente ligado al vector de clonación pGEM-T-Easy (Promega) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Posteriormente, el producto se clonó en *Escherichia coli* y se creció en medio LB (Luria Bertani), adicionado con ampicilina (100 mg/L). Se seleccionaron las colonias transformadas y se crecieron en medio LB líquido por 16 h. Seguidamente se realizó una PCR punto final con los cebadores M13 (sentido y antisentido), para la confirmación de la transformación. Finalmente se extrajo el plásmido mediante el kit MiniPrep QIAprep (QIAGEN), visualizándolo en agarosa al 1% con el marcador HighMass (Invitrogen). Las muestras obtenidas se enviaron para su secuenciación a Davis Sequencing (Universidad de Davis, California).

2.2.4 EXTRACCIÓN DE RNA

El RNA fue extraído por medio de una adaptación de método CTAB (Doyle and Doyle 1987) y utilizando el Plant/Fungi Total RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp). Los tejidos de hoja y raíz (500 mg) fueron pulverizados con nitrógeno líquido (N2).

Después se adicionaron 3 mL de la mezcla de buffer CTAB (2% CTAB, 2% PVP, 100 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 2 m NaCl y 0.5 g/L de espermidina) y 1-tioglicerol (10 μ L/mL) incubando la muestra por 10 minutos a 65°C. Después, 1 mL de la mezcla (tejido y buffer) fue transferido a un tubo Eppendorf de 2 mL. Se adicionó 600 μ L de la mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos. Luego se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo de Eppendorf de 2 mL y se agregó 1 volumen de etanol al 70% (-20°C) + 100 μ L, se mezcló suavemente y se incubó a -20°C por 30 minutos.

Posteriormente, se procedió con el kit de extracción de acuerdo a las sugerencias del proveedor. El sobrenadante se transfirió a unas columnas llamadas Spin Column (Plant/Fungi Total RNA Purification Kit) y centrifugado a 6,000 rpm por 1 minuto. El filtrado fue desechado. Luego, se adicionaron 400 μ L de Wash solution A (suministrado por el proveedor) se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 1 minuto y se desechó el filtrado (este paso se repitió tres veces). Entonces, se centrifugó por 2 minutos a 14000 rpm para secar. Finalmente se colocó la columna en un tubo de 2 mL, se añadió 40 μ L de "Elution solution A" (suministrado por el proveedor) y se centrifugó por 2 minutos a 14000 rpm (se tomó el filtrado, se colocó de nuevo en la columna y se centrifugó de nuevo para obtener la mayor cantidad de RNA posible). Se realizó un gel de agarosa al 1.5% para comprobar la extracción. Se guardó a -20°C para su posterior uso.

2.2.4.1 TRATAMIENTO CON DNAsa

El RNA fue tratado con DNAsa (DNA-free Protocol), mezclando 15 μ L de RNA extraído con 3 μ L de buffer (provisto por el kit) y 1 μ L de DNAsa y se incubó a 37°C por 1 hora. Luego para inactivar la enzima, se agregó a la mezcla 4 μ L de inactivador y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y después se centrifugó durante 1 minuto a 10,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y la integridad del RNA fue observada en un gel de agarosa al 1.5% en una cámara electroforética a 95V y 175A.

2.2.5 SÍNTESIS DE cDNA

El cDNA se sintetizó a partir de 1 µg de RNA total empleando la transcriptasa reversa provista por el Kit de Thermo Scientific (RevertAid H Minus M-MuL V Reverse). La síntesis del cDNA se realizó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor.

2.2.6 ANÁLISIS DE EFICIENCIA Y ESPECIFICIDAD DE CEBADORES Y SONDAS DISEÑADOS

2.2.6.1 CURVA ESTÁNDAR PARA CnCHIB, CnCOI1, CnMYC2, CnNPR1, CnNPR3, CnPR2, CnPR3, CnPR5, CnSERK y 18S

Se realizó la curva estándar, de los cebadores (*CnCOI1*, *CnPR2*, *CnPR3* y *CnPR5*) y de las sondas (*CnMYC2*, *CnCHIB*, *CnNPR1* y *CnSERK*), para determinar la eficiencia y especificidad de cada uno de estos por medio de la amplificación en PCR tiempo real. Paralelamente se realizó la curva estándar del control interno, el gen constitutivo 18S. Para esto, se realizaron una serie de diluciones de cDNA de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} . En la tabla 2.3 se observa la concentración de cada reactivo empleado para la preparación de la mezcla de reacción, así como sus respectivos volúmenes para llegar a un volumen final de 20 µL.

Reactivos	Volumen
Agua estéril	4 μL
EvaGreen	10 µL
Cebador Forward (10 pmol/µL)	2 µL
Cebador Reverse (10 pmol/µL)	2 µL
DNA genómico o cDNA	2 µL
Volumen Total	20 µL

Tabla 2.3 Reactivos utilizados para la mezcla de reacción de PCR en tiempo real en los estudios de expresión de *CnPR2*, *CnPR3* y *CnPR5* en cDNA.

2.2.7 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Para el análisis de expresión génica, se emplearon plántulas de cocotero cultivadas *in vitro* del ecotipo Alto del pacífico mexicano (MXPT). Se agregó una concentración de 2.5 mM de ácido salicílico (SA) (Sigma, EE. UU.) a las plántulas cultivadas *in vitro* en

el medio de cultivo Y3, conteniendo sacarosa, y sin carbón activado. Se realizó la colecta de tejidos de hoja y raíz a las 0 y 48 h después del tratamiento en cada plántula. Se emplearon plántulas sin SA como controles. Se realizó el ensayo en frascos de cristal de 16 cm de altura y 7 cm de diámetro, cubiertos con bolsas de polipropileno (permiten el intercambio gaseoso, evitando de esta manera la acumulación del gas etileno). Los tejidos fueron cosechados por triplicado en los tiempos antes mencionados. Posteriormente los tejidos fueron puestos en congelación a -80 ° C para la posterior extracción de RNA.

Se utilizó como control interno de la reacción el gen constitutivo 18S. La amplificación por PCR en tiempo real, se hizo por triplicado para cada tejido evaluado. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en el equipo Rotor-Gene Q (QUIAGEN). Los parámetros de la PCR fueron: 95°C durante 2 minutos, 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 64°C durante 30 segundos. La curva de disociación se obtuvo calentando cada amplicón de 60 a 95°C. Los resultados de la qRT-PCR fueron analizados usando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001), con la apropiada validación de experimentos (Real-Time PCR Applications Guide BIORAD). Se realizaron tres replicas por cada gen. Los resultados fueron expresados en unidades de expresión relativa. Los datos representan la media \pm desviación estándar (SD) en tres muestras biológicas independientes por triplicado. Análisis de varianza (ANOVA) con Tukey Test tuvo un post-hoc (P ≤ 0.05) fue aplicado a la expresión relativa usando un software PAST (Hammer et al. 2001), utilizando los parámetros por defecto.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 CARACTERIZACIÓN DE GENES CLAVE EN LA RESPUESTA ISR

En base a la literatura (Van Wees et al. 2008; Pieterse et al. 2014; Jiang et al. 2016) y a la búsqueda en el transcriptoma, se decidió caracterizar genes claves que participan directamente en la activación del mecanismo de defensa ISR en plantas. Se lograron identificar un total de 569 secuencias relacionadas con la ruta del JA, de las cuáles se destacan 32 colecciones de secuencias de genes que podrían estar participando en una posible respuesta de ISR de cocotero (Tabla 2.4). De la lista obtenida, este estudio se concentró en los genes *CnCHIB*, *CnCOI1*, *CnMYC2* y *CnNPR1*, reportados en la literatura como genes clave que participan en la activación del mecanismo de

defensa ISR que actúa por medio de la señalización de JA y SA. Cabe mencionar que identificamos factores de transcripción MYBs, WRKYs y ERFs, asimismo genes como, LOX1 ('Linoleate 9S-lipoxygenase 1'), PTR3 ('Protein NRT1/ PTR FAMILY 5.2'), BT4 ('BTB/POZ and TAZ domain-containing protein 4'), EIN2 ('Ethylene-insensitive protein 2'), PRB1 ('Basic form of pathogenesis-related protein 1'), NPR5 ('Regulatory protein NPR5'), NNJA4 ('Ninja-family protein Os05g0558800'), entre otros (Tabla 2.4).

Gen	Función
MYB32	'Transcription factor MYB32'
COI1	'Coronatine-insensitive protein 1'
MYB6	'Transcription repressor MYB6'
PTR3	'Protein NRT1/ PTR FAMILY 5.2'
GSH1	'Glutamate-cysteine ligase'
WRKY4	'Probable WRKY transcription factor 4'
MYC2	'Transcription factor MYC2'
MYB4	'Transcription repressor MYB4'
BT4	'BTB/POZ and TAZ domain-containing protein 4'
MYB21	'Transcription factor MYB21'
ILL6	'IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 6'
LOX1	'Linoleate 9S-lipoxygenase 1'
WRKY51	'Probable WRKY transcription factor 51'
MYB29	'Transcription repressor MYB29'
MYB24	'Transcription repressor MYB24'
MYB28	'Transcription repressor MYB28'
CUL1	'Cullin-1'
EIN2	'Ethylene-insensitive protein 2'
PRB1	'Basic form of pathogenesis-related protein 1'
NPR1	'Non-expressor of PR1'
TPL	'Protein TOPLESS'
NPR5	'Regulatory protein NPR5'
TPC1	'Two pore calcium channel protein 1'
SUT4	'Sucrose transport protein SUT4'
NNJA4	'Ninja-family protein Os05g0558800'
MPK5	'Mitogen-activated protein kinase 5'
CHIB	'Endochitinase B'
ERF92	'Ethylene-responsive transcription factor 1B'
UPL5	'E3 ubiquitin-protein ligase UPL5'
RAP23	'Ethylene-responsive transcription factor RAP2-3'
JOIN	'MADS-box protein JOINTLESS'
M2K3	'Mitogen-activated protein kinase kinase 3'

Tabla 2.4 Genes que participan en las vías de señalización de JA identificados en el transcriptoma de cocotero.

2.3.1.1 CARACTERIZACIÓN DE CnCHIB, CnCOI1 y CnMYC2

En cuanto a la caracterización de *CnCHIB* en el transcriptoma se encontró una secuencia de 792 bp que contiene un marco de lectura abierto de 771 bp que codifica para una proteína de 257 aminoácidos (Figura 2.1), que se activa durante la respuesta ISR (Dombrecht et al. 2007).

Secuencia de nucleótidos de ORF de CnCHIB

Secuencia de aminoacidos de ORF de *CnCHIB* (257 aa)

MARSVILFQLSLLLAGIISTTAQNCGCSSDLCCSKYGYCGTGTAYCGDGCQEGPCYSTGGSSVADLVTQQF FDGIMNQASGNPCPGKSFYTRQAFLNALGSYPQFGQDGSSVTSKQEVAAFFAHVTHETGYLCYIEETDQSN AYCDPSYTQYPCAQGKKYFGRGPLQLTWNYNYGAAGQSIGFDGLNSPETVATDVNISFKTALWFWMENVHS VITSGQGFGATIRKINSQECNGQEPAEMNARVQLYKQYCSDFGV

Figura 2.1 Se muestra el ORF de C*nCHIB* y su secuencia de aminoácidos. En verde se muestra el codon de inicio.

Además, se observó que *CnCHIB* presentó un alto porcentaje de identidad con secuencias encontradas en el genoma de las palmas *Elaeis oleífera* y *Phoenix dactylifera* (Tabla 2.5).

Nombre	Tamaño (bp)	Función [Especies con similitud]	Query cover (%)	Identidad (%)
CnCHIB	792	endochitinase A-like [<i>Phoenix</i> <i>dactylifera</i>]	94	89
		chitinase [<i>Elaeis oleifera</i>]	97	90
		chitinase 4-like, partial [<i>Phoenix dactylifera</i>]	94	78
		acidic endochitinase SP2-like [<i>Phoenix dactylifera</i>]	97	75

Tabla 2.5 Análisis comparativo de CnCHIB con otras especies en GenBank.

De acuerdo al programa SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<u>http://smart.embl-heidelberg.de/</u>) la secuencia de aminoácidos de *CnCHIB* posee un dominio ChtBD1 (V24 a E55), el cual es un dominio de unión a quitina, utilizado por algunas especies de plantas como el trigo para defensa contra patógenos fúngicos (Wright et al. 1991) (Figura 2.2).



Figura 2.2 Representación esquemática de la estructura de *CnCHIB*. **A** Dominio quitinasa encontrado en un fragmento de la proteína *CnCHIB*. **B** Alineación de secuencias de CHIB de *Cocos nucifera* y *Elaeis guineensis*. **C** Estructura tridimensional de *CnCHIB*.

En cuanto a *CnCOI1* se encontró una secuencia de 2,532 bp que contiene un marco de lectura abierto de 1,740 bp que codifica para una proteína de 580 aminoácidos. En la figura 2.3 se muestra la secuencia de nucleótidos del marco de lectura abierto (ORF) encontrada en el transcriptoma de cocotero, así como el marco de lectura abierto en aminoacidos. De acuerdo a la literatura, COI1 tiene la función de promover la degradación de un regulador negativo de la transducción de la señal de JA (Pieterse et al. 2009).



Figura 2.3 Se muestra el ORF de C*nCOI1* y su secuencia de aminoácidos. En verde se muestra el codon de inicio y en rojo el codon de paro.

Adicionalmente, se observó que presenta un alto porcentaje de identidad con secuencias encontradas en el genoma de las palmas *Elaeis guineensis* y *Phoenix dactylifera* (Tabla 2.6).

Nombre	Tamaño (bp)	Función [Especies con similitud]	Query cover (%)	ldentidad (%)
		Coronatine-insensitive protein	94	96
CnCOI1		homolog 1b [<i>Elaeis guineensis</i>]	34	30
	2,532	Coronatine-insensitive protein	01	92
		homolog 1b-like [Phoenix dactylifera]	91	
		Coronatine-insensitive protein	74	00
		homolog 1a [<i>Elaeis guineensis</i>]	71	00
		Coronatine-insensitive protein	70	05
		homolog 1a-like [Phoenix dactylifera]	78	60

 Tabla 2.6 Análisis comparativo de CnCOI1 con otras especies en GenBank.

De acuerdo al programa SMART la secuencia de aminoácidos de *CnCOI1* posee múltiples dominios LRR, repeticiones ricas en leucina, y un dominio F-box, los cuales son dominios reportados en genes relacionados con mecanismos de defensa en palma de coco (Puch-Hau et al. 2016) (Figura 2.4).



Figura 2.4 Representación esquemática de la estructura de *CnCOI1*. A Dominios F-box y LRR encontrados en un fragmento de la proteína *CnCOI1*. B Alineación de secuencias de COI1 de *Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis* y *Phoenix dactylifera*. C Estructura tridimensional de *CnCOI1*.

En el caso de *CnMYC2*, se encontraron seis fragmentos de diferente tamaño en el transcriptoma. Sin embargo, después de hacer el posterior alineamiento entre estos fragmentos, se concluyó que se trataba de la misma secuencia, la cual fue de 2,605 bp (Figura 2.5).

Secuencia de nucleótidos del ORF de CnMYC2

ATC AACCTGTGGGCCGACGACAACGCCTCCATGATGGAGGCCTTCATGGCCACCACCGACCTCCAGGGCTTCCCCT GGGCGCCGCTGCCGCCGCGGCGGCGGCCGGGGGGGGCCAAGTGCCTTCCTCTCAGTCCGCCGTGATGTCATCCGCGCA GGCGGCACCGCTGGCGTATTTTAACCAGGAGACGCTCCAGCGGCGGCTCCTGACGCTGATCGAGGGCGCGCGACGGAGACCC TGGACTTACGCCATCTTCTGGCAGTCATCGGTGGACGTGGCCACCGGCGCTTCGCTGCTCGGCTGGGGTGACGGCTACT ACAAGGGATGCGAGGAGGACAAGCGGAAGCAGAAGGCCAACGCCTCCGCGGAGGAACAGGAGCACCGGAAGCGGGTGCT CAGGGAGCTGAACTCCCTCATCTCCAGTGGCGCCGGCGGGTGCTCGCCCGATGAGGCCGTGGAGGAGGAGGAGGAGGTCTCCGAC ACAGAGTGGTTTTTTCTGGTGTCCATGACGCAGTCGTTTGTCGACGGCACCGGTCTTCCTGGCCAGGCCCTCTTCTCCG GAGCTCATGAACAAGATCAGGGTCCTCTTCAACTTCAACAGCCTCGAGATCCCCGGATCCTGGATCCCGCCGCCTG CAAGGACTCCGTCTCCCCTCCTCCCGCCACGGCTGAGATCTCCGTCACCAAACCCCCCATCCAGTTCGACAATCCCAGC TCCAGTACCATTACGGAAAGCCCTAGCTCGGTTCCGATGCAACAGCGCCCCAACCAGCAGCAGCATCAAAATCAGAACA GCCACAGCAATAGCAGCTTCCAGACCCAATCATTCGGCACCAAAGGGTTTAATTTCTCCGAGTTCGCGATGAACGGCTC TGCCCCTCCTCCTCCTCCAAGCCGGAAACCGGAGAGATTCTAAATTTCGGCAATAGCAAGAGGAATTCCTCTCCGGCC CCTGGTAGCGGTCTCTTCCCCCACCACCAGACCACCATGGATGACAAAAAGAACAAGCGATCAACAGGGGCCACCTCGA TGGAGGGATCCTCGGCGGGGGGGGGGCGACTCTGACCACTCGGATCTCGAGGCGTCGGTGCGGGAGGTGGAGAGCGGCCGGGTG GTCGAGCCGGAGAAGCGGCCCAGGAAGCGCGGCCGGAAGCCAGCCAGGCCGGATAGAACCACTCAATCACGTGGAGG CCGAGCGGCAGCGCCGGGAGAAGCTGAACCAGAGGTTCTACGCCCTCCGCGCCGTGGTGCCCAACGTGTCCAAGATGGA CAAGGCCTCTCTTCTAGGGGACGCCATTTCCTACATCAAGGAGCTAACATCCAAGCTGGAGACCATGGAGTCAGATAAG GAGGGGCTTCAGGCCCAGATCGAGACCCTCAAGACGGAGCGCGATTCCGCCCCAGCACGGCCATCGCAGCCGCCCGATC CCGGGTGCAGTGCCATAAGACGAATCACCCGGCGGCGAGGCTGATGGCGGCATTAAAAGAGCTCGACCTCGATGTCTAT TATGCAAGTGTGTCCGTCGTCAAAGATCTGATGATCCAGCAGGCGACGGTGAAGATGTCCGGTAGGGTGTACAACCAGG AGCAGCTCAGTGCTGCGCTCTTTGCCAGAGTGGCTGATCCCCCGAGCAATAATAGG

Secuencia de aminoácidos del ORF de CnMYC2 (580 aa)

MNLWADDNASMMEAFMATTTDLQGFPWAPLPAAAAAGGGQVPSSQSAVMSSAQAAPLAYFNQETLQRRLLTLIEGATET WTYAIFWQSSVDVATGASLLGWGDGYYKGCEEDKRKQKANASAEEQEHRKRVLRELNSLISSGAGGCSPDEAVEEEVSD TEWFFLVSMTQSFVDGTGLPGQALFSESPNWITGGNLLAMAPCERARQAQTFGLQTMVCVPVGSGVLELGSTDRIYQSS ELMNKIRVLFNFNSLEIPSGSWIPPPAATPAVADHGETDPSVLWLADPSMVEIKDSVSLLSATAEISVTKPPIQFDNPS SSTITESPSSVPMQQRPNQQQHQNQNSHSNSSFQTQSFGTKGFNFSEFAMNGSAPPSSFKPETGEILNFGNSKRNSSPA PGSGLFPHHQTTMDDKKNKRSTGATSRGSMDEGVLSFSSAPARPSSAGQVKAGGGILGGGDSDHSDLEASVREVESGRV VEPEKRPRKRGRKPANGRIEPLNHVEAERQRREKLNQRFYALRAVVPNVSKMDKASLLGDAISYIKELTSKLETMESDK EGLQAQIETLKTERDSAPARPSQPPDPDTRLMNGGRCHGVEIEVKTLGLEAMIRVQCHKTNHPAARLMAALKELDLDVY YASVSVVKDLMIQQATVKMSGRVYNQEQLSAALFARVADPPSNNR

Figura 2.5 Se muestra el ORF de C*nMYC2* y su secuencia de aminoácidos. En verde se muestra el codon de inicio y en rojo el codon de paro.

Posteriormente, el BLASTN realizado a esta secuencia de aminoácidos, presentó resultados convincentes, ya que esta secuencia de *CnMYC2*, presentó un alto

porcentaje de identidad con secuencias MYC2 de especies monocotiledóneas, en especial con 2 especies de palmas, *E. guineensis* y *P. dactylifera* (Tabla 2.7).

Nombro	Tamaño	Eunción (Espacios con similitud)	Query	Identidad
Nombre	(bp)	Funcion [Especies con similitud]	cover (%)	(%)
		transcription factor MYC2-like [Elaeis	77	03
CnMYC2	2,605	guineensis]		30
		transcription factor MYC2-like	76	87
		[Phoenix dactylifera]	70	
		transcription factor MYC2-like [Elaeis	77	78
		guineensis]	11	
		transcription factor MYC2 [Phoenix	77	77
		dactylifera]	11	11

Tabla 2.7 Análisis comparativo de CnMYC2 con otras especies en GenBank.

De acuerdo al programa SMART la secuencia de aminoácidos de *CnMYC2* posee un dominio HLH (V499 a E548), el cual tiene un sitio de reconocimiento de unión al DNA, característico de los factores de transcripción (Figura 2.6).



Figura 2.6 Representación esquemática de la estructura de *CnMYC2*. A Dominio HLH encontrado en un fragmento de la proteína *CnMYC2*. B Alineación de secuencias de MYC2 de *Cocos nucifera*, *Elaeis guineensis* y *Phoenix dactylifera*. C Estructura tridimensional de *CnMYC2*.

2.3.2 CEBADORES DE LOS GENES CnCHIB, CnCOI1 y CnMYC2

Los cebadores diseñados para la caracterización de *CnCHIB*, *CnCOI1* y *CnMYC2*, presentaron las siguientes características (Tabla 2.8)

Nombre	Sentido	Secuencia	Tamaño cebador (b)	Tm (°C)	% GC	Tamaño producto (bp)
ChCUID A	F	TACTTGCGGGCATAATCTCC	20	60.21	55	106
СПСПІВ-А	R	TTCGACGGCATTATGAATCA	20	60.05	50	190
	F	GAAGAGACGGACCAATCCAA	20	60.21	55	
CnCHIB-B	R	TTCTGGATGGAAAATGTGCA	20	60.05	50	230
ChCO11 A	F	TCAGAGCCCATACCTTGGAG	20	60.21	55	204
CIICOIT-A	R	TGGAAAGAGGACCGATTGTC	20	60.05	50	294
$C_{\rm P}CO11$ C	F	GGACCTTGAGGCAGTTGAAG	20	59.84	55	101
CIICOII-C	R	ACCATCGCCATCTGCTACTC	20	60.25	55	104
	F	ACGGTGAAGATGTCCGGTAG	20	60.01	50	150
Chivi YCZ-A	R	ACCAAACCACTTGACGAAGG	20	59.99	55	159
CnMYC2-B	F	CCTCATGGTCCAACAAATCC	20	60.10	60	204
	R	CAGAGCTGCACTGCTCTACG	20	60.17	50	204

Tabla 2.8 Cebadores diseñados a partir de las secuencias de *CnCHIB*, *CnCOI1* y *CnMYC*2.

Tm: Temperatura de hibridación; %GC: Porcentaje de los nucleótidos GC

2.3.2.1 PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE LOS GENES CnCHIB, CnCOI1 y CnMYC2

Los productos amplificados con los cebadores *CnCHIB*-A y *CnCHIB*-B, empleando DNA y cDNA (datos no mostrados) como templado, presentaron fragmentos de los tamaños esperados, 196 y 230 bp (indicados en flechas). De los dos pares de cebadores probados para *CnCOI1*, se logró la amplificación de un fragmento de 294 bp (*CnCOI1*-A) y 184 bp (*CnCOI1*-C). Para *CnMYC2* se logró amplificar un fragmento de 159 bp (*CnMYC2*-A) y uno de 284 bp (*CnMYC2*-B) (Figura 2.7). Cabe mencionar que se probaron cinco temperaturas diferentes de hibridación (Tabla 2.2) para la amplificación de *CnCHIB*, *CnCOI1* y *CnMYC2*, observándose la misma intensidad del producto de amplificación en cada banda (datos no mostrados).



Figura 2.7 Productos amplificados con los cebadores de *CnCHIB*, *CnCOI1* y *CnMYC2*. A Fragmento amplificado con los cebadores, sentido y antisentido de *CnCHIB*-A. B Fragmento amplificado con los cebadores, sentido y antisentido de *CnCHIB*-B. C Fragmento amplificado con los cebadores, sentido y antisentido de *CnCOI1*-A. D Fragmento amplificado con los cebadores, sentido y antisentido de *CnCOI1*-C. E Fragmento amplificado con los cebadores, sentido y antisentido de *CnCOI1*-C. E Fragmento amplificado con los cebadores, sentido y antisentido de *CnCOI1*-C. E Fragmento amplificado con los cebadores, sentido y antisentido de *CnMYC2*-A. F Fragmento amplificado con los cebadores, sentido y antisentido y antisentido de *CnMYC2*-B. 100 bp. Marcador.

2.3.2.2 PRODUCTO CLONADO DE CnMYC2

Mediante la combinación del cebador sentido (*CnMYC2*-A) y el antisentido *CnMYC2*-B) se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 2,432 bp usando como templado DNA genómico (Figura 2.8) y cDNA (datos no mostrados), este último fue purificado (Figura 2.5) para su clonación y secuenciación. Cabe mencionar que en el

caso de *CnMYC2* no hubo diferencia en el tamaño de las bandas obtenidas tanto en DNA como en cDNA.



Figura 2.8 Producto amplificado de *CnMYC2* a partir de DNA genómico con los cebadores sentido *CnMYC2*-A y antisentido *CnMYC2*-B. A Producto amplificado. 100 bp. Marcador B Producto purificado. 1 Kb Marcador.

Cabe recordar que los cebadores de los genes *CnPR2*, *CnPR3* y *CnPR5*, fueron usados directamente para realizar la curva estándar y finalmente en el estudio de expresión que se presentan en este trabajo.

2.3.3 SONDAS DE LOS GENES CnCHIB y CnMYC2

En base a las secuencias de los cebadores previamente analizadas de *CnCHIB*, y *CnMYC2* se diseñaron sondas Taqman (Figuras 2.9 y 2.10), en cuanto a *CnCOI1* se seleccionó un par de cebadores para el análisis de expresión (Tabla 2.11). La sonda *CnCHIB* fue sintetizada por la compañía Applied BiosystemTM. Se diseñó la sonda en la región que presentó mayor divergencia. La sonda *CnCHIB* posee un tamaño de 16 bp y se ubica en el número de base 247, amplificando un producto de 75 bp (Figura 2.9, Tabla 2.12).



Figura 2.9 Esquema representativo de la ubicación de la sonda *CnCHIB*. Se muestra el alineamiento de secuencias con identidad a *CnCHIB* y el sitio en el cual se encuentra ubicada la sonda para el estudio de expresión.

La sonda *CnMYC2* fue sintetizada por la compañía Applied BiosystemTM. Se diseñó la sonda en la región que presentó mayor divergencia. La sonda *CnMYC2* es de 14 bp y se ubica en el número de base 2,298 amplificando un producto de 75 bp (Figura 2.10, Tabla 2.12)

MaMYC2	2364	TCCGTGCTGCTCTCTACTCTAAATTGGCTG
EqMYC2	2499	TCAGTGCTGCCCTCTTCTCCAGACTTGGAGACCCTCCTAGCAGT
CnMYC2	2265	TCAGTGCTGCCTCTTTGCCAGAGTGGCTGA
PdMYC2	2242	TCAGTGCTGCCCTCTTAGCCAGATTGGCGGA
AcMYC2	1929	TCAACGCCCCCTCTGTGCGAGCCTCACCGA
OsMYC2	2216	TCAACGCCGCCTCTACACCCGCATCGCCGACCCTGGCACCGCCGCCCGGTAACTCAACT
ZmMYC2	2555	TCAGCGCCGCCTCTACACCCGCCTTGCCGCACCCCCGGCTCTGTCATGGGCAGGTAATCAG
SbMYC2	2301	TCAACGCCCCCTCTACAGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
AtMYC2	2335	TCACAGCAAGTTTGATTTCAAAAATCGGTTAAAAGGGTGTGTTTTGGGAAGT
AmMYC2	3297	TCACTCCTCCCTTTATTCCAAACTCCCAGACATTCCGAGTGTGAGATAGT
GmMYC2	2172	TTCTGTCGCCACTATCATCCAAAGTTGGCCA
VvMYC2	2666	TGACGCTACCCTGTCATCCAAATTTCCCAGACAGCACGTAGGCGTTGCGTA
S1MYC2	2143	TTAGGCTAGCCTTGACATCGAAAATTTGCTGAAACACACTAAACCCCTT
NtMYC2	2108	TTAGGATAGCATTGACATCCAGAGTTGCTGAAACACGCTAA
MaMYC2	2394	CCCAGGCACC
EaMYC2	2543	AGATAAATGTCCTTCCTCTAATAAC-CAAGGGTCGTTTTTCCGAGGATT
CnMYC2	2296	TCCCCCGAG-CAATAATAGGTAATTCCCCGTTCCCT
PdMYC2	2273	C
AcMYC2	1960	TCCCTCTCCTCCAGG-TAGAAGTTGATTTTGTAGGCCTT
OsMYC2	2276	CTAGCGAGGAAACCCAATCGATATA-CTCTCTACTCTCCCCCAACCCGGCGT
ZmMYC2	2615	GCAGGAGAGCTCATCAGCTCCCCTGTGCCTCCCCGATACGCACCATACCGATACACTGCT
SbMYC2	2361	GGAGAGTTCACCTCGCCTGTCGCTCCCCGCATAGCCACGATACTCATACTGCT
AtMYC2	2387	TTAGAAAGTTATGGGGTCAAATCAT-AATTAATTCGTTTTAGTCCCTTC
AmMYC2	3348	GGATAAGGTGCTGGGGTTGTCTCTGTG-ACCATATATGTAATATTTGC
GmMYC2	2203	-TGAACTACGATAGTTCCTTTCTGTA-CTATTATTGGTAGCAGTAGCTGT
VvMYC2	2717	-TAGCTTATTACACGACCCGCCCTCGGGGTTTCACTGTCAAAAAGGTTT
S1MYC2	2191	C
NtMYC2		
MaMYC2	2404	AATTAGCAGCTAGCCTAT
EgMYC2	2591	CCTCACCTTGCGTGGCTTGTATGGCGCTCGGAAGAGTTTTTAGACC
CnMYC2	2330	AATAACCATGGGTTGTTGATTCCCCGGC
PdMYC2	2307	AA TTACCATGGGTTCTT
AcMYC2	1999	AATTAACCCAGAGAACAGAACTCAGGAAAAAAGAGAGAGAAAAACAA
OsMYC2	2326	ACCATGCCAGACCTTCACCAATGCCAACAACACCACGAGACCATG
ZmMYC2	2675	ACCCACCACCACGGGGGGGGTCACCATCGTTACAAAACACACAC
SbMYC2	2413	ATTCACCACCEGACTTTTCATCATCGTCACCATCGTTACAACACGATACCCAGACACA
AtMYC2	2435	ACTAATTTTGTAGATTTTAGTTTTGTAAGAAAAAATCTTAAAAATAG
AmMYC2	3393	ACGCAGTAGACTCCATAGCAACGCGTTCACCGACGAGGTGGTGACTCATG
GmMYC2	2250	ACCTTTCTATCTAAATTACTCTTCTTA
VvMYC2	2764	ACGGCTCTCGCACATTTT
S1MYC2	2212	GAGGGCCATGTTTAAATT
NtMYC2		= =

Figura 2.10 Esquema representativo de la ubicación de la sonda *CnMYC2*. Se muestra el alineamiento de secuencias con identidad a *CnMYC2* y el sitio en el cual se encuentra ubicada la sonda para el estudio de expresión.

Las sondas de *CnNPR1*, *CnNPR3* y *CnSERK*, fueron usados directamente para realizar la curva estándar y el estudio de expresión. En la tabla 2.9 se muestran las

características de las secuencias de todos los cebadores y sondas utilizadas en este estudio.

Gen	Ruta hormonal	Función	GenBank ID	Referencia	Cebadores/ Sondas	Tamaño producto (bp)
CnCHIB	JA	Basic Endochitinase	MH752043		CCGGAGGCCTG ATTCA	75
CnCOI1	JA	F-box/LRR- repeat protein	MN782305	Estudio actual	GGACCTTGAGG CAGTTGAAG ACCATCGCCAT CTGCTACTC	185
CnMYC2	JA	Transcription factor bHLH	MH748554		CCCCGAGCAAT AAT	75
CnNPR1	SA–JA	Protein BTB/POZ	KU926707	(Nic-Matos	AAGGAGAGAAG ACTACGAATCT	63
CnNPR3	SA	Protein BTB/POZ	KT456285	et al. 2017)	ACATGTACCAC	90
CnPR2	SA	1,3-β- glucanase			AGTCGAAGAGC TTGACACGG TTCCATCGGCG TCAACTACG	110
CnPR3	SA	Chitinase	SRP03482 5	(Nejat et al. 2015)	GCTGTACCCAG CAAGGCTAA TCCTTGCCTTC GCCATAGAC	164
CnPR5	SA	Thaumatine like protein			CCGTTACTGCC ATTGAGGGT TTACATGCCAG ACCGGTGAC	106
CnSERK	SA	Protein kinase	AY791293. 2	(Pérez- Núñez et al. 2009)	TTGATCTTGGA AA	86

Tabla 2.9 Cebadores y sondas de CnCOI1, CnPR2, CnPR3 y CnPR5, CnMYC2,CnCHIB, CnNPR1 y CnSERK.

2.3.4 RNA EXTRAÍDO Y cDNA SINTETIZADO

El RNA extraído para la síntesis de cDNA resultó de buena calidad, en la figura 2.11 se pueden percibir claramente las subunidades 28S y 18S ribosomales. No se observa alguna contaminación con DNA, esto es debido al tratamiento aplicado con DNAsa, por lo que se procedió con la síntesis de cDNA.



Figura 2.11 Imagen de muestra de RNA y cDNA fraccionado en un gel de agarosa 1.5%.

2.3.5 EFICIENCIA Y ESPECIFICIDAD DE CEBADORES Y SONDAS DISEÑADOS

2.3.5.1 CURVA ESTÁNDAR DE CEBADORES Y SONDAS DISEÑADOS

Las gráficas de las curvas estándar de *CnCHIB*, *CnCOI1*, *CnMYC2*, *CnNPR1*, *CnNPR3*, *CnPR2*, *CnPR3*, *CnPR5* y *CnSERK*, muestran una buena especificidad del producto y eficiencia de amplificación, además de una buena linealidad (Figura 2.12). Para las sondas de *CnCHIB*, *CnMYC2*, *CnNPR1*, *CnNPR3* y *CnSERK*, se obtuvieron eficiencias de 96.5%, 98.1%, 105%, 91.5% y 96.8%, y valores de R² de -0.99, -0.99, -0.99, -0.99 y -0.99, respectivamente. Para los cebadores de *CnCOI1*, *CnPR2*, *CnPR3* y *CnPR5*, se obtuvieron eficiencias de 120%, 99.8%, 110% y 109%, y valores de R² de -0.98, -0.99, -0.99 y -0.99, respectivamente. Estos fueron utilizados para el estudio de expresión génica por PCR tiempo real.



Figura 2.12 Imagen representativa de la curva estándar de *CnCHIB*, *CnCOI1*, *CnMYC2*, *CnNPR1*, *CnNPR3*, *CnPR2*, *CnPR3*, *CnPR5* y *CnSERK*.

2.3.6 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

El qPCR fue usado para conocer la distribución de los transcritos de ambos genes en los tejidos de hoja y raíz, usando como control interno el gen 18S. Los análisis de los resultados en tejido de hoja indican que *CnCHIB* y *CnPR5*, presentan los mayores niveles de expresión nivel de expresión, seguidos de *CnNPR3*. Las transcripciones de *CnMYC2*, *CnNPR1*, *CnPR2*, *CnPR3*, *CnSERK* y *CnCOI1* se expresaron en un menor nivel. Por otro lado, la expresión en tejido de raíz es mayor para las transcripciones de *CnPR2*, *CnPR5* y *CnSERK*, seguidos de *CnCOI1* y *CnNPR1*. Finalmente, las transcripciones que se expresaron en menor nivel en tejido de raíz fueron *CnMYC2*, *CnCHIB*, *CnNPR3* y *CnPR3* (Figura 2.13).



Figura 2.13 Niveles de expresión relativa de los nueve genes evaluados en tejido de hoja y raíz, junto comparado con el control (18S). eje x: genes (*CnCHIB, CnMYC2, CnCOI1, CnNPR1, CnNPR3, CnSERK, CnPR2, CnPR3, CnPR5*); eje y: nivel de expresión relativa.

2.4 DISCUSIÓN

Se ha reportado que la aplicación exógena de SA activa un sin número de genes relacionados con defensa en plantas. Esta fitohormona también ha sido reportada en estudios de interacción planta patógeno. Así también hay estudios donde se ha realizado la aplicación de SA en combinación con otras fitohormonas como JA, ET y ABA, las cuales son consideradas fitohormonas de defensa clásicas y está reportado que patógenos pueden incrementar los niveles endógenos de estas en algunas especies vegetales. Nuestros resultados indicaron que no solo el SA está involucrado en la expresión de genes de defensa en coco, sino también el JA, ET y ABA. Se presume que la activación de un estado de defensa en las plantas se da por el entrecruzamiento de los mecanismos SAR, ISR y WIR; estos mecanismos pueden inducir un estado de "priming", es decir, un estado de defensa mejorada, provocando una respuesta más rápida ante el ataque de un organismo patógeno por medio de la expresión de genes que se expresan entre estas tres vías de señalización.

CHIB forma parte de la familia de quitinasas de tipo 1b o básicas (Hamid et al. 2013; Kazan and Manners 2013), enzimas presentes en las plantas y que han sido ampliamente estudiadas debido a su gran capacidad de controlar patógenos fúngicos debido a que la quitina es el principal componente estructural de las paredes celulares de los hongos. Nuestros resultados muestran que *CnCHIB* comparte similitud de secuencia de nucleótidos y aminoácidos con otras quitinasas presentes en especies similares a la palma de coco, así mismo la estructura tridimensional muestra láminas β paralelas, características de quitinasas de tipo 1b (Hamid et al. 2013). En nuestro análisis de caracterización de *CnCHIB* encontramos un dominio de unión a quitina (CBD, chitin binding domain), el cual se ha reportado que se conserva en quitinasas de varias especies de plantas (Hamid et al. 2013).

Por su parte COI1 tiene la función de promover la degradación de un regulador negativo (proteínas JAZ) de la transducción de la señal de JA en respuesta de defensa contra patógenos y herbívoros (Carvalhais et al. 2017); lo que hace a COI1 un gen requerido para muchas de las respuestas dependientes de JA en diversas especies de plantas (Pieterse et al. 2014). Los resultados de la caracterización de *CnCOI1* muestran que este gen posee múltiples regiones con dominios LRR (Repeticiones
Ricas en Leucina) y un dominio F-box, involucrados en las interacciones proteínaproteína, la transducción de señales y este último en la degradación de proteínas en Arabidopsis y arroz (Damaris et al. 2016; Carvalhais et al. 2017). Finalmente, se encuentra el gen *MYC*2, su función está conservada en otras especies y su expresión está regulada por JA y es dependiente de *COI1*, lo que sugiere que *MYC*2 actúa por debajo de COI1 en la ruta de transducción de señal de JA (Van Wees et al. 2008; Pieterse et al. 2009). Estudios anteriores ((Dombrecht et al. 2007; Kazan and Manners 2013) indican que *MYC*2 funciona como un gen clave en la regulación transcripcional en el mecanismo de defensa ISR mediante la vía de los jasmonatos.

El regulador maestro de la señalización vía SA es NPR1, que activa la respuesta SAR (Durrant and Dong 2004), sin embargo, de acuerdo con la literatura, también participa en el mecanismo de defensa ISR (Pieterse et al. 2009). NPR1 tiene dos análogos receptores de SA, que actúan como reguladores positivos o negativos de SAR, estos son NPR3 y NPR4 (Ding et al. 2018). En nuestros resultados de expresión génica en plántulas expuestas a SA, se observó un incremento en la expresión de NPR1 y NPR3, coincidiendo con lo observado en un estudio previo realizado en cocotero, (Nic-Matos et al. 2017), donde se encontró la misma tendencia en la expresión de estos dos genes, involucrados en la respuesta de defensa contra una amplia variedad de patógenos y regulando la expresión de genes de respuesta de defensa SAR (Durrant and Dong 2004).

En nuestro estudio, analizamos genes que codifican proteínas relacionadas con la patogénesis (PRs) tales como glucanasas (PR2), quitinasas (PR3) y proteínas tipo taumatina (PR5). Se observó que PR5 tuvo el mayor incremento en la expresión comparado con PR3 y PR2 en tejidos de hojas, así también se observó que PR5 y PR2 contaron con mayores niveles de expresión comparados con PR3 en raíz. PR2 es una proteína PR que participa en la degradación de los glucanos de algunas bacterias, PR3 está relacionado con los procesos de degradación de la pared celular de los hongos patógenos y PR5 tiene actividad antifúngica y de tolerancia al estrés abiótico (Balconi et al. 2012; Zehra et al. 2017). Nuestros resultados y las características de cada proteína, nos permiten asumir que se expresan en diferentes niveles debido a la naturaleza del tejido y a la zona de aplicación del inductor. En este caso, se observó un mayor nivel expresión en raíz, posiblemente, porque fue el tejido que estuvo en contacto directo con el SA.

Sin embargo, las funciones de algunos genes no se limitan a solo defensa, un ejemplo es el caso de SERK, un receptor tipo cinasa reportado ampliamente como participante en el proceso de embriogénesis somática, pero su función no se limita el proceso embriogénico, SERK también juega un papel importante en la señalización durante los mecanismos de defensa inducidos, como se reporta en arroz (Hu et al. 2005), además de participar en el entrecruzamiento entre vías de señalización hormonal, como SA y brasinoesteriodes (Santos and Aragão 2009). Con nuestros resultados podríamos asumir la participación de *CnSERK* en el mecanismo de defensa inducido por SA, debido al aumento de expresión que presentó en ambos tejidos con respecto al control.

Como se puede observar, nuestros resultados sugieren que el SA podría inducir este estado de "priming" después de las 48 horas de exposición, aumentado los niveles de expresión de genes clave involucrados en las vías de señalización de respuestas tanto de SAR como de ISR. De acuerdo con la literatura, se reporta que las plantas que poseen ambos mecanismos de defensa (SAR e ISR) tienen una mejor capacidad de defensa ante un amplio espectro de patógenos (Van Wees et al. 2008). Podríamos asumir que la regulación positiva de los genes expresados por la aplicación de SA juega un papel crítico en la inmunidad en palma de coco, lo que promovería una resistencia efectiva de palma de coco contra patógenos. Este trabajo representa el primer estudio realizado en Cocos nucifera L. donde se observa los resultados presentados de la interacción entre SAR e ISR. Sin embargo, se requieren más experimentos para comprender la interacción entre estas dos vías en la palma de coco, ya que la funcionalidad de estos genes aún no ha sido comprobada. Un análisis profundo de la expresión de algunos genes seleccionados con ambas vías nos permitiría tener respuestas especificas relacionadas con la interacción de las vías de defensa en cocotero.

CAPÍTULO III

RESPUESTA TIPO-ISR INDUCIDA EN PLÁNTULAS in vitro DE COCOTERO

3.1 INTRODUCCIÓN

La palma de coco (Cocos nucifera L.), un miembro de la familia Arecaceae, es una palma leñosa económicamente importante cultivada en regiones tropicales. Una gran gama de productos de valor agregado están hechos a base de palma de coco, por lo que las mejoras en su producción han dado como resultado beneficios económicos y sociales para las zonas pobres del mundo. A pesar de su importancia agronómica, cualquier brote de enfermedad, en particular el AL (amarillamiento letal), dan lugar a trastornos ambientales y económicos (Gurr et al. 2016). El conocimiento sobre los mecanismos de defensa que utiliza el cocotero para defenderse del ataque de diversos tipos de patógenos resulta importante porque de esta manera se podían controlar algunas o todas las enfermedades de este cultivo. Hasta la fecha existe evidencia probable de que la hormona SA (ácido salicílico) podría estar activando un mecanismo de defensa tipo-SAR (resistencia sistémica adquirida) (Lizama et al., 2007; Puch-Hau et al. 2005 and Nic-Matos et al. 2017). Sin embargo, se ha reportado que la hormona JA (ácido jasmónico) juega un papel importante en las respuestas de defensa de la planta modelo Arabidopsis thaliana, activando el mecanismo de defensa ISR (resistencia sistémica inducida) (Jiang et al. 2016) ante el ataque de patógenos de tipo necrotrofos, los cuales actúan sobre tejidos muertos del hospedante activando ISR a diferencia de los biotrofos que actúan sobre tejidos vivos de sus hospedantes activando SAR. Basándose en estos antecedentes, en el presente trabajo se evaluó la posible presencia de un mecanismo de defensa tipo-ISR en plántulas de cocotero previamente tratadas con MeJA (metil jasmonato) e inoculadas posteriormente con el fitopatógeno Phytophthora capsici, con la finalidad de obtener un modelo simulado de la interacción planta-patógeno entre la palma de coco y un patógeno especifico.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 ENSAYO DE TOXICIDAD DE MeJA EN PLANTULAS in vitro DE COCOTERO

Para cada tratamiento, se prepararon soluciones de MeJA a 100, 200, 400, 600 y 800 µM. En condiciones estériles, se realizó la aspersión (Oliveira et al. 2015; Du et al. 2017) de 1 mL de cada una de las soluciones indicadas anteriormente a cada grupo de plántulas evaluadas. Como testigo se asperjó agua destilada. Este ensayo se realizó por triplicado. Se documentaron los resultados durante 40 días.

3.2.2 Phytophthora capsici

3.2.2.1 ACTIVACIÓN Y RESIEMBRA DE Phytophthora capsici

La cepa de *P. capsici* fue donada por el laboratorio de Microbiología Aplicada y Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Mérida, esta cepa fue aislada de *Capsicum annuum* (pimiento). La cepa se encontraba en una suspensión de micelio en 15 mL de agua, para llevar a cabo su activación se procedió a mezclar la suspensión por 5 segundos en un vortex y después incubándola en una estufa REDLINE a 25°C por 6 días. Posteriormente se llevó a cabo la siembra de la cepa, colocando 500 µL de la suspensión en una caja Petri con medio PDA (papa agar dextrosa) para después incubar a 28°C, monitoreando cada 24 horas su crecimiento. A los 14 días (se observa crecimiento en toda la caja Petri) se almacenó en refrigeración para su posterior uso. Se realizó una resiembra continua de la cepa cada dos meses cortando aproximadamente 1 cm² de micelio con bisturí, colocándolo en PDA e incubando a 28°C.

3.2.2.2 EVALUACIÓN DE LAS DIFERENTES FORMAS DE INOCULACIÓN DE *Phytophthora capsici* EN PLÁNTULAS DE COCOTERO

Fueron evaluados tres formas de inoculación de *P. capsici* en plántulas de cocotero con el fin de evaluar síntomas visuales del daño ocasionado por la interacción planta-

patógeno (*C. nucifera-P. capsici*). En el primer método, se tomó aproximadamente 1 cm² de micelio de *P. capsici* y fue puesto en el tallo de la plántula (Figura 3.2). El segundo método se realizó vertiendo 1 mL de suspensión de zoosporas en el medio de cultivo donde se encuentra sumergida la raíz de la plántula (Figura 3.2). El tercer método de inoculación se llevó a cabo realizando una herida en el tallo de la plántula con un bisturí y colocando en la herida aproximadamente 1 cm² de micelio de *P. capsici* (Figura 3.2) facilitando así, la propagación del patógeno. Se usó como testigo una plántula a la que se le realizó una herida en el tallo sin la inoculación con *P. capsici*. Las plántulas se incubaron por 24 horas en oscuridad y luego se pasaron a fotoperiodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad registrando el proceso de infección durante 40 días (Figura 3.3).

3.2.2.3 INOCULACIÓN DE PLÁNTULAS DE COCOTERO CON *Phytophthora capsici* PRETRATADAS CON MeJA (50-600 μM)

Después de seleccionar el método de inoculación se procedió con el ensayo de interacción de las plántulas de cocotero tratadas con MeJA (metil jasmonato) y *P. capsici.* Para lo cual se realizó un diseño experimental (Tabla 3.1) con el fin de encontrar las concentraciones de MeJA en las que se obtuviera una mayor respuesta de defensa del cocotero frente a *P. capsici.*

Tratamiento	[] MeJA (µM)	Exposición MeJA (h)	P. capsici	Exposición <i>P.</i> <i>capsici</i> (días)	No. Plántulas
1	50	24	+	14	3
2	100	24	+	14	3
3	150	24	+	14	3
4 ^a	200	24	+	14	3
4b	200	72	+	21	5
5	400	72	+	21	5
6	600	72	+	21	5
Testigo 1	0	0	+	21	5
Testigo 2a	0	0	+	14	3
Testigo 2b	0	0	-	21	5
Testigo 3	2.5 mM SA	24 h SA	+	14	3

Tabla 3.1 Tratamientos con MeJA y *Phytophthora capsici* en plántulas *in vitro* de cocotero.

3.2.2.3.1 TRATAMIENTO CON MeJA

Para llevar a cabo los tratamientos señalados en la tabla 3.1, se procedió a la esterilización de MeJA (Sigma, EE. UU.) por medio de filtración usando un filtro Millipore de 0.22 micras, haciendo una solución de trabajo a 1 mM y guardando a temperatura ambiente para después añadirla en el medio de cultivo directamente después de su esterilización en las concentraciones seleccionadas (Ver Tabla 3.1). Por el contrario, para la esterilización del ácido salicílico (SA) usado en el testigo 3 (Tabla 3.1), este se disolvió en etanol al 95% y se agregó al medio de cultivo directamente antes del proceso de esterilización del medio. Las concentraciones añadidas se indican en la tabla 3.1. Así también se preparó el medio de cultivo Y3 (Chan et al. 1998), sin agregar carbón activado, necesario para llevar a cabo los tratamientos (cada plántula utiliza 50 mL) con las fitohormonas y medio de cultivo Y3, sin sacarosa, para colocar las plántulas después de los tratamientos e inocularlas con P. capsici. El tratamiento con MeJA se realizó en las raíces de plántulas previamente lavadas en agua destilada estéril para guitar restos de carbón activado contenido en el medio de cultivo (Nic-Matos et al. 2017), para luego colocarlas en frascos conteniendo medio de cultivo Y3 con diferentes concentraciones de fitohormonas, incubando por 24 o 72 horas (Tabla 3.1).

3.2.2.3.2 INOCULACIÓN CON Phytophthora capsici

Posterior al tratamiento con las fitohormonas se realizó la inoculación con *P. capsici* (Figura 3.1), las plántulas fueron previamente sanitizadas eliminando tejidos necrosados para asegurar el desarrollo normal de la plántula al ser inoculada con *P. capsici.* Después se procedió a inocular colocando aprox. 1 cm² de micelio en el tallo de la plántula, método mencionado en la sección 3.2.1.2. se utilizaron como testigos negativos los tratamientos 2a y b (no inoculados con *P. capsici*) y los testigos positivos los tratamientos 1 y 3 (inoculados con *P. capsici*) (Tabla 3.1). Se registraron los cambios fisiológicos externos de la interacción de la plántula con el patógeno en dos grupos, los ensayos 1, 2, 3, 4a, testigos 2a y 3 a los 14 días de inoculación y los ensayos 4b, 5, 6, testigos 1 y 2b a los 21 días de inoculación. Finalmente, se procedió a medir el daño causado por *P. capsici* a las plántulas de cocotero con la ayuda del

programa de cómputo ImageJ (Rasband 1997), que permite medir el área total de la plántula y así mismo el área del tejido dañado por medio de una medida de referencia. Es importante señalar que el sistema de inoculación utilizado en este trabajo permite el estudio de la interacción planta-patógeno ya que no da lugar a interferencia en los resultados por la influencia de factores externos (Figura 3.1).



Figura 3.1 Proceso de inoculación con *Phytophthora capsici* en plántulas *in vitro* de cocotero. a) *P. capsici* en PDA, b) aprox. 1 cm² de micelio de *P. capsici* para el proceso de inoculación de plántulas de cocotero, c) incubación de las plántulas inoculadas en medio de cultivo Y3.

3.2.2.4 CONFIRMACIÓN DEL MÉTODO DE INFECCIÓN DE *Phytophthora* capsici EN PLÁNTULAS INOCULADAS

Para el ensayo de infección por el método de resiembra en cajas Petri con medio PDA del tejido de las plántulas inoculadas, se cortaron secciones de tejido dañado de algunas plántulas de los tratamientos evaluados y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% durante dos minutos, después se lavaron con agua destilada y se colocaron en el medio de cultivo PDA. Este procedimiento también se realizó en los testigos evaluados. Finalmente, se analizó macroscópica y microscópicamente, para cerciorarse de la identidad de la cepa.

3.2.3 Phytophthora palmivora

3.2.3.1 ACTIVACIÓN DE LA CEPA DE Phytophthora palmivora

Para llevar a cabo la propagación de *Phytophthora palmivora* (ATCC[®] 52239TM) se procedió a descongelar el vial el cual contiene plugs (micelio de la cepa contenido en aprox. 0.5 cm³ de medio de cultivo sólido), colocándolo en un baño maría a 25-30°C durante 5 minutos. Después se limpió el vial con etanol al 70% y los plugs fueron transferidos asépticamente a una caja Petri con medio de cultivo sólido V8. Finalmente se incubó la cepa a 24-26°C durante 6 a 10 días. Se realizó la documentación del crecimiento de la cepa. El proceso de propagación de *Phytophthora palmivora* (ATCC[®] 52239TM), se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor (ATCC/Científica SENNA).

3.2.3.2 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE Phytophthora palmivora

3.2.3.2.1 CONSERVACIÓN POR SUSPENSIÓN EN AGUA DESTILADA

Este método consiste en suspender en agua estéril células del cultivo como conidios, esporas, picnidios, esclerocidos, zoosporas, etc. Se realizó la Preparación de suspensión de zoosporas según dos reportes. En el método reportado por Pinto da Silva and Nogueira 1977, se adicionó a cada placa Petri 20 mL de agua destilada estéril a 10°C, después se colocaron las placas durante 30 minutos en una cámara oscura a 5°C, seguida de una incubación durante 30 minutos en una cámara oscura a 25°C. En el método reportado por Fundora et al. 2014, se adicionó a cada placa Petri 10 mL de agua destilada estéril a 10°C, seguida de una incubación durante 30 minutos en una cámara oscura a 25°C. En el método reportado por Fundora et al. 2014, se adicionó a cada placa Petri 10 mL de agua destilada estéril a 10°C, seguida de una incubación durante 2 horas en una cámara oscura a 37°C. Para los dos métodos mencionados anteriormente se frotó suavemente con asa de vidrio el crecimiento de la cepa y se vació el sobrenadante obtenido en tubos estériles. Se etiquetó y guardó en refrigeración y en la oscuridad hasta su siguiente uso.

3.2.3.2.2 CONSERVACIÓN POR SUSPENSIÓN EN MEDIO LÍQUIDO V8 Y GLICEROL

Se preparó el medio de cultivo líquido (2% de jugo V8 comercial; 0.003 g/mL de CaCO₃; pH 7.2). Después se esterilizó medio de cultivo y glicerol (100%). Se cortaron 1 cm³ de micelio de *P. palmivora* y se colocaron en medio de cultivo líquido. Se incubó la cepa en el medio líquido V8 a 25°C y estático, hasta observar el mayor crecimiento posible (aproximadamente 10 días). Finalmente se colocó en tubos de 2 mL 1600 µL de cultivo y 400 de glicerol (100%). Se etiquetó e incubó a -80°C para su posterior uso.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 ENSAYO DE TOXICIDAD DE MeJA EN PLANTULAS in vitro DE COCOTERO

Con el fin de conocer cuáles son los efectos secundarios que causa el MeJA a las plántulas de cocotero provenientes de cultivo *in vitro*, se realizó un ensayo de toxicidad, variando las concentraciones de la fitohormona MeJA, para determinar en cuál de estas concentraciones se observaban efectos fisiológicos diferentes al desarrollo normal de la plántula. Las concentraciones de 100 y 200 µM de MeJA no causan algún daño fisiológico a la plántula comparada con el testigo. Sin embargo, concentraciones de MeJA por encima de 400 µM provocan una coloración amarillenta en toda la plántula, además de un menor desarrollo en la altura. En los 5 tratamientos (100, 200, 400, 600 y 800 µM de MeJA) se documentó el desarrollo fisiológico de las plántulas durante un periodo de 40 días. Los resultados obtenidos se presentan a continuación en la figura 3.2.



Concentración en µM de MeJA a los 40 días

Figura 3.2 Ensayo de toxicidad a MeJA en plántulas in vitro de cocotero.

3.3.2 Phytophthora capsici

3.3.2.1 EVALUACIÓN DE DIFERENTES FORMAS DE INOCULACIÓN CON *Phytophthora capsici* EN PLÁNTULAS DE COCOTERO

En el primer método, no se observó una propagación externa inmediata del patógeno, contrario a lo observado en el segundo y tercer método donde una propagación desde la zona inoculada de la planta hasta extenderse sobre el medio de cultivo a partir del día cuatro de inoculación (Figura 3.3). En cuanto a la sintomatología de la plántula, en el método de inoculación en tallo la plántula mostró necrosis principalmente en las hojas al cuarto día de inoculación; la plántula que fue infectada por medio de suspensión de zoosporas mostró una mayor vigorosidad presentando sintomatología de necrosis en hojas a partir del día 14 de inoculación. En el método donde se realizó una herida para facilitar la propagación del patógeno la plántula manifestó sintomatología inmediatamente al siguiente día de inoculación, presentando necrosis la zona de la herida con micelio (tallo) y extendiéndose rápidamente hacía las hojas. La plántula testigo mostró necrosis en la zona circundante a la herida, sin daño en hojas (Figura 3.3).



Figura 3.3 Tipos de inoculación y propagación de *Phytophthora capsici* en plántulas *in vitro* de cocotero.

Los tres métodos de inoculación culminaron en la muerte de las plántulas. Mediante la medición de síntomas, el método de infección por medio de herida con micelio fue el método efectivo para la evaluación de la interacción planta-patógeno en menor tiempo, debido al daño y rápida propagación de *P. capsici* observado a través de las raíces y demás tejidos.



Figura 3.4 Proceso de infección de plántula de cocotero inoculada con *Phytophthora* capsici por medio de herida con micelio en tallo.

3.3.2.2 EFECTO DEL PRETRATAMIENTO CON MeJA (50-600 µM) EN PLÁNTULAS DE COCOTERO INOCULADAS CON *Phytophthora capsici*

La evaluación del daño causado por *P. capsici* a las plántulas tratadas con MeJA, mostró que las plántulas tratadas con 50, 100 y 150 µM de MeJA e infectadas con *P. capsici* presentaron necrosis en tallo y hojas jóvenes igual que el testigo positivo 2a. Por otro lado, las plántulas con 200 µM de MeJA no presentaron daño alguno en ninguno de los tejidos (Figura 3.5, Tabla 3.2). La disección de la plántula inoculada mostró pudrición de cogollo en diferentes porcentajes (Tabla 3.2, Figura no mostrada). El testigo 3 manifestó la misma sintomatología que la plántula tratada con 200 µM de MeJA (Tabla 3.2).



Concentración en µM de MeJA

Figura 3.5 Plántulas de cocotero pretratadas con MeJA (0-200 μ M) e infectadas con *Phytophthora capsici.* De izquierda a derecha: Testigo, 50, 100, 150 y 200 μ M de MeJA.

Los resultados indican que las plántulas que presentaron mayor porcentaje de daño en hojas, tallo y raíz son el testigo 2a y los tratamientos con 50, 100 y 150 μ M de MeJA (Tabla 3.2), alcanzando el 47% de incidencia en hojas (100 μ M MeJA) y el 80% de severidad en tallo y base (50 μ M MeJA). Sin embargo, las plántulas expuestas a 200 μ M de MeJA, mostraron indicios de daño menores en comparación con las otras concentraciones (Tabla 3.2), obteniendo 18% de incidencia en hojas y 33% de severidad en tallo y base.

Tratamiento/Teiido evaluado	Testigos		[] MeJA en µM			
	2a	3	50	100	150	200
% incidencia hojas	25	20	35	47	30	18
% severidad tallo y base (raíz)	50	33	80	50	33	33

Tabla 3.2 Porcentaje de incidencia y severidad evaluados a los 14 días en plántulas *in vitro* de cocotero pretratadas con MeJA e inoculadas con *Phytophthora capsici*.

Nota: Testigo 2a (0 µM de MeJA con P. capsici); Testigo 3 (2.5 mM de SA con P. capsici)

Los ensayos 4b, 5, 6, testigos 1 y 2b (200 μ M de MeJA con *P. capsici*, 400 μ M de MeJA con *P. capsici*, 600 μ M de MeJA con *P. capsici*, 0 μ M de MeJA con *P. capsici* y 0 μ M de MeJA sin *P. capsici* respectivamente) evaluados a los 21 días de inoculación

muestran que las plántulas desarrollaron un daño progresivo a partir del sexto día. Este daño se observó principalmente en la zona de inoculación y en las hojas jóvenes de la plántula; estos tejidos presentaban necrosis, a los 11 días de la inoculación ya era más evidente el daño causado por el Oomiceto (Figura 3.6). Aquellas plántulas expuestas a 200 y 400 μ M de MeJA presentaron síntomas de daño menores comparados con 600 μ M de MeJA, sin embargo, todas las plántulas inoculadas a los 21 días del ensayo presentaron el mismo tipo de daño, necrosis en hojas, tallo, raíz, debilitamiento y amarillamiento. El testigo 1, presentó daño similar a aquellas tratadas con 600 μ M. El testigo 2b mostró un desarrollo normal al de una plántula de cocotero de cultivo *in vitro* (Figura 3.6).



Concentración en µM de MeJA

Los resultados del porcentaje de daño en hojas muestran que las plántulas que presentaron mayor daño fueron aquellas expuestas a 400 y 600 MeJA con un porcentaje de incidencia de 55 y 75%. Las plántulas testigo mostraron un daño en hojas de 18% (Tabla 3.3). En tallo y base las plántulas más afectadas son el testigo 1, inoculado con *P. capsici* y 600 MeJA con un porcentaje de incidencia de 42 y 31%. Las plántulas testigo mostraron un daño en tallo y base de 12% (Tabla 3.3).

Figura 3.6 Plántulas de cocotero pretratadas con MeJA (0-600 μ M) e infectadas con *Phytophthora capsici.* De izquierda a derecha: Testigo, 0, 200, 400 y 600 μ M de MeJA.

Tratamiento/Teiido evaluado	Testigos		[] MeJA en µM		
	1	2b	200	400	600
% incidencia hojas	35	18	42	55	75
% severidad tallo y base (raíz)	42	12	25	30	31

Tabla 3.3 Porcentaje de incidencia y severidad evaluados a los 21 días en plántulas *in vitro* de cocotero pretratadas con MeJA e inoculadas con *Phytophthora capsici*.

Nota: Testigo 1 (0 µM de MeJA con P. capsici); Testigo 2b (0 µM de MeJA sin P. capsici)

3.3.2.3 CONFIRMACIÓN DE LA INFECCIÓN POR *Phytophthora capsici* EN PLÁNTULAS INOCULADAS

Se logró confirmar el crecimiento del patógeno *P. capsici* en el tejido colectado de las plántulas inoculadas y tratadas de 0 a 600 µM MeJA contrario al testigo (Figura 3.7), los que confirma que las plántulas estaban infectadas por el Oomiceto.



Figura 3.7 Reaislamiento de *Phytophthora capsici* a partir de tejido necrosado de las plantas de los diferentes tratamientos. Imágenes de izquierda a derecha, Testigo (Sin inóculo), 0, 200, 400 y 600 µM MeJA.

3.3.3 Phytophthora palmivora

3.3.3.1 PROPAGACIÓN DE Phytophthora palmivora

Se ha reportado que el tiempo necesario para un crecimiento significativo variará de una cepa a otra. En el caso de la cepa *Phytophthora palmivora* (ATCC[®] 52239TM), se observó un crecimiento acelerado a partir del tercer día posterior a la inoculación,

continuando de esta manera hasta el día 11 en la cual se realizó la resiembra de la cepa en medio de cultivo sólido V8 para su posterior uso.



Tiempo de crecimiento (días) de Phytophthora

Figura 3.8 Crecimiento de la cepa de *Phytophthora palmivora* en medio V8.

3.3.2.2 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE Phytophthora palmivora

En el método de conservación por suspensión en agua destilada, no se obtuvieron resultados favorables ya que la cepa *Phytophthora palmivora* (ATCC[®] 52239TM), no mostró viabilidad alguna ni signos de crecimiento. Después de dos meses de almacenamiento se procedió a evaluar el método por suspensión en medio líquido V8 y glicerol (20%). Se observaron signos de viabilidad aproximadamente a los 10 días de su inoculación en medio sólido V8 (Figura 3.9).



Días transcurridos a partir de la resiembra con P. palmivora

Figura 3.9 Representación del crecimiento de Phytophthora palmivora.

3.4 DISCUSIÓN

Los mecanismos de defensa inducidos en plantas pueden ser activados por medio de la inoculación de un patógeno, por medio de la aplicación de inductores químicos o por la exposición a ambos (Soto Sedano and López Carrascal 2012). Los patógenos vegetales *Phytophthora capsici y Phytophthora palmivora* son oomicetos que infectan diversos cultivos agronómicos de importancia económica en todo el mundo causando pérdidas económicas graves (Santos and Aragão 2009; Dong et al. 2015; Rahman et al. 2015).

En cocotero se ha reportado que *P. palmivora* causa una enfermedad llamada pudrición de cogollo (Rajeswari et al. 2020). Mientras que en el caso de *P. capsici*, solo ha sido relacionado de manera indirecta con palma de coco por infección cruzada al ser sembrada a lado de cultivos de pimienta (Suraby et al. 2020). El uso de inductores químicos como SA y MeJA para el control de estos patógenos es una herramienta útil y eficaz para el manejo de enfermedades y para el estudio de los mecanismos de defensa que utilizan las plantas contra patógenos (Doornbos et al. 2011; Carvalhais et al. 2017).

Oliveira et al. 2015 demostró que la aplicación de MeJA a plantas de frijol activaba un mecanismo de defensa contra el hongo patógeno Sclerotinia sclerotiorum. En otro estudio se demostró que la aplicación exógena de MeJA, SA y Trichoderma harzianum como biocontrol a plantas de tomate activa la defensa contra el hongo patógeno Fusarium oxysporum. Uno de los efectos más comúnmente observados debido a la actividad de patógenos en plantas es el amarillamiento y necrosis de los tejidos, lo cual es un indicador del daño en la actividad fisiológica de la planta (Michel et al. 2012; del Prado-Vera et al. 2018). En nuestros resultados de la interacción plata-patógeno se pueden observar los efectos antes mencionados. Las plántulas control negativo, no inoculadas con patógeno, mostraron un porcentaje de daño menor comparado con los controles positivos, inoculadas con P. capsici y P. palmivora. Sin embargo, las plántulas de los tratamientos que fueron expuestas a MeJA y posteriormente inoculadas con P. capsici mostraron un porcentaje de daño mayor a los controles negativos y un porcentaje menor a los controles positivos, esto puede ser debido a que el tratamiento previo con MeJA pudo causar la inducción de un mecanismo de defensa tipo ISR en las plántulas del ensayo, ya que el MeJA es un regulador de la biosíntesis de JA y la señalización en plantas que activan varios mecanismos de defensa, induciendo una reprogramación masiva de la expresión génica (Carvalhais et al. 2017). Esta fitohormona ha sido ampliamente estudiado en *Arabidopsis thaliana* (Boter et al. 2004). Las concentraciones comúnmente empleadas a especies modelo para análisis de expresión están entre 100 y 300 µM de MeJA (Xie et al. 2010; Jiang et al. 2016). Sin embargo, en este estudio se evaluaron concentraciones desde 50 hasta 600 µM de MeJA, con la finalidad de conocer el daño o beneficio que le causa al cocotero. En el ensayo de toxicidad donde podemos observar que concentraciones mayores a 400 µM de MeJA en plántulas *in vitro* de cocotero causan una inhibición del crecimiento, así como amarillamiento en hojas, es decir, son dañinas para el desarrollo normal de la plántula en condiciones *in vitro*.

En general, a partir del día 7 se observaron daños graduales en plántulas tratadas con menor a mayor concentración, especialmente en hojas jóvenes y tallo, los testigos negativos, no inoculados, así como las que tenían valores de MeJA entre 200 y 400 µM mostraron un menor daño comparado con los demás tratamientos. Los testigos positivos, inoculados con *P. capsici*, presentaron una sintomatología de daño similar a aquellas tratadas con menores concentraciones de 200 µM y de 600 µM, lo que nos indica que probablemente concentraciones bajas de MeJA son insuficientes para activar una respuesta de defensa en cocotero y que concentraciones altas de MeJA podrían ser dañinas para las plántulas de cocotero. Así también, los resultados de este trabajo nos indican que las concentraciones de entre 200 y 400 µM de MeJA, son las ideales para realizar el ensayo de expresión de los genes relacionados con la defensa ISR.

CAPÍTULO IV

TRANSCRIPTOME ANALYSIS REVEALS KEY DEFENSE-RELATED GENES UPON SA INDUCTION IN *Cocos nucifera* L.

Silverio-Gómez C¹., Vega-Arreguín J²., Nic-Matos G¹., Narváez-Cab M¹., Sáenz-Carbonell L¹. & Oropeza C¹.^{*}

¹Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., Unidad de Biotecnología, Calle 43 No. 130 x 32 y 34. C.P. 97205. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México.
²UNAM: Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León (ENES-León), Ciencias Agrogenómicas, Blv. UNAM #2011, Predio El Saucillo y, Comunidad de los Tepetates, El Potrero, C.P. 37684. León, Guanajuato, México.
*Centro de Investigación Científica de Yucatán, Unidad de Biotecnología, Calle 43 No. 130 x 32 y 34. C.P. 97205. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México.
*Corresponding author: E-mail: cos@cicy.mx; ORCID: 0000-0002-7352-3692

ABSTRACT

Background Salicylic acid (SA) is an important regulator of genes involved in plant defense and pathogen-triggered systemic acquired resistance (SAR). Coconut is an important crop affected by several pathogens. Reported evidence suggests SA involvement in defense responses, including SAR in coconut.

Objective To identified differentially expressed genes in leaf and root tissues of coconut plantlets, as a result of SA, that might be involved in coconut defense responses.

Methods Comparative transcriptomic analysis by RNA-Seq of leaf and root tissues from *in vitro* coconut plantlets unexposed and exposed to SA 2.5 mM for 48 h. And *in silico* validation of gene expression by qRT-PCR.

Results We identified 4,615 and 3,940 differentially expressed unigenes (DEUs) in leaf and root tissues respectively. Our GO analysis showed functional categories related to the induction of defense responses, such as "systemic acquired resistance" and highly enriched hormone categories, such as abscisic acid. The most abundant KEGG pathway in our results was "Biosynthesis of antibiotics". Our findings support that exogenous application of SA to plantlets induced the activation of PRs, RGAs, *ICS2*, *NLTP2*, *PER4*, *TRXM* and some WRKYs mediated by NPR1-dependent pathways. Also, we found DEUs, such as *BZR1*, *HSL1*, and *WHY2* that support that SA could regulate defense-related genes through NPR1-independent pathways.

Conclusion The present study of massive data analysis carried out on coconut plantlets exposed to SA, generates valuable information that increases our understanding of defense molecular mechanisms in coconut and open new venues for research for the improvement of management of coconut diseases.

Keywords Coconut palm · RNA-Seq · Salicylic acid · Transcriptome · Systemic Acquired Resistance

INTRODUCTION

The coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is an economically important crop in the tropical regions of the world, due to the great diversity of high value products that can be obtained from it, such as packed water, virgin oil, milk, flour, sugar, fiber derivatives, etc. (FAO, 2016; Prades et al. 2016). Unfortunately, coconuts can be seriously affected by a wide variety of pathogens causing diseases that affect its survival and productivity (Dollet et al. 2012; Oropeza-Salín et al. 2020). However, plants have developed have developed inducible defense mechanisms, capable of counteracting the harmful effects of pathogens and the diseases associated with them. One of these mechanisms is known as Systemic Acquired Resistance (SAR), which is a broad-spectrum and long-lasting response (Fu and Dong 2013). SAR is activated by the accumulation of salicylic acid (SA), a phenolic compound naturally synthesized by plants (Cao Hui et al. 1994; Durrant and Dong 2004).

An increase in the level of SA causes an increase in the expression levels of pathogenesis related genes, establishing the hypersensitive response (HR), and promoting the SAR response (Durrant et al. 2007). There is a variety of genes involved in the activation of SAR, mainly NPR1, considered the master regulator of this response, since it interacts with transcription factors (TF) such as TGAs and WRKYs, induces the synthesis and accumulation of pathogenesis-related proteins (PRs) (Cao et al. 1998; Durrant and Dong 2004; Balconi et al. 2012). In Salvia (*Salvia miltiorrhiza*), genes associated to NPR1 nuclear translocation (TRXs), genes related to the antioxidant system (Peroxidases and GSTs), ABC transporters and ethylene response transcription factors (ERFs) were significantly induced in response to SA (Zhang et al. 2016). It has also been reported that SA affects the synthesis or signaling of other

hormones such as jasmonic acid (JA), ethylene (ET), abscisic acid (ABA) and gibberellic acid (GA), which communicate antagonistically or synergistically, enhancing the defense priming status of the plant (Vlot et al. 2009), a phenomenon known as crosstalk (Pieterse et al. 2009).

In the case of coconut palm, there are only a few reports related to defense mechanisms. It has been reported that exogenous application of SA and chitosan to coconut callus cultured *in vitro*, could activate genes associated to pathogen recognition, such as MAP-kinase (Lizama-Uc et al. 2007). In addition, in coconut plantlets kept within *in vitro* conditions, SA induced changes have been reported on the expression profiles of disease resistance gene candidates (Puch-Hau et al. 2016) and in two NPR1 homologue genes (Nic-Matos et al. 2017). These reports suggest the existence in coconut of a SAR-type mechanism induced by SA. Therefore, in order to try to increase our understanding of defense responses in the coconut palm, the main objective of the present study was to identified differentially expressed genes by RNA-sequencing (RNA-Seq), in leaf and root tissues of coconut plantlets (within *in vitro* conditions) as a result of SA treatment.

MATERIALS AND METHODS

PLANT MATERIALS AND SAMPLE PREPARATION

In vitro cultured coconut plantlets (*C. nucifera* L.) from the Mexican Pacific Tall (MXPT) ecotype, considered resistant to Lethal Yellowing (LY) (Zizumbo-Villarreal et al. 2008), were used. Plantlets were obtained by somatic embryogenesis following the protocol reported by Sáenz et al. (2018). Samples for RNA-Seq analysis were obtained from 6 plantlets, separated into 2 groups with 3 plantlets each (treatments and controls). In the treatment group, three plantlets were treated with SA (+ SA) (Sigma, USA), at a concentration of 2.5 mM added in the Y3 culture medium, without activated carbon. Control plantlets were placed in the Y3 culture medium without the addition of SA (- SA). After 48 h of treatment, the leaves and roots of each plantlet were collected and immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis. All treatments were conducted at 25 °C with three biological replicates.

RNA EXTRACTION, LIBRARY CONSTRUCTION AND ILLUMINA SEQUENCING

The Quick-RNA MiniPrep Plus Kit (Zymo Research) was used for RNA extraction and the enzyme *Turbo*-DNase (Ambion) was employed to remove DNA residues from the samples, following the manufacturer's instructions. Sequencing was performed at the IBT-UNAM-Mexico, where the mRNA libraries were prepared using the TruSeq Stranded mRNA kit, followed by the construction of the cDNA libraries. Sequencing was performed in a 2 x 75 bp (paired-end) format using the NextSeq 500 v2 HT platform. The generated raw sequence dataset was submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) in the Short Read Archive (SRA) database under accession number PRJNA622305.

DE NOVO SEQUENCING ANALYSIS

The raw reads from the sequencing process were subjected to quality control using the FastQC software (Andrews, 2010). This software offers a general overview of the sequenced data, such as sequence quality by base in "Phred quality score", quality scores by sequence and GC content by base, thus helping to identify potentially problematic areas in the data, before being subjected to any type of analysis. Next, data was filtered using Trimmomatic v.0.36 software (Bolger et al. 2014), in order to remove low quality sequences. *De novo* assembly was performed the Trinity software (Grabherr et al. 2011) using default parameters. The resulting *de novo* assembly was used as a reference for mapping the sequenced reads, performed with Bowtie2 software (Langmead and Salzberg 2012) (Table S1). Finally, the estimation of its abundance was carried out using the Cufflinks software (Trapnell et al. 2010).

QUANTIFICATION OF DIFFERENTIALLY-EXPRESSED GENES AND FUNCTIONAL ANNOTATION

Comparative levels of expression between samples were normalized using FPKM units. The differential expression of the analyzed genes was identified by the maximum likelihood method (P < 0.05) (Reiner et al. 2003), using the statistical software R (Team 2013) with the Edge R package (Robinson et al. 2010). To determine the 'Up-regulated' unigenes, the value of Log2Fold Change was set at Log2FC > +2 and at Log2FC < -2 for 'Down-regulated' unigenes, with a "False Discovery Rate" (FDR) < 0.05. The

comparison matrix was established using the treatment samples (+ SA) vs the control samples (-SA), separated by root and leaf tissues. Annotation of the differentially expressed unigenes in the transcriptome of the coconut plantlets was carried out with the Blast2GO (B2G) software (Conesa et al. 2005). Using default parameters, an enrichment analysis of the functional categories was performed according to the biological process, the cellular component and the molecular function. The sequences were also associated with enzymatic codes and metabolic pathways, using the KEGG PATHWAY database (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa et al. 2012). Finally, after quantification of differentially-expressed genes and functional annotation analysis, we selected only defense-related genes differentially expressed in response to the application of SA.

defense-related genes differentially expressed in response to the application of SA.

REAL-TIME PCR GENE EXPRESSION VALIDATION

The observed differential expression of the genes in response to SA was validated by qRT-PCR using total RNA from samples treated and untreated with SA as described above. For this analysis, the TLP1 gene (Albertazzi et al. 2009) was chosen, as well as the GUN6 gene, an endo-1,4-beta glucanase (Finiti et al. 2013), and the transcription factor WRKY57 (Nejat et al. 2015). The TRXM gene (Zhang et al. 2015) and the WRKY51 (Ding et al. 2018) were also selected (Table 6). Specific primers designed with the OligoPerfect Primer Designer (Thermo Fisher Scientific) software were used. Primers were designed to amplify fragments of approximately 200 bp (Table S2). Melting curve analysis indicated that the primers amplified a specific PCR product. RNA was extracted using the Plant/Fungi Total RNA Purification kit (Norgen Biotek Corp), following the supplier's instructions. The quality of the samples was verified by quantification in a NanoDrop One system (Thermo Fisher Scientific). The first cDNA strand was synthesized from 1 μ g of total RNA, using random hexamers (Invitrogen) in conjunction with the reverse transcriptase RevertAid H Minus (Thermo Fisher Scientific), following the instructions of the manufacturer. Subsequently, the quality of the cDNA was verified by amplification with primers designed for the 18S gene (Applied Biosystems). The qRT-PCR reaction mixture had a final volume of 20 μ L, containing 2 μ L of cDNA (1 μ g), 10 μ L of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 1 μ M of each of the primers. The 18S rRNA (Applied Biosystems) gene was used as an internal control to normalize the data. Each reaction was performed in triplicate using a Rotor-Gene Q system (QUIAGEN) under the following amplification conditions: 2 min at 50 °C followed by 10 min at 95 °C and 45 cycles from 15 s to 95 °C and 1 min at 62 °C. The results of the qRT-PCR were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen 2001), taking the 18S gene as an endogenous control and the –SA samples as controls for the comparative analysis (Real-Time PCR Applications Guide BIORAD). Three technical replicates were performed for each gene and three biological replicates of each condition. The results were expressed in units of relative expression. Data represent the mean of Relative Quatification (RQ) ± standard deviation (SD) of the three independent biological samples. Analysis of variance (ANOVA) with Tukey Test as the post-hoc test ($P \le 0.05$) was applied to the relative expression using the PAST software (Hammer et al. 2001).

RESULTS

ILLUMINA SEQUENCING, ALIGNMENT AND DE NOVO ASSEMBLY

The cDNA libraries from the coconut plantlets with (+SA) and without (-SA) exposure to SA were sequenced in a 2 x 75 paired-end format, using the Illumina RNA-Seq sequencing technology, yielding 110,458,036 and 104,979,984 reads, respectively. A total of 215,438,020 reads (+SA and -SA) were obtained. Grouped by tissue of origin, the total of reads in (+SA)-leaves and (-SA)-leaves was of 60,029,934 and 65,876,168, respectively, and of 50,428,102 and 39,163,816 in (+SA)-roots (-SA)-roots, respectively. After filtering with Trimmomatic software, 81.22% to 85.78% of the total reads in each sample were kept for further analyses (Table 1). Mapping the filtered reads to the *de novo* assembled transcriptome, using Bowtie2 software, an alignment percentage of 88.32% to 90.35%. From this, 48.36% aligned accordingly exactly once (AC = 1) and 33.79% aligned accordingly more than once (AC> 1) (Table S1). As for the *de novo* assembly, a total of 150,486 contigs were obtained with an average length of 809 bp (Table 4.1).

Sequencing Results ¹					
Sequencing Results	Leaf (+SA)	Root (+SA)	Leaf (-SA)	Root (-SA)	
Total Illumina reads for tissue	60,029,934	50,428,102	65,816,168	39,163,816	
² Total reads after QC	51,485,112	41,456,544	55,567,620	31,807,716	
% reads after QC	85.78	82.21	84.44	81.22	
Mapping Results ¹					
³ % ACE = 1	46.30	52.44	44.92	49.81	
⁴ % AC > 1	38.18	28.84	37.98	30.17	
% Alignment	90.35	89.06	89.42	88.32	
Assembly Results					
Total transcripts	Total transcripts 150,486				
Total bases		121,778	,431		
Average length Contig (bp)		809			

Table 4.1 Sequencing, de novo assembly and mapping results of leaf and root samples

¹Average reads (paired-end) obtained from 3 replicates for each tissue (+SA and -SA) (n=3); ²Total reads after quality control with trimmomatic; ³ACE=1: Aligned concordantly exactly 1 time; ⁴AC >1: Aligned concordantly > 1 times; QC: Quality control.

DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN RESPONSE TO SALICYLIC ACID

The comparison between treatments (+SA) against their respective controls (-SA) yielded a total of 6,081 differentially expressed unigenes (DEUs); that corresponded to 3,245 DEUs in leaves and 2,836 DEUs in roots (Table 4.2). The number of repressed unigenes in leaves is 7 times greater when compared to the amount of repressed root unigenes and the amount of repressed unigenes in roots and the amount of unigenes induced in roots is 3 times greater than that of leaves (Fig. 4.1A and B). Furthermore, we show that out of the total of DEUs grouped by tissue only 749 unigenes coincide in both tissues (leaf and root), while tissue-specific unigenes are present in a larger proportion (3,866 for leaves and 3,190 for roots) (Fig. 4.1C). Also, the MDS (Multidimensional Scaling Plot of Distances) analysis shows that all sample replicates were grouped according to the tissue and the corresponding treatments (Fig. S4.1).

Table 4.2 Differentially expressed unigenes in tissues of coconutplantlets treated and untreated with SA

Differential expression profile of different comparisons				
Comparisons	^a Down-regulated	^a Up-regulated	°TDE	
Leaf	2,869	376	3,245	
Root	749	2,087	2,836	
Total	3,618	2,463	6,081	



^aLog2FC < -2 are down-regulated and Log2FC > +2 are up-regulated unigenes (*P* < 0.05). ^cTDE: Total differential expression for each comparison. Up and Down regulated unigenes.

Root

Fig. 4.1 Differential expression of coconut unigenes of each comparison. A Heat map representation of differentially expressed unigenes. Each line in the

heatmap represents a differentially expressed unigene. The red color represents DEUs down-regulated (Log₂FC < -2), the blue color represents DEUs upregulated (Log₂FC > +2) and the black color represents unigenes without differential expression. **B** Graphical representation of up-regulated and downregulated unigenes based on Log₂FC > +2 and Log₂FC < -2 respectively. **C** Venn diagram of DEUs in the two tissues evaluated.

FUNCTIONAL ANNOTATION AND CLASSIFICATION BY ONTOLOGICAL TERMS

To further analyze the genes that were differentially expressed in root and leaves upon SA treatment, functional annotation was performed by assigning Gene Ontology (GO) terms to each gene according to their molecular function, cellular components and biological process. A total of 20 GO categories were identified, with 9 enriched GO categories for leaves and 13 enriched GO categories for roots. The GO annotations for leaves assigned a total of 2,947 ontological terms, classified as 52% for molecular function, 13% in the cellular component and 35% for biological process (Fig. 4.2). For roots, the annotation assigned 5,024 ontological terms; 23% molecular function, 11% in cellular component and 66% for biological process. In the category of biological process for both tissues, leaves and roots, the most frequently represented groups were "Response to abscisic acid" (62 unigenes in leaves and 119 unigenes in roots), "Response to water deprivation" (81 unigenes in leaves and 103 unigenes in roots), "Defense response to fungus" (59 unigenes in leaves and 67 unigenes in roots), "response to chitin" (54 unigenes in leaves and 60 unigenes in roots), and "Response to salicylic acid" (49 unigenes in leaves and 59 unigenes in roots). (Fig. 4.3A, Fig. 4.3B).



Fig. 4.2 Gene ontology of DEUs in leaf and root of coconut palm. Molecular function, Cellular component and Biological process. Bars values represent the analyzed genes under P < 0.05. Green bars represent leaf tissues and Brown bars represent root tissues.



Fig. 4.3 Gene ontology Biological process of DEUs in (A) leaf and (B) root of coconut palm. Significance indicated. Bars values represent the analyzed genes under P < 0.05. Green bars represent leaf tissues and Brown bars represent root tissues.

KEGG PATHWAYS ANALYSIS OF DEUs

The KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) was used to identify metabolic pathways that interact with each other in coconut leaf and root tissues exposed to SA (Fig. 4.4). 741 DEUs were annotated in the KEGG database and a total of 215 metabolic pathways were assigned in both tissues. The analysis assigned 258 unigenes distributed in 97 metabolic pathways for leaf tissues and 483 unigenes distributed in 118 metabolic pathways for the root tissues. The most represented pathways in both tissues, leaves and roots, were "biosynthesis of antibiotics" (13 enzymes for leaves and 36 enzymes in roots), "glycerolipid metabolism (8 enzymes for leaves and 9 enzymes in roots) and pyruvate metabolism (5 enzymes for leaves and 8 enzymes in roots) (Fig. 4.4).



Fig. 4.4 KEGG classifications of DEUs in leaf and root of coconut palm under SA induction. Bars values represent the analyzed genes under P < 0.05. Green bars represent leaf tissues and brown bars represent root tissues.

UNIGENES INVOLVED IN SA SIGNALING DEFENSE RELATED

In this study, the attention was mainly focused on the defense related genes expressed in response to the application of SA and not so much on the genes of greater abundance. Then identified unigenes shown are the most relevant identified unigenes to this study, taking into consideration the determined annotation for each unigene (Table 4.3, Fig. 4.6). Also, a screening of induced and repressed unigenes that showed expression at the same time in both tissues was performed, by which 37 induced and 51 repressed unigenes were found, in leaf and root tissue (Fig. S4.2). Particularly in leaf tissues, genes encoding for proteins such as chlorophyll binding proteins, response to abiotic stress, enzymes related to biotic stress, proteins involved in cell wall synthesis, pathogenesis related proteins and transcription factors were found. On the other hand, unigenes found in the root tissues encode for proteins such as transcription factors, a ubiquitin-like protein, transferase enzymes, phosphate-related proteins, resistance marker proteins, RING-H2 type protein, the candidate for isoflavone reductase protein, a thioredoxin, protein kinases related to the signaling cascade and finally, a protein involved in the synthesis of adenosylmethionine (Table S4.3).

Gene	Predicted Function	Regulation
ALL12	Isoflavone reductase-like protein	Up-regulated
AUX11	Auxin induced protein 11	Down-regulated
AUX28	Auxin-induced protein 28	Down-regulated
BZR1	BES1/BZR1 homolog protein 1	Up-regulated
ERF023	Ethylene-responsive transcription factor ERF023	Up-regulated
ERF5	Ethylene-responsive transcription factor ERF5	Up-regulated
GUN6	Endo-1, 4-beta glucanase 6	Up-regulated
HSL1	Receptor-like protein kinase HSL1	Up-regulated
ICS1	Isochorismate synthase 2	Up-regulated
ARAK	L-Arabinokinase	Up-regulated
NLTP2	Non-specific lipid-transfer protein 2	Up-regulated
NPR1	Regulatory protein NPR1	Basal regulation
NPR4	Regulatory protein NPR4	Down-regulated
PER4	Peroxidase 4	Up-regulated
PIRL6	Plant intracellular Ras-group-related LRR protein 6	Up-regulated
PIRL7	Plant intracellular Ras-group-related LRR protein 7	Up-regulated
PR4B	Pathogenesis-related protein PR4B	Up-regulated
PTI6	Pathogenesis-related genes transcriptional activator	Up-regulated
RGA3	Putative disease resistance protein RGA3	Up-regulated
SABP2	Salicylic acid-binding protein 2	Up-regulated
CIPK	CBL-interacting protein kinase	Up-regulated
SNCI	Protein SUPPRESSOR OF npr1-1	Down-regulated
STH2	Pathogenesis-related protein STH-2	Down-regulated
TLP1	Thaumatin-like protein 1	Up-regulated
TRXM	Thioredoxin M-type	Up-regulated
WHY2	Single-stranded DNA-binding protein WHY2	Up-regulated
WRKY6	WRKY transcription factor 6	Down-regulated
WRKY13	WRKY transcription factor 13	Up-regulated
WRKY51	WRKY transcription factor 51	Up-regulated
WRKY53	WRKY transcription factor 53	Up-regulated
WRKY57	WRKY transcription factor 57	Down-regulated
WRKY71	WRKY transcription factor 71	Down-regulated

Table 4.3 Defense-related genes induced by SA

Up regulated: Log2FC > +2 and Down-regulated Log2FC < -2. P < 0.05

VALIDATION OF DATA THROUGH qRT-PCR

From the results obtained in the previous section, we selected genes that might have a key role in SA-mediated defense responses, corresponding to different metabolic pathways. In order to validate the *in silico* expression analysis, those genes were tested by qRT-PCR. We found that the level of most of the genes analyzed by qRT-PCR was consistent with the data obtained in the *in silico* analysis (Fig. 5, Table S4). For instance, it is shown that *TLP1*, was up-regulated in leaves 4.20-fold by RNA-Seq and 3.33-fold by qRT-PCR analysis. Whereas, *WRKY51*, was down-regulated -3.75-fold by RNA-Seq and -5.74-fold by qRT-PCR analysis. On the other hand, although *NPR1* was expressed on a basal level by RNA-Seq analysis, we found that it was up-regulated 2.98-fold in roots by qRT-PCR.



Fig. 4.5 Analysis of gene expression by RNA-Seq and validation by qRT-PCR of defense-related unigenes selected to coconut transcriptome. Green bars represent DEUs in leaf tissues. Brown color bars represent DEUs in root tissues. Bars with values > +2 represent up-regulated unigenes (Log2FC > +2). Bars with values < -2 represent down-regulated unigenes (Log2FC < -2). The asterisk symbol represents unigenes with basal expression level in RNA-Seq results (-2 < Log2FC < +2). P < 0.05

DISCUSSION

The coconut palm is considered an economically important crop in the world, however, despite being affected by many pathogens (Griffith 1987; Rohde et al. 1990; Harrison and Oropeza 2008), little is known about its defense mechanisms, and whether it is possible to induce them to fight diseases such as LY. In a wide variety of plant species, it has been found that SA can increase the expression of defense-related genes (Blanco et al. 2009; Zhang et al. 2016). In the case of coconut, evidence have been reported that supports the presence of a defense mechanism activated by SA (Lizama-Uc et al. 2007; Puch-Hau et al. 2015; Nic-Matos et al. 2017). Therefore, the identification of genes that modulate or mediate coconut defenses should provide new insights into our understanding of mechanisms in coconut that might be useful for disease management.

In the present study, we used RNA-Seq approach to study comparatively, global gene expression in leaf and root tissues of coconut plantlets after exposure (or not) to SA, to explore the induction of defense responses. The plant parts treated with SA were roots, as in previous similar studies in other plant species (He and Wolyn 2005; Molinari et al. 2014; Jendoubi et al. 2015) including coconut (Puch-Hau et al. 2015; Nic-Matos et al. 2017). Since a coconut reference genome was not available, *de novo* assembled sequences served as a reference for subsequent analyzes, which include: profiling of global gene expression, Gene Ontology (GO) annotations for sets of genes and grouping them by function, identification of metabolic pathways using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), identification of genes that are related to defense against pathogens, and validation by qRT-PCR of the expression of selected genes related to plant defense responses.

Analysis of differentially expressed genes in response to SA. In relation to global gene expression upon SA treatment, 3,245 DEUs (Differentially Expressed Unigenes) were found in leaf tissues, 376 up-regulated and 2,869 down-regulated, and 2,836 DEUs in root tissues, 2,087 up-regulated and 749 down-regulated. Then root tissues showed a greater number of up-regulated unigenes than leaf tissues, and inversely for down-regulated unigenes. These differences could be related to different signaling responses of different plant parts, but these differences could also be related to the fact that the plant part exposed to SA was roots. Actually, in previous reports it has been found that after treating the roots of plants with SA, changes such as over-expression

of PR genes have been observed in roots (Jendoubi et al. 2015), but also in leaves (Molinari et al. 2014). Defining whether the site of application is related to the type of response will require further research.

Gene Ontology classification analysis of DEUs related to stress responses. Our findings of the GO analysis showed that most of the molecular functions (MF) of the genes are essentially associated with the subcategory of binding proteins, such as zinc fingers, which act as DNA binding proteins, conferring them the ability to regulate a wide range of biological functions in plants, such as resistance to biotic and abiotic stress (Fan et al. 2015). Gene Ontology counts for the cellular component (CC) showed that most of these genes are components of the plasmatic membrane, as had already been observed in the coconut reports by Huang et al. (2014), as well as in a separate study by Lantican et al. (2019). In our study, the attention was mainly focused on the reprogramming of the biological processes related to defense genes expressed in response to the application of SA. So, the GO analysis for biological processes showed functional categories related to the induction of defense responses, such as "defense response to fungus", "defense response to bacterium", "defense response to oomycetes", and "defense response to virus", both in leaf and root tissues. We identified DEUs in the categories "response to salicylic acid" and "systemic acquired resistance" that have been reported to play an essential role in the defense response against a wide range of pathogens (Durrant and Dong 2004). In addition, we found DEUs involved in "response to oxidative stress" and "plant-type hypersensitive response", two of the earliest defense reactions, associated with cell death, which are activated in response to pathogen attack (Durrant and Dong 2004; Vlot et al. 2009). Previous studies have shown that differentially expressed unigenes in these processes might play essential roles in plant signaling due SA treatment (Blanco et al. 2009; Vlot et al. 2009).

In the present study, it was also found a highly enriched category for the hormone abscisic acid (ABA). This result suggest that SA treatment could increase ABA signaling in coconut, as it has been reported in *Salvia miltiorrhiza*, where the expression level of two ABA synthesis-related enzymes were increased upon SA treatment (Zhang et al. 2016). Besides, we found other hormone categories enriched in a lower level, such as responses to auxin, cytokinin, ethylene, gibberellin, jasmonic acid, and brassinosteroids. It has been reported that ABA plays a role in abiotic and biotic stresses by bidirectional crosstalk with SA via jasmonic acid signaling and

simultaneously SA could repress auxin signaling (Vlot et al. 2009). Our findings are suggesting a crosstalk between hormonal pathways in coconut, this is probably due to signaling network between SA and the other hormones (Pieterse et al. 2009).

Metabolic pathways related to biotic stress. In order to better understand the biological pathways of the DEUs upon SA treatment, we used Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database, selecting categories by their relevance in plant defense. The most abundant KEGG pathways in our results are "Biosynthesis of antibiotics" and "Starch and sucrose metabolism". In the "Biosynthesis of antibiotics" pathway, the candidate genes coding 'Isoflavone reductase-protein', which participates in the synthesis of phytoalexins, antimicrobial compounds widely reported in defense against pathogens (Vlot et al. 2009), including phytoplasmas (Nejat et al. 2015).

In coconut, many DEUs were significantly represented in "Starch and sucrose metabolism" which are associated with the processing of carbohydrates and are vital part of processes such as energy generation (photosynthesis), signaling, defense and cell wall synthesis in plants. The up-regulation of these pathways is a phenomenon that was also observed in *S. miltiorrhiza* after SA treatment (Zhang et al. 2016) and has been attributed to the production of materials such as callose during the defensive response against *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* infection (Finiti et al. 2013). Then, both SA and the presence of a biotic stress agent can induce changes in coconut carbohydrate metabolism (Nejat et al. 2015; Puch-Hau et al. 2015).

Validation by qRT-PCR and defense-related genes induced by SA. In the present study, qRT-PCR validation showed that the expression profiles of five selected unigenes, including *TLP1*, *GUN6*, *TRXM*, *WRKY51*, and *WRKY57* were consistent with those detected by RNA-Seq, these results corroborated the reliability and validity of our RNA-Seq results, which are discussed together below (Table 4.3). Our findings support that exogenous application of SA to coconut plants induce the activation of pathogenesis-related genes (PRs). The results revealed the up-regulation of Thaumatin-like protein 1 (*TLP1*) belonging to the PR5 family, and endoglucanase 6 (*GUN6*), a member of the PR2 family. On the other side, we found the down-regulation in root tissues of *STH2*, from the PR10 family, which makes sense since it is known to be a marker gene for the response to pathogens induced by JA and not SA (Du et al. 2017). The presence of these unigenes in coconut suggests that SA regulates their expression, normally it has been seen that these genes are markers of the SAR-type

defense response, which is a defense response that is triggered by pathogens such as fungi, bacteria and possibly phytoplasmas. (Cao Hui et al. 1994; Durrant and Dong 2004; Albertazzi et al. 2009; Nejat et al. 2015).

Furthermore, we identified over 600 homolog sequences of RGAs, of which 10 were found to be differentially expressed upon SA treatment, five down-regulated in leaves and five up-regulated in roots, among them a homolog to the resistance gene 'Putative disease resistance protein RGA3' was found in roots. Similarly, a previous study reported four putative RGAs expressed in coconut LY-resistant plants under SA treatment (Puch-Hau et al. 2016). Therefore, these results support that SA treatment could induce the RGAs expression in coconut.

Another gene identified, thioredoxin M (*TRXM*) showed up-regulation upon SA treatment in root tissues. Thioredoxins are redox regulators that has been reported to participate actively in the translocation of NPR1 from de the cytosol to the nucleus in order to enhance pathogen resistance by exogenous SA (Blanco et al. 2009; Vlot et al. 2009; Zhang et al. 2016). In contrast, it has been reported that TRXM showed down-regulation after methyl jasmonate (MeJA) treatment inducing defense against Asian corn borer in *Zea mays* L. (Zhang et al. 2015). Consequently, thioredoxins are interesting candidates for molecular cloning and functional identification analysis that will give us a more comprehensive understanding of the antagonism in the SA and JA pathways in coconut.

In addition, we identified three kinase-like genes including a receptor-like protein kinase (RLK), "Haesa (*HSL1*)" and "L-arabinokinase" in both leaf and root tissues, which are involved in recognition and signaling of pathogen attack (Sood and Chauhan 2017; Xoca-Orozco et al. 2017), and Calcineurin B-like protein (CBL), "serine/threonine-protein kinase (*CIPK*)" in root tissues, which is associated to SA-dependent responses (Puch-Hau et al. 2015). A previous report showed that the exogenous application of SA and chitosan increase the expression of a RLK in coconut callus (Lizama-Uc et al. 2007). Thus, taking these results together, they suggest that SA acts as an activator of the signaling cascade promoting the expression of genes related to the defense against biotic stresses.

Besides, transcription factors (TF) related to defense mechanisms in plants were also up-regulated. The ethylene-responsive TF "*ERF023*" was detected in leaf and root tissues, while ethylene-responsive TF "*ERF5*" was detected in roots, upon SA treatment. These ethylene responses have been observed in *S. miltiorrhiza*, showing up-regulation of the transcription factor (ERF) after the induction with SA (Zhang et al.
2016). These findings suggest that SA has the ability to stimulate the activation of the hormonal signaling pathway of ET, as one of the defense mechanisms induced by SA in coconut.

Moreover, our results showed the regulation of transcription factors *WRKY51* and *WRKY57* in leaf and root tissues after SA application, both transcription factors are involved in activation and repression of genes that actively participate in SA-mediated defense responses, such as SAR (Desveaux et al. 2004; Durrant and Dong 2004). *WRKY51* was up-regulated, similarly to previous results reported in *A. thaliana* where WRKY51 was also induced by SA treatment (Ding et al. 2018). In contrast *WRKY57* was down-regulated. A study in Arabidopsis showed WRKY57 regulation by jasmonic acid signaling and they concluded that WRKY57 negatively regulates resistance against *Botrytis cinerea* (Jiang and Yu 2016). SA is known to suppress many of JA response genes in several plant species (Pieterse et al. 2009), this could explain the down-regulation of *WRKY57* in this study. It has been seen that some WRKYs have variable expression patterns under SA treatment in leaf, steam, and root tissues of wheat (Wang et al. 2017).

Different studies have revealed that an increase of SA internal concentration in plants, due to SA exogenous application, stimulates a high-level expression of SAR-related genes, including NPR1(Cao et al. 1998; Durrant and Dong 2004; Fu and Dong 2013). In our RNA-Seq and qRT-PCR analyses, the results showed the existence of SAR activation pathway through SA signaling, and differentially expressed unigenes such as ICS2, NLTP2, PER4, TRXM and some WRKYs, that might be interacting with NPR1. Our RNA-Seq results also showed a basal level expression of NPR1, under a very strict threshold of FoldChange (FC), that was used to filter out those genes that showed lesser levels of differential expression and probably of lesser importance. However, the data without filtering, showed that NPR1 was overexpressed 1.8-fold the level of the control. This increased overexpression of NPR1 was validated by gRT-PCR analyses that showed that the level of NPR1 expression in root tissues was about 3fold the level of the control (Fig. 4.5, Table S4.4). Thus this increased expression of NPR1 is consistent with our previous report that an exogenous application of SA to coconut plantlets induced up-regulation of NPR1, also 48 hours after SA exposure (Nic-Matos et al. 2017). But also we found differentially expressed unigenes, such as BZR1, HSL1, and WHY2, that support the idea that SA could be regulating defenserelated genes independently of NPR1, as it has been reported in Arabidopsis (Desveaux et al. 2004; Blanco et al. 2009). So, these results suggest that SA in coconut could be regulating NPR1-dependent and NPR1-independent pathways. Figure 4.5, shows a model to explain the probable SA-mediated activation of NPR1dependent and NPR1-independent pathways to induce defense-related genes derived from our study.

NPR1-dependent pathways. (A) Exogenous SA treatment activates recognition proteins, such as resistance proteins (R proteins), as PIRL6, 7 (R proteins) and RGA3, these proteins induce endogenous SA synthesis through isochorismate synthase 2 (ICS2) in the cell and this increase in endogenous SA can induce defense responses via the co-activator NPR1 by repressing NPR4 and SNCI (a SNI1 homolog), both are known to be a negative regulators of NPR1 (Durrant et al. 2007; Fu and Dong 2013), and/or inducing thioredoxins (TRXM), then NPR1 interacts with WRKYs through a signaling cascade to induce PRs synthesis (Cui et al. 2018; Ding et al. 2018) (Fig. 4.6). (B) Another NPR1-dependent pathway is through exogenous SA treatment which activates recognition proteins mentioned above, these proteins can induce the plant immune system for enhance defense responses by activating the production of ROS (reactive species oxygen) through peroxidases, such as PER4, and then, thioredoxins (TRXM) leading to NPR1 reduction and releasing active monomers into the nucleus, this in turn activates the expression of defense-related genes (Vlot et al. 2009; Fu and Dong 2013), for instance PTI6, GUN6 (PR2), TLP1 (PR5), PR4B (Fig. 4.6). (C) Additionally, LTPs (lipid transfer proteins) receptors such as NLTP2, could be acting in a NPR1-dependent pathway due to its interaction with key genes involved in mobile signal for SAR, for instance DIR1 and SABP2 (Durrant and Dong 2004). LTPs are known to play a role in antimicrobial defense (Durrant and Dong 2004) and abiotic stress, when under chemical induction (Xu et al. 2018) (Fig. 4.6).

NPR1-independent pathways. (A) Exogenous SA treatment activates R proteins, for instance *PIRL6*, 7 and RGA3, then these proteins induce ICS2 and this enzyme increase endogenous SA accumulation that activates the differential expression of the transcription factor *WHY2* (a homolog of WHIRLYs), which could be leading to an increased expression of PRs (Desveaux et al. 2004; Durrant and Dong 2004; Vlot et al. 2009) (Fig. 4.6). (B) Another NPR1-independent pathway to defense responses can be through the activation of the recognition of a receptor-like protein kinase (RLK) the *HSL1* by exogenous SA, *HSL1* interacts with the promoter (BZR1) regulated by brassinosteroids to induce PRs synthesis (Santos and Aragão 2009) (Fig. 4.6).

Finally, the different signaling pathways that activate defense responses in coconut plantlets upon SA exogenous application that are proposed in this study can be useful to understand how the plant defends itself and to identify key genes such as *TRXM*, *ICS2*, *HSL1*, *WHY2* in order to determine their direct participation in the defense responses and they would be used to control pathogens.



Fig. 4.6 Sequence of events from SA recognition to defense gene induction. The red color represents DEUs down-regulated, the blue color represents DEUs up-regulated and the black color represents unigenes without differential expression NLTP2: Non-specific lipid-transfer protein 2; LTP: Lipid transfer protein receptors; PIRL6, 7: Plant intracellular Ras-group-related LRR protein 6, 7; RGA3: Putative disease resistance protein RGA3; HSL1: Receptor-like protein kinase HSL1; ICS2: Isochorismate synthase 2; PER4: Peroxidase 4; BZR1: BES1/BZR1 homolog protein 1; WHY2: Single-stranded DNA-binding protein WHY2; TRXM: Thioredoxin F-type; ROS: Reactive oxygen species; NPR1, 4: Regulatory protein NPR1, 4; SNCI: Protein SUPPRESSOR OF npr1-1; SABP2: Salicylic acid-binding protein 2; WRK6, 71, 13, 53: WRKY transcription factor 6, 71, 13, 53; PTI6: Pathogenesis-related genes transcriptional activator PTI6; GUN6: Endoglucanase 6; TLP1: Thaumatin-like protein 1; PR4B: Pathogenesis-related protein PR4B; AUX11, 28: Auxin-induced protein 11, 28.

CONCLUSION

In conclusion, the results in the present study provide a broad overview of those genes that participate in the signaling of SA in the coconut palm, showing the differential expression of multiple genes related to its defense mechanisms. In the case of the GO results of the DEUs, showed a reprogramming in groups of genes related to the defense response to pathogens (bacteria, fungi, insects, oomycetes, viruses, and nematodes), in this regard, it also showed the activation of a SAR response, as well as the activation of highly enriched hormone categories, such as ET, ABA, CK, GA, JA and SA in leaf and root tissues. The main results obtained with KEGG analysis, showed the activation of metabolic pathways related to the production of substances involved in defense, as is the production of antibiotics, phytoalexins, terpenoids, fatty acids and also carbohydrate metabolism, all of them are involved in both, physical and chemical defense. All these results suggest a reprogramming or modification in biological processes in coconut plantlets, including increasing the level of expression of key genes related to the innate immune system of the palm, providing an efficient defense system against attacks by a broad spectrum of pathogens. This allow us to conclude that the application of SA to coconut plantlets could enhance within 48 hours their defense system through NPR1-dependent and NPR1independent pathways. This study also provides valuable information that allows the identification of relevant lines of research, such as the search of intercommunication between hormonal signaling pathways and plant-pathogen interactions, that could be useful for the improvement of the management of coconut diseases.

DECLARATIONS

Consent to participate Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Consent to publish The participant has consented to the submission of the case report to the journal.

Acknowledgments Research partially funded by CONACYT (Ciencia Básica 2009 - 2013) NO. CB12977; and Horizon 2020 Framework Programme of the European Union NO.727459 (TROPICSAFE Project 2017-2021). Postgraduate scholarship awarded by CONACYT to Carmen Silverio-Gómez No.286531.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Availability of data and material The data are included within the article or additional files and the generated raw sequence dataset can be accessed under accession number PRJNA622305 in the SRA of NCBI.

Author contributions CSG conducted most of the experiments, and drafted the article. JVA helped in massive data analyze and edited the manuscript. GNM helped in primer design, data collection and edited the manuscript. MNC helped in collection, sample preparation and edited the manuscript. LSC helped in designed the experiments. CO coordinated the project, conceived and designed the experiments and edited the manuscript.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Condition	Total reads (Paired-end)	$^{a}ACE = 1$	$^{b}AC > 1$	% Overall alignment
Leaf (SA) -1	9,700,691	47.63	38.24	91.24
Leaf (SA) -2	10,035,990	46.13	37.62	89.76
Leaf (SA) -3	10,278,286	45.14	38.68	90.06
Leaf (-SA)-1	9,046,733	45.32	36.03	88.69
Leaf (-SA)-2	12,202,541	45.71	37.32	89.82
Leaf (-SA)-3	11,658,810	43.74	40.59	89.74
Root (SA) -1	7,952,240	51.33	29.75	88.89
Root (SA) -2	8,979,686	51.64	29.77	89.05
Root (SA) -3	8,282,125	54.34	27.00	89.24
Root (-SA)-1	6,723,582	47.81	29.97	87.42
Root (-SA)-2	7,690,801	51.63	29.59	88.88
Root (-SA)-3	5,167,525	50.00	30.95	88.66
Percentage		48	34	89

 Table S4.1 Comparison of mapped sequences of different treatments using the Cocos nucifera L. transcriptome

^aValues of ACE = 1, ACE > 1 and overall alignment represent the percentage of alignment using Bowtie2 program, P < 0.05. ^bAligned concordantly exactly 1 time. ^cAligned concordantly >1 times.

Comos/Drimon	Server 20 (52 - 22)	Amplicon	Prediction	The most similar sequences	Query cover/ Identity
Genes/Frimer	sequences $(3 \rightarrow 3)$	(bp)	(RNA-Seq)	(GenBank)	(%)
TLP1/F1 TLP1/R1	TAGGGATGGAAGCGAGGGAT AGAAACGTCGACCCACCAAA	151	Thaumatin-like	<i>Elaeis guineensis</i> thaumatin-like protein 1	100/97.50
TLP1/F2 TLP1/R2	TAGCCGCACTTGTTCACGAA TCCCTCGCTTCCATCCCTAA	120	protein 1	<i>Elaeis guineensis</i> thaumatin-like protein 1	100/91.39
GUN6/F1 GUN6/R1	CTGAGGTGATGGTTTCGGCT CTATGAGCAGACCGAGCCTG	160	Endo-1, 4-beta	Elaeis guineensis endoglucanase 19	100/96.88
GUN6/F2 GUN6/R2	GAGCCAATACGCCAAGCATG CGCTACTTGGTTCAGCCGTA	161 glucanase 6		Elaeis guineensis endoglucanase 19	99/97.50
WRK57/F1 WRK57/R1	CGCATTCTGAGCATGAGCAC GGAGCTACTACCGATGCACC	155	Putative WRKY	<i>Elaeis guineensis</i> putative WRKY transcription factor 57	99/97.40
WRK57/F2 WRK57/R2	GTTTCTCATCCCAGGTGGCA CTACCAGCCATGCAGTTCCA	159 factor 57		<i>Elaeis guineensis</i> putative WRKY transcription factor 57	100/95.60
WRK51/F1 WRK51/R1	AGTTGAGCGAGTTGGGTCTG TGGAGCTGCCATAACCGATG	145	Putative WRKY	Elaeis guineensis putative WRKY transcription factor 51	95/97.71
WRK51/F2 WRK51/R2	TACTTCCGCCACTTGAACCC TCCAGTGAAGACAGCACGAC	134	factor 51	Elaeis guineensis putative WRKY transcription factor 51	100/90.21
TRXM/F1 TRXM/R1	CTCCCTCTCCTCATCACCGA TGTTGTCCCAGTTCGCATCA	131	Thioredoxin M-	No significant similarity f	ound
TRXM/F2 TRXM/R2	CAGACAAGTGGGGATGGCTT TGCTTGCTGGCCAAATATGC	140	type	Elaeis guineensis thioredoxin M- type,	100/94.29

Table S4.2 Primers designed for real-time PCR validation of the Cocos nucifera L. transciptome

F: Forward primer; R: Reverse primer



Fig. S4.1 Multidimensional Scaling Plot of Distances



Fig. S4.2 Venn diagram of DEUs that are up-regulated and down-regulated in both tissues evaluated.

Table S4.3 Some Up and Down regulated unigenes in response to SA of coconut palm

¹ Up-regulated							¹ Down-regulated					
	Leaf Root			Leaf				Root				
² ID	² Description	4GO	ID	Description	GO	ID	Description	GO	ID	Description	GO	
c57117	Sucrose synthase 3	Sucrose metabolic process	c54905	Ethylene responsive transcription factor ERF5	Response to ethylene	c51119	Glutaredoxin-C1	Cell redox homeostasis	c42180	Cytochrome P450 89A2	Oxidoreductase- monooxygenase	
c41851	Extracellular ribonuclease LE	Stress response- endoribonuclease activity	c50347	Transcription factor bHLH36	DNA-binding transcription factor activity	c31008	SPX domain- containing protein 1	Response to phosphate starvation	c52382	Putative thiol methyltransferase 2	Methyltransferase	
c52656	Fasciclin-like arabinogalactan Protein 2	Response to salt stress	c53749	Putative disease resistance protein RGA3	Defense response	c55616	Putative WRKY71	DNA-binding transcription factor activity	c56980	Short-chain dehydrogenase TIC 32	Oxidoreductase- protein transport	
c51789	Thaumatin-like protein 1	Defense response to bacterium	c50901	S- Adenosylmethionine synthase	ethylene biosynthetic process	c57596	Suppressor of NPR1-1	SAR-defense response to auxin	c32042	Pathogenesis- related protein STH-2	Abscisic acid binding	
c56360	Indole-2 monooxygenase	Carbohydrate metabolic process	c48069	Autophagy-related protein 18g	Autophagy-Protein transport	c52248	Putative WRKY3	DNA-binding transcription factor	c49094	Auxin-induced protein AUX28	Repressor-Auxin response	
c72402	Endoglucanase 6	Cell wall biogenesis/degradation	c48109	Isoflavone reductase-protein	Oxidoreductase-stress response	c47264	Zinc finger protein STOP1 homolog	Regulation of transcription	c50459	F-box protein PP2- B10	Protein ubiquitination	
c57337	β-glucosidase 10	Carbohydrate metabolic process	c47184	RING-H2 finger protein ATL2	Defense response- response to chitin	c33855	Cinnamoyl-CoA reductase 1	Lignin biosynthesis- response to cold	c45973	Homeobox-leucine zipper protein HOX19	Transcription regulation	
c57193	Heat shock 70 kDa protein	Stress response- Response to heat	c54799	Phosphoinositide phosphatase SAC4	Phosphoric ester hydrolase activity	c56854	Inorganic pyrophosphatase 1	Response to phosphate starvation	c57468	Beta-glucosidase 22	Carbohydrate metabolic process	
c27944	Transcription factor FAMA	Transcription regulation- stomatal complex development	c54456	Thioredoxin F-type	Cell redox homeostasis	c47792	E3 ubiquitin-protein ligase RING1-like	Protein ubiquitination	c42221	Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase	Flavonoid biosynthesis	
c57072	Cellulose synthase-like protein E6	Cell wall biogenesis/degradation	c54257	CBL-interacting serine/threonine- protein kinase (CIPK)	Signal transduction- response to oxidative stress	c51769	Glycerophosphodiester phosphodiesterase GDPD1	Cellular response to ion homeostasis	c49094	Auxin-responsive protein IAA11	Repressor-Auxin response	
		Up-regulate	ed in both tis	isues		Down-regulated in both tissues						
ID Description			GO	ID	Description				GO			
c45078	c45078 ABC transporter I family member 6			transport	c42972	Clustered mitochondria protein			Mitochondria distribution			
c55148	Е	thylene-responsive transcrip	tion factor E	RF023	Ethylene-activated signaling pathway	c39054	Ketol-acid reductoisomerase			Oxidoreductase		
c61685	c61685 Mannose/glucose-specific lectin				Glucose/mannose binding	c50459	F-box protein SKIP3			Protein ubiquitination		
c31347	c31347 Peroxidase 4			Response to oxidative stress	c56176	Dynamin-related protein 3			Peroxisome organization			
c49445	c49445 Receptor-like protein kinase HSL1			Serine/threonine- protein kinase	c45995	Proteasome subunit beta type-1			Endopeptidase- defense response to fungus			
c52705	.52705 L-arabinokinase			Transferase-kinase	c52262	Serine/arginine-rich splicing factor RS31			mRNA binding- splicing			
c55028	c55028 BES1/BZR1 homolog protein 1				Response to brassinosteroid	c55298	Endoglucanase 12				Cell wall biogenesis/degradation	
c54784	c54784 Apocytochrome f				Electron transfer activity- Photosynthesis	c45973	Homeobox-leucine zipper protein HOX27			Transcription regulation		
c56400	c56400 Putative galacturonosyltransferase 14				Cell wall biogenesis/degradation	c5825	Putative nucleoredoxin 3			Cell redox homeostasis		
c50768	0768 Expansin-A2				Cell wall biogenesis/degradation	c56877	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA			Helicase-mRNA splicing		

¹Up regulated: Log2FC > +2 and Down-regulated Log2FC < -2. P < 0.05

²Transcript ID

³Description annotation of transcript

⁴Gene Ontology Classification

Validation of RNA-Seq analysis using qRT-PCR of different genes evaluated										
Tissue	Unigene ID	Predicted Function	Gene	Organism	Blast score	^a Log2FC	^b Log2RQ			
					%	(RNA-Seq)	(qRT-PCR)			
	c51789_g2_i1	Thaumatin-like protein 1	TLP1	Prunus persica	55.6	4.20	3.33			
	c72402_g1_i1	Endo-1, 4-beta glucanase 6	GUN6	Arabidopsis thaliana	70.4	4.10	3.42			
Loof	c44206_g1_i2	Thioredoxin M-type	TRXM	Triticum aestivum	81.6	0.61*	1.85			
Lear	c51959_g3_i1	WRKY transcription factor 51	WRK51	Arabidopsis thaliana	52.3	- 3.75	-5.74			
	C52609_g1_i3	WRKY transcription factor 57	WRK57	Arabidopsis thaliana	56.4	- 4.48	-1.84			
	c56234_g4_i1	Regulatory protein NPR1	NPR1	Arabidopsis thaliana	51.1	1.83*	0.84			
Root	c51789_g2_i1	Thaumatin-like protein 1	TLP1	Prunus persica	55.6	0.27*	1.26			
	c72402_g1_i1	Endo-1, 4-beta glucanase 6	GUN6	Arabidopsis thaliana	70.4	-0.12*	1.21			
	c44206_g1_i2	Thioredoxin M-type	TRXM	Triticum aestivum	81.6	4.42	5.59			
	c51959_g3_i1	WRKY transcription factor 51	WRK51	Arabidopsis thaliana	52.3	6.83	1.28			
	c52609_g1_i3	WRKY transcription factor 57	WRK57	Arabidopsis thaliana	56.4	0.51*	0.95			
	c56234_g4_i1	Regulatory protein NPR1	NPR1	Arabidopsis thaliana	51.1	0.63*	2.98			

Table S4 Analysis of gene expression and validation by qRT-PCR of unigenes selected to coconut transcriptome

а

^aLog2FC. ^bLog2RQ. ^cUp regulated: Log2FC > +2 and down-regulated Log2FC < - 2. *Basal expression level: -2 < Log2FC < +2. P < 0.05

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

1. Se logró la identificación y caracterización molecular de genes homólogos a genes clave que participan en la posible activación de respuestas tipo-SAR y tipo-ISR en plántulas *in vitro* de cocotero expuestas a SA.

2. Se logró caracterizar los niveles de expresión en PCR tiempo real, mediante el diseño de sondas TaqMan y cebadores específicos, de los genes homólogos a genes clave que participan en la posible activación de una respuesta tipo SAR e ISR en plántulas *in vitro* de cocotero expuestas a 2.5 mM de SA.

3. Se logró evidenciar que la inoculación de plántulas *in vitro* de cocotero con *Phytophthora capsici* y *Phytophthora palmivora* causa síntomas de una enfermedad tipo "pudrición de cogollo" después de las dos semanas de haber sido inoculado y eventualmente causar la muerte después de 40 días.

4. Se logró establecer una concentración adecuada de MeJA (200 μM), la cual posiblemente ayude a disminuir el porcentaje de daño causado por *Phytophthora capsici*.

5. Se logró determinar el perfil transcriptómico de plántulas *in vitro* de cocotero tratadas con SA (2.5 mM) a las 48 horas, con un total de 4,615 genes expresados diferencialmente en hoja y 3,940 genes expresados diferencialmente en raíz.

6. Se determinó que el SA es capaz inducir la expresión diferencial de genes relacionados con una posible respuesta inmune innata de plántulas *in vitro* de cocotero. Corroborando esto, por medio de la validación por PCR en tiempo real de los resultados *in silico*, de genes que participan activamente en el mecanismo de defensa SAR.

5.2 PERSPECTIVAS

Este trabajo representa el primer estudio de análisis de datos masivos realizado en plántulas in vitro de cocotero in vitro expuestas a SA, y genera información valiosa para la búsqueda de genes de resistencia, que podrían ofrecer nuevas oportunidades para la mejora genética de este cultivo, por lo que se requiere una investigación detallada sobre la función particular de algunos genes clave encontrados en nuestro estudio, con la finalidad de conocer su participación directa en las respuestas de defensa contra patógenos. Además, este estudio proporciona información valiosa que podría permitir nuevas líneas de investigación, tales como: a) búsqueda de genes análogos a genes de resistencia, b) la intercomunicación entre las vías de señalización hormonal y c) las interacciones planta-patógeno.

5.3 **BIBLIOGRAFIA**

- Suraby EJ, Prasath D, Babu KN, Anandaraj M (2020) Identification of resistance gene analogs involved in Phytophthora capsici recognition in black pepper (Piper nigrum L.). J Plant Pathol. https://doi.org/10.1007/s42161-020-00586-3
- Singh G, Puri R (2020) Economically important plants of tropical areas. 36:6-9
- Rajeswari E, Sivakumar V, Praneetha S, Maheswarappa HP (2020) Diagnostic Symptoms and Management of Bud Rot Disease in Coconut. www.bioticainternational.com 924– 926
- Oropeza-Salín C, Sáenz L, Narvaez M, et al (2020) Dealing with Lethal Yellowing and Related Diseases in Coconut. In: Coconut Biotechnology: Towards the Sustainability of the 'Tree of Life.' Springer, pp 169–197
- Vargas J (2019) Pudrición del cogollo. 1er ExpoCongreso Int palma aceitera 2019 aceitera 2019 1–46
- Lantican D V., Strickler SR, Canama AO, et al (2019) De novo genome sequence assembly of dwarf coconut (Cocos nucifera L. 'Catigan Green Dwarf') provides insights into genomic variation between coconut types and related palm species. G3 Genes, Genomes, Genet 9:2377–2393. https://doi.org/10.1534/g3.119.400215
- Belgacem I, Pangallo S, Abdelfattah A, et al (2019) Transcriptomic analysis of orange fruit treated with pomegranate peel extract (PGE). Plants 8:2–11. https://doi.org/10.3390/plants8040101
- Barre A, Bourne Y, Van Damme EJM, Rougé P (2019) Overview of the structure–Function relationships of mannose-specific lectins from plants, Algae and Fungi. Int J Mol Sci 20:. https://doi.org/10.3390/ijms20020254
- Astudillo M, Solis J, Silva M, Maldonado R (2019) Cadenas agroalimentarias e innovación social: Perspectivas entre la competitividad y la sostenibilidad
- Xu Y, Zheng X, Song Y, et al (2018) NtLTP4, a lipid transfer protein that enhances salt and drought stresses tolerance in Nicotiana tabacum. Sci Rep 8:1–14

- Sáenz L, Chan JL, Narvaez M, Oropeza C (2018) Protocol for the Micropropagation of Coconut from Plumule Explants. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N (eds) Plant Cell Culture Protocols. Springer New York, New York, NY, pp 161–170
- Rivera-Solís G, Sáenz-Carbonell L, Narváez M, et al (2018) Addition of ionophore A23187 increases the efficiency of Cocos nucifera somatic embryogenesis. 3 Biotech 8:1–10. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1392-y
- FAO (2018) Food and Agriculture Organisation of the United Nation
- Ding Y, Sun T, Ao K, et al (2018) Opposite Roles of Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Transcriptional Regulation of Plant Immunity. Cell 173:1454-1467.e10. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.044
- del Prado-Vera IC, Franco-Navarro F, Godinez-Vidal D (2018) Plant Parasitic Nematodes and Management Strategies of Major Crops in Mexico. In: Subbotin SA, Chitambar JJ (eds) Plant Parasitic Nematodes in Sustainable Agriculture of North America: Vol.1 -Canada, Mexico and Western USA. Springer International Publishing, Cham, pp 31– 68
- Cui H, Qiu J, Zhou Y, et al (2018) Antagonism of Transcription Factor MYC2 by EDS1/PAD4 Complexes Bolsters Salicylic Acid Defense in Arabidopsis Effector-Triggered Immunity. Mol Plant 11:1053–1066. https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.05.007
- Zehra A, Meena M, Dubey MK, et al (2017) Activation of defense response in tomato against Fusarium wilt disease triggered by Trichoderma harzianum supplemented with exogenous chemical inducers (SA and MeJA). Rev Bras Bot 40:651–664. https://doi.org/10.1007/s40415-017-0382-3
- Xoca-Orozco LÁ, Cuellar-Torres EA, González-Morales S, et al (2017) Transcriptomic analysis of avocado hass (Persea americana Mill) in the interaction system Fruit-Chitosan-Colletotrichum. Front Plant Sci 8:1–13. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00956
- Wang J, Tao F, Tian W, et al (2017) The wheat WRKY transcription factors TaWRKY49 and TaWRKY62 confer differential high-temperature seedling-plant resistance to Puccinia striiformis f. sp. tritici. PLoS One 12:1–23. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181963
- Sood A, Chauhan RS (2017) Comparative NGS Transcriptomics Unravels Molecular Components Associated with Mosaic Virus Infection in a Bioenergy Plant Species, Jatropha curcas L. Bioenergy Res 10:129–145. https://doi.org/10.1007/s12155-016-9783-6
- Nic-Matos G, Narváez M, Peraza-Echeverría S, et al (2017) Molecular cloning of two novel NPR1 homologue genes in coconut palm and analysis of their expression in response to the plant defense hormone salicylic acid. Genes and Genomics 39:1007–1019. https://doi.org/10.1007/s13258-017-0566-z
- Du M, Zhao J, Tzeng DTW, et al (2017) MYC2 orchestrates a hierarchical transcriptional cascade that regulates jasmonate-mediated plant immunity in tomato. Plant Cell 29:1883–1906. https://doi.org/10.1105/tpc.16.00953
- Carvalhais LC, Schenk PM, Dennis PG (2017) Jasmonic acid signalling and the plant holobiont. Curr Opin Microbiol 37:42–47. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.009
- Zhang X, Dong J, Liu H, et al (2016) Transcriptome sequencing in response to salicylic acid in salvia miltiorrhiza. PLoS One 11:1–27. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147849
- Rajesh MK, Fayas TP, Naganeeswaran S, et al (2016) De novo assembly and characterization of global transcriptome of coconut palm (Cocos nucifera L.)

embryogenic calli using Illumina paired-end sequencing. Protoplasma 253:913–928. https://doi.org/10.1007/s00709-015-0856-8

- Puch-Hau C, Oropeza C, Góngora-Paredes M, et al (2016) New insights into the evolutionary history of resistance gene candidates in coconut palms and their expression profiles in palms affected by lethal yellowing disease. Genes and Genomics 38:793–807. https://doi.org/10.1007/s13258-016-0422-6
- Prades A, Salum UN, Pioch D (2016) New era for the coconut sector. What prospects for research? OCL 23:D607
- Jiang Y, Yu D (2016) The WRKY57 transcription factor affects the expression of jasmonate ZIM-domain genes transcriptionally to compromise Botrytis cinerea resistance. Plant Physiol 171:2771–2782
- Jiang CH, Huang ZY, Xie P, et al (2016) Transcription factors WRKY70 and WRKY11 served as regulators in rhizobacterium Bacillus cereus AR156-induced systemic resistance to Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 in Arabidopsis. J Exp Bot 67:157–174. https://doi.org/10.1093/jxb/erv445
- Gurr GM, Johnson AC, Ash GJ, et al (2016) Coconut Lethal Yellowing Diseases: A Phytoplasma Threat to Palms of Global Economic and Social Significance. Front Plant Sci 7:1–21. https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01521
- Damaris RN, Li M, Liu Y, et al (2016) A proteomic analysis of salt stress response in seedlings of two African rice cultivars. Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics 1864:1570–1578. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.08.011
- Zhang YT, Zhang YL, Chen SX, et al (2015) Proteomics of methyl jasmonate induced defense response in maize leaves against Asian corn borer. BMC Genomics 16:224. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1363-1
- Rahman MZ, Uematsu S, Suga H, Kageyama K (2015) Diversity of Phytophthora species newly reported from Japanese horticultural production. Mycoscience 56:443–459. https://doi.org/10.1016/j.myc.2015.01.002
- Puch-Hau C, Oropeza-Salín C, Peraza-Echeverría S, et al (2015) Molecular cloning and characterization of disease-resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from Cocos nucifera L. Physiol Mol Plant Pathol 89:87–96. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.01.002
- Oliveira MB, Junior ML, Grossi-de-Sá MF, Petrofeza S (2015) Exogenous application of methyl jasmonate induces a defense response and resistance against Sclerotinia sclerotiorum in dry bean plants. J Plant Physiol 182:13–22. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.04.006
- Nejat N, Cahill DM, Vadamalai G, et al (2015) Transcriptomics-based analysis using RNA-Seq of the coconut (Cocos nucifera) leaf in response to yellow decline phytoplasma infection. Mol Genet Genomics 290:1899–1910. https://doi.org/10.1007/s00438-015-1046-2
- Jendoubi W, Harbaoui K, Hamada W (2015) Salicylic acid-induced resistance against Fusarium oxysporumf. s. pradicis lycopercisi in hydroponic grown tomato plants. J New Sci 21:
- Fawke S, Doumane M, Schornack S (2015) Oomycete Interactions with Plants: Infection Strategies and Resistance Principles. Microbiol Mol Biol Rev 79:263–280. https://doi.org/10.1128/mmbr.00010-15
- Fan W, Lou HQ, Gong YL, et al (2015) Characterization of an inducible C2H2-type zinc finger transcription factor VuSTOP1 in rice bean (Vigna umbellata) reveals differential regulation between low pH and aluminum tolerance mechanisms. New Phytol 208:456–468. https://doi.org/10.1111/nph.13456

- Dong Z, Liu P, Li B, et al (2015) Loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of Phytophthora capsici. Can J Plant Pathol 37:485–494. https://doi.org/10.1080/07060661.2015.1119733
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, et al (2014) Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. Annu Rev Phytopathol 52:347–375. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340
- Molinari S, Fanelli E, Leonetti P (2014) Expression of tomato salicylic acid (SA)-responsive pathogenesis-related genes in Mi-1-mediated and SA-induced resistance to root-knot nematodes. Mol Plant Pathol 15:255–264
- Huang Y-Y, Lee C-P, Fu JL, et al (2014) De novo transcriptome sequence assembly from coconut leaves and seeds with a focus on factors involved in RNA-directed DNA methylation. G3 (Bethesda) 4:2147–57. https://doi.org/10.1534/g3.114.013409
- Guo L, Han L, Yang L, et al (2014) Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen Fusarium oxysporum f. sp. cubense causing banana vascular wilt disease. PLoS One 9:
- Fundora DG-P, Menéndez DC, Rodríguez ABF- (2014) Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de Phytophthora nicotianae Breda de Haan. Rev Protección Veg 29:33–41
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30:2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170
- Team RC (2013) R: A language and environment for statistical computing
- Kazan K, Manners JM (2013) MYC2: The master in action. Mol Plant 6:686–703. https://doi.org/10.1093/mp/sss128
- Hamid R, Khan MA, Ahmad M, et al (2013) Chitinases: An update. J Pharm Bioallied Sci 5:21–29. https://doi.org/10.4103/0975-7406.106559
- Fu ZQ, Dong X (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. Annu Rev Plant Biol 64:839–863
- Finiti I, Leyva MO, López-Cruz J, et al (2013) Functional analysis of endo-1,4-βglucanases in response to Botrytis cinerea and Pseudomonas syringae reveals their involvement in plant-pathogen interactions. Plant Biol 15:819–831. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00701.x
- Fan H, Xiao Y, Yang Y, et al (2013) RNA-Seq Analysis of Cocos nucifera: Transcriptome Sequencing and De Novo Assembly for Subsequent Functional Genomics Approaches. PLoS One 8:1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059997
- Soto Sedano JC, López Carrascal CE (2012) RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. Fitosanidad 16:101–113
- Santiago-Sotelo P, Ramirez-Prado JH (2012) prfectBLAST: a platform-independent portable front end for the command terminal BLAST+ stand-alone suite. Biotechniques 53:299–300
- Michel D, Franqueville H De, Ducamp M (2012) Bud rot and other major diseases of coconut , a potential threat to oil palm. Exist Emerg Pests Dis Oil Palm Adv Res Manag 13–14
- Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods 9:357
- Kearse M, Moir R, Wilson A, et al (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28:1647–1649
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, et al (2012) KEGG for integration and interpretation of large-

scale molecular data sets. Nucleic Acids Res 40:D109–D114

- Gómez MR, Rodríguez A (2012) Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica: una revisión. Rev Colomb Biotecnol 14:271–284
- Dollet M, De Franqueville H, Ducamp M (2012) Bud rot and other major diseases of coconut, a potential threat to oil palm
- Balconi C, Stevanato P, Motto M, Biancardi E (2012) Breeding for Biotic Stress Resistance/Tolerance in Plants. In: Ashraf M, Öztürk M, Ahmad MSA, Aksoy A (eds) Crop Production for Agricultural Improvement. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 57–114
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat Biotechnol 29:644
- Gómez DE, Reis EM (2011) Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. Química viva 10:6–17
- Doornbos RF, Geraats BPJ, Kuramae EE, et al (2011) Effects of jasmonic acid, ethylene, and salicylic acid signaling on the rhizosphere bacterial community of Arabidopsis thaliana. Mol Plant Microbe Interact 24:395–407. https://doi.org/10.1094/MPMI-05-10-0115
- Xie YR, Chen ZY, Brown RL, Bhatnagar D (2010) Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from Zea mays. J Plant Physiol 167:121–130. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.07.004
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, et al (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nat Biotechnol 28:511
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139–140
- Narváez Cab M del S (2010) Inducción de SAR en plantas de cocotero infectadas con Phytophthora capcisi. Instituto Tecnológico de Mérida
- D'Amelio R, Marzachì C, Bosco D (2010) Activity of benzothiadiazole on chrysanthemum yellows phytoplasma ('Candidatus Phytoplasma asteris') infection in daisy plants. Crop Prot 29:1094–1099
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF (2009) Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. Annu Rev Phytopathol 47:177–206. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202
- Santos MO, Aragão FJL (2009) Role of SERK genes in plant environmental response. Plant Signal Behav 4:10–13. https://doi.org/10.4161/psb.4.12.9900
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van Der Ent S, Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. Nat Chem Biol 5:308–316. https://doi.org/10.1038/nchembio.164
- Pérez-Núñez MT, Souza R, Sáenz L, et al (2009) Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. Plant Cell Rep 28:11–19. https://doi.org/10.1007/s00299-008-0616-8
- Chini A, Boter M, Solano R (2009) Plant oxylipins: COI1/JAZs/MYC2 as the core jasmonic acid-signalling module. FEBS J 276:4682–4692. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07194.x
- Blanco F, Salinas P, Cecchini NM, et al (2009) Early genomic responses to salicylic acid in Arabidopsis. Plant Mol Biol 70:79–102. https://doi.org/10.1007/s11103-009-9458-1
- Albertazzi G, Milc J, Caffagni A, et al (2009) Gene expression in grapevine cultivars in

response to Bois Noir phytoplasma infection. Plant Sci 176:792–804. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.03.001

- Zizumbo-Villarreal D, Colunga-GarcíaMarín P, Fernández-Barrera M, et al (2008) Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. Plant Genet Resour Newsl 156:23–33
- Van Wees SC, Van der Ent S, Pieterse CM (2008) Plant immune responses triggered by beneficial microbes. Curr Opin Plant Biol 11:443–448. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.005
- Lao DA (2008) Coco-biodiesel more than a diesel replacement. In: Bioenergy Forum, Bangkok
- Harrison NA, Oropeza C (2008) Coconut lethal yellowing. Charact diagnosis Manag phytoplasmas 219–248
- Ángel J, Rámirez T (2008) Manual técnico del cultivo del cocotero (Cocos nucifera L.) en México. Cent Comun Agrícola la Fund Hondureña Investig Agrícola 1–39
- Lizama-Uc G, Estrada-Mota IA, Caamal-Chan MG, et al (2007) Chitosan activates a MAPkinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of Cocos nucifera L. Physiol Mol Plant Pathol 70:130–141. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.08.001
- Durrant WE, Wang S, Dong X (2007) Arabidopsis SNI1 and RAD51D regulate both gene transcription and DNA recombination during the defense response. Proc Natl Acad Sci U S A 104:4223–4227. https://doi.org/10.1073/pnas.0609357104
- Dombrecht B, Gang PX, Sprague SJ, et al (2007) MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. Plant Cell 19:2225–2245. https://doi.org/10.1105/tpc.106.048017
- Camarena-Gutiérrez G, Torre-Almaráz R de la (2007) Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. Rev Chapingo Ser ciencias For y del Ambient 13:157–162
- Hu H, Xiong L, Yang Y (2005) Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. Planta 222:107–117. https://doi.org/10.1007/s00425-005-1534-4
- He CY, Wolyn DJ (2005) Potential role for salicylic acid in induced resistance of asparagus roots to Fusarium oxysporum f. sp. asparagi. Plant Pathol 54:227–232
- Ezziyyani M, Requena M, Candela Castillo M (2005) Producción de proteínas-PR en la inducción de resistencia a Phytophthora capsici en plantas de pimiento. An Biol 143–154
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, et al (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics 21:3674–3676
- Howe GA (2004) Jasmonates as signals in the wound response. J Plant Growth Regul 23:223–237
- Durrant WE, Dong X (2004) Ystemic cquired esistance. 185–209. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421
- Desveaux D, Subramaniam R, Després C, et al (2004) A "Whirly" transcription factor is required for salicylic acid-dependent disease resistance in Arabidopsis. Dev Cell 6:229–240
- Boter M, Ruíz-Rivero O, Abdeen A, Prat S (2004) Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. Genes Dev 18:1577–1591. https://doi.org/10.1101/gad.297704
- Reiner A, Yekutieli D, Benjamini Y (2003) Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. Bioinformatics 19:368–375

- Maust BE, Espadas F, Talavera C, et al (2003) Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. Phytopathology 93:976–981. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.8.976
- Blanco-Labra A, Mancilla CA (2002) Proteínas involucradas en los mecanismos de defensa de plantas. Acta Univ 12:3–28
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method. methods 25:402–408
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol Electron 4:9
- Collinge DB, Borch J, Madriz-Ordeñana K, Newman M-A (2001) The responses of plants to pathogens. In: Molecular Analysis of Plant Adaptation To the Environment. Springer, pp 131–158
- Harrison N, Cordova I, Richardson P, Dibonito R (1999) Detection and diagnosis of lethal yellowing. In: Current advances in coconut biotechnology. Springer, pp 183–196
- Chan JL, Saénz L, Talavera C, et al (1998) Regeneration of coconut (Cocos nucifera L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Rep 17:515–521. https://doi.org/10.1007/s002990050434
- Cao H, Li X, Dong X (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by everexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 95:6531–6536. https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6531
- Rasband WS (1997) ImageJ
- Cao Hui, Bowling SA, Gordon AS, Dong Xinnian (1994) Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. Plant Cell 6:1583–1592. https://doi.org/10.1105/tpc.6.11.1583
- Wright HT, Sandrasegaram G, Wright CS (1991) Evolution of a family of Nacetylglucosamine binding proteins containing the disulfide-rich domain of wheat germ agglutinin. J Mol Evol 33:283–294. https://doi.org/10.1007/BF02100680
- Rohde W, Randles JW, Langridge P, Hanold D (1990) Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. Virology 176:648–651. https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90038-S

Griffith R (1987) Red ring disease of coconut palm. Plant Dis 71:193–196

- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull
- Pinto da Silva P, Nogueira ML (1977) Phytophthora Palmivora. J Cell Biol 73:161–181
- Joseph T, Radha K (1975) Role of Phytophthora palmivora in bud rot of coconut. Plant Dis Report 59:1014–1017
- Van Loon LC, Van Kammen A (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from Nicotiana tabacum var. 'Samsun'and 'Samsun NN': II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. Virology 40:199–211