



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DEL cDNA DE GENES HOMÓLOGOS A LA FAMILIA
DE *NPR* EN LA PALMA DE COCOTERO (*Cocos
nucifera*)**

Tesis que presenta

JOSÉ GERMÁN NIC MATOS

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2017

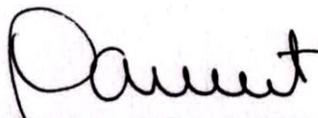
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de **José Germán Nic Matos**, titulado “ **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL cDNA DE GENES HOMÓLOGOS A LA FAMILIA DE NPR EN LA PALMA DE COCOTERO (*Cocos nucifera*)**”, fue realizado en los laboratorios de Cocotero de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de cocotero, 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.

Atentamente:



Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 12 de Junio de 2017

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma:  _____

Nombre: José Germán Nic Matos

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “ESTUDIOS SOBRE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DE COCOTERO A FITOPLASMAS DEL AMARILLAMIETO LETAL (Clave 0129717)” bajo la dirección del Dr. Carlos Oropeza Salín

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado especialmente a mi **FAMILIA**, en especial a **Gaby**, por su cariño y apoyo incondicional durante este importante proceso de mi vida profesional. Se la dedico a mis eternos compañeros (hijos) Julián y Héctor, quienes con su cariño y alegría, han sabido ser una fuente importante de motivación para finalizar con éxito esta etapa de mi vida profesional. ¡Gracias!

A mis **padres**, porque gracias a su apoyo y a sus consejos brindados durante esta etapa de mi vida, he logrado finalizar con una meta más. ¡Gracias Papá y Mamá!

A **Dios**, por brindarme vida y salud para alcanzar cada una de mis metas. Te agradezco por la sabiduría adquirida durante mi formación académica y profesional. ¡Gracias!

No hay secretos para el éxito.

Es el resultado de la preparación, el trabajo duro y el aprendizaje del fracaso.

Colin Powell

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesor, el **Dr. Carlos Oropeza Salín**, un especial agradecimiento por brindarme la oportunidad y la confianza de trabajar en sus proyectos de investigación. Por su asesoría en el diseño del trabajo de investigación y por darme la oportunidad de conocer gente maravillosa en el laboratorio de cocotero. ¡Gracias Doctor!
- Al proyecto **Common Found for Commodities (CFC)** y al CONACyT 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 Dr. Ciencias.
- Al **CONACyT**, por la beca otorgada No. 350913 para la realización de los estudios de doctorado.
- Al **comité tutorial**, conformado por: **Dr. Carlos Oropeza, Dr. Luis Sáenz, Dr. Gabriel Lizama, Dra. Elizabeth Ortiz**, por sus observaciones, comentarios y sugerencias para la exitosa conclusión de este trabajo de investigación.
- Al **comité revisor**, conformado por: **Dr. Carlos Oropeza Salín, Dr. Santy Peraza Echeverría, Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dr. Gabriel Lizama Uc, Dra. Elizabeth Ortiz, Dra. Daisy Pérez Brito y Dr. Antonio Andrade Torres**, gracias por sus observaciones y sugerencias para la conclusión de este documento.
- Al **Dr. Santy Peraza Echeverría**, por su valiosa aportación en la publicación del artículo científico y por sus valiosos consejos brindados durante la etapa de mi formación académica ¡Gracias Santy!

- Al **Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell**, por su apoyo en el diseño de las sondas para el estudio de expresión y por sus aportaciones en la redacción del artículo científico. Al igual, un sincero agradecimiento por brindarme su amistad y su confianza lo cual ha hecho agradable mi estancia en el laboratorio de cocotero ¡Gracias Doc!
- A la **M.C. María Narváez Cab**, por su apoyo técnico brindado tanto al inicio como al final del doctorado. Agradezco en gran manera la confianza y los consejos brindados durante mi estancia en el laboratorio de cocotero. Gracias por su verdadera amistad y su confianza ¡Gracias Merry!
- Al **M.C. Iván Córdova Lara**, por el apoyo técnico y conocimiento compartido durante la realización del estudio de expresión. En lo personal, agradezco tu sincera amistad y los consejos que sirvieron de gran motivación para concluir con éxito esta meta. ¡Thanks' my friend!
- Al ahora Dr. **Carlos Alberto Puch-Hau (Cash)**, por los conocimientos compartidos durante la maestría y doctorado ¡Gracias Carnal!
- Al **Dr. Luis Lara-Pérez**, por su apoyo en la parte estadística en el estudio de expresión en este trabajo y su conocimiento compartido al final del doctorado. ¡Gracias mi estimado!
- A todos los compañeros y ex-compañeros del laboratorio de cocotero ¡Gracias!

INDICE.....	i
LISTADO DE FIGURAS.....	vii
LISTADO DE CUADROS.....	xv
ABREVIATURAS.....	xix
RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
1.1 ANTECEDENTES.....	3
1.1.1 EL COCOTERO (<i>Cocos nucifera</i>).....	3
1.1.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.....	3
1.1.3 USOS Y APLICACIONES.....	5
1.1.4 IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	6
1.1.5 ENFERMEDADES QUE AFECTAN LA PALMA DE COCOTERO.....	7
1.2 AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO (ALC).....	7
1.2.1 PRESENCIA Y DISPERSIÓN DEL AL Y EN MÉXICO.....	8
1.2.2 SINTOMATOLOGÍA.....	8
1.2.3 AGENTE CAUSAL Y VECTOR.....	9
1.2.3.1 FITOPLASMAS.....	9
1.2.3.2 <i>Haplaxius crudus</i>	11
1.2.4 CONTROL DEL AMARILLAMIENTO LETAL (AL).....	12
1.2.5 ECOTIPOS DE COCOTERO RESISTENTES AL AL.....	12
1.3 RESPUESTAS DE DEFENSA EN PLANTAS.....	14
1.3.1 RECONOCIMIENTO DEL PATÓGENO.....	15
1.3.2 RESPUESTA HIPERSENSIBLE (HR).....	17
1.3.3 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (SAR).....	18
1.3.4 PROTEÍNAS RELACIONADAS A PATOGÉNESIS (PR).....	19
1.4 ÁCIDO SALICÍLICO (AS).....	20
1.4.1 METABOLISMO DEL ÁCIDO SALICÍLICO.....	21
1.4.2 MODO DE ACCIÓN DEL AS EN RESPUESTAS DE DEFENSA.....	22
1.4.3 ACTIVIDAD DEL AS Y SUS ANÁLOGOS CONTRA FITOPLASMAS.....	23
1.5 NPR1 (NO EXPRESOR DE GENES <i>PR1</i>).....	24

1.5.1 CARACTERIZACIÓN DE NPR1.....	25
1.5.2 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA NPR1.....	26
1.5.3 FAMILIA DE NPR EN <i>ARABIDOPSIS</i> Y OTRAS PLANTAS.....	27
1.5.4 EXPRESIÓN DE <i>NPR1</i> Y SUS HOMÓLOGOS EN RESPUESTA A AS Y ANÁLOGOS.....	30
1.5.5 ESTUDIOS BIOTECNOLÓGICOS DE NPR1 EN PLANTAS.....	31
1.6 ESTUDIOS SOBRE MECANISMOS DE DEFENSA EN LA PALMA DE COCOTERO.....	32
1.6.1 EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A DEFENSA EN CALLOS DE COCOTERO.....	32
1.6.2 INDUCCIÓN DE SAR EN PLANTAS DE COCOTERO.....	33
1.6.3 CARACTERIZACIÓN DEL CDNA DE UN HOMÓLOGO DE <i>NPR1</i> EN COCOTERO.....	35
1.6.4 BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS A GENES DE RESISTENCIA EN COCOTERO.....	37
1.7 JUSTIFICACIÓN.....	38
1.8 HIPÓTESIS.....	38
1.9 OBJETIVO GENERAL.....	38
1.9.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
1.10 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	40
CAPÍTULO II. CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL EXTREMO 5' TERMINAL DEL cDNA DE <i>CnNPR3</i> EN LA PALMA DE COCOTERO.....	41
2.1 INTRODUCCIÓN.....	41
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
2.2.1 DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 5' TERMINAL DEL cDNA de <i>CnNPR3</i>	44
2.2.2 EXTRACCIÓN DE RNA.....	44
2.2.3 SÍNTESIS DE cDNA PARA AMPLIFICAR EL EXTREMO 5' TERMINAL DE <i>CnNPR3</i>	45
2.2.4 AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 5' TERMINAL DE <i>CnNPR3</i> DE COCOTERO.....	45

2.2.5 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS	46
2.2.6 ANALISIS IN SILICO DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS.....	47
2.2.7 EMPALME DE LOS EXTREMOS 3' Y 5' TERMINALES DE <i>CNNPR3</i> DE COCOTERO.....	48
2.2.8 MATRIZ DE IDENTIDAD DE LA NUEVA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE COCOTERO.....	48
2.2.9 ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA CON PROTEÍNAS HOMÓLOGAS DE NPR1.....	48
2.2.10 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA NUEVA SECUENCIA DE COCOTERO.	49
2.3. RESULTADOS.....	50
2.3.1 CEBADORES DISEÑADOS.....	50
2.3.2 RNA EXTRAÍDO Y cDNA SINTETIZADO.....	50
2.3.3 PRODUCTOS AMPLIFICADOS DEL EXTREMO 5' TERMINAL DEL CDNA DE <i>CnNPR3</i>	51
2.3.4 SECUENCIA DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS DEL EXTREMO 5' TERMINAL.....	52
2.3.5 SECUENCIA TOTAL DEL CDNA DEL GEN <i>CnNPR3</i> DE COCOTERO.....	52
2.3.6 PORCENTAJE DE IDENTIDAD DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE <i>CnNPR3</i> DE COCOTERO.....	54
2.3.7 MATRIZ DE IDENTIDAD.....	55
2.3.8 ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE AMINOACIDOS DE <i>CnNPR3</i> CON SEUENCIAS HOMÓLOGAS DE NPR1.....	55
2.3.9 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	58
2.4 DISCUSIÓN.....	60
2.5 CONCLUSIONES.....	61
CAPÍTULO III. CLONACION Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL cDNA DE <i>CnNPR1</i> EN LA PALMA DE COCOTERO.....	63
3.1 INTRODUCCIÓN.....	63
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
3.2.1 DISEÑO DE CEBADORES.....	65
3.2.2 AMPLIFICACION PARCIAL DEL cDNA DE <i>CnNPR1</i> DE COCOTERO.....	65
3.2.3 ANÁLISIS IN SILICO DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS.....	68

3.3 RESULTADOS.....	69
3.3.1 CEBADORES DEGENERADOS Y ESPECÍFICOS.....	69
3.3.2 PRODUCTOS AMPLIFICADOS CON LOS CEBADORES DEGENERADOS.	69
3.3.3 PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE LOS EXTREMOS 5'-3' TERMINALES DEL cDNA DE CnNPR1.....	71
3.3.4 SECUENCIA PARCIAL DEL cDNA DE <i>CnNPR1</i>	72
3.3.5 SECUENCIA DE LOS EXTREMOS 5'-3' TERMINALES DE CnNPR1.....	73
3.3.6 ANALISIS IN SILICO DE CnNPR1.....	75
3.3.7 ÁRBOL FILOGENÉTICO.....	75
3.4 DISCUSIÓN.....	76
3.5 CONCLUSIONES.....	77
CAPÍTULO IV. CARACTERIZACION DE LA EXPRESIÓN DE CnNPR1 Y CnNPR3 EN PLÁNTULAS DE COCOTERO TRATADAS CON AS.....	79
4.1 INTRODUCCIÓN.....	79
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	81
4.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	81
4.2.2 TRATAMIENTO DE PLANTAS IN VITRO DE COCOTERO CON SA.....	81
4.2.3 EXTRACCION DE RNA.....	83
4.2.4 TRATAMIENTO DEL RNA DNASA I.....	83
4.2.5 SINTESIS DE cDNA.....	83
4.2.6 DISEÑO DE SONDAS TAQMAN PARA EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN.....	84
4.2.7 PRUEBAS DE AMPLIFICACIÓN DE SONDAS <i>CnNPR1</i> , <i>CnNPR3</i> y <i>18S</i>	85
4.2.8 CURVA ESTANDAR PARA LAS SONDAS <i>CnNPR1</i> , <i>CnNPR3</i> y <i>18S</i>	86
4.2.9 ESTUDIO DE EXPRESION DE <i>CnNPR1</i> Y <i>CnNPR3</i> EN LOS TEJIDOS DE COCOTERO.....	86
4.3 RESULTADOS.....	87
4.3.1 RNA EXTRAÍDO Y TRATADO CON DNasa I.....	87
4.3.2 cDNA SINTETIZADO.....	88
4.3.3 UBICACIÓN DE LAS SONDAS TAQMAN <i>CnNPR1</i> y <i>CnNPR3</i>	88
4.3.4 CURVA ESTANDAR DE LAS SONDAS <i>CnNPR1</i> , <i>CnNPR3</i> Y <i>18S</i>	89
4.3.5 ESTUDIO DE EXPRESION DE <i>CnNPR1</i> Y <i>CnNPR3</i>	90
4.4 DISCUSIÓN.....	93

4.5 CONCLUSIONES.....	94
CAPÍTULO V. MOLECULAR CLONING OF TWO NOVEL <i>NPR1</i> HOMOLOGUE GENES IN COCONUT PALM AND ANALYSIS OF THEIR EXPRESSION IN RESPONSE TO THE PLANT DEFENSE HORMONE SALICYLIC ACID.....	95
5.1 ABSTRACT.....	95
5.2 INTRODUCTION.....	96
5.3 MATERIALS AND METHODS.....	99
5.3.1 PLANT MATERIAL AND SALICYLIC ACID TREATMENT.....	99
5.3.2 PCR AMPLIFICATION OF A GENOMIC DNA FRAGMENT OF <i>CnNPR1</i> AND <i>CnNPR3</i>	99
5.3.3 MAPPING THE 3' AND 5' ENDS OF <i>CnNPR1</i> AND <i>CnNPR3</i> cDNA's BY RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS (RACE).....	100
5.3.4 CLONING OF THE COMPLETE cDNA's OF <i>CnNPR1</i> y <i>CnNPR3</i>	100
5.3.5 IN SILICO ANALISYS OF THE cDNA's OF <i>CnNPR1</i> AND <i>CnNPR3</i>	101
5.3.6 ANALYSIS OF <i>CnNPR1</i> AND <i>CnNPR3</i> EXPRESSION BY qRT-PCR IN DIFFERENT TISSUES OF COCONUT PALM PLANTLETS TREATED WITH SA...	102
5.4 RESULTS.....	103
5.4.1 ESTRUCTURAL ANALYSIS OF THE <i>CnNPR1</i> AND <i>CnNPR3</i> cDNA's AND THEIR DEDUCED PROTEINS.....	103
5.4.2 PHYLOGENETIC ANALYSIS OF <i>CnNPR1</i> Y <i>CnNPR3</i>	111
5.4 EXPRESSION PROFILES OF <i>CnNPR1</i> AND <i>CnNPR3</i> IN DIFFERENT TISSUES OF PLANT TREATED WITH SALICYLIC ACID (SA).....	113
5.5 DISCUSSION.....	115
5.6 APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA.....	119
CAPÍTULO VI. DISCUSION GENERAL.....	123
6.2 CONCLUSIONES GENERALES.....	126
6.3 PERSPECTIVAS.....	126
6.3 BIBLIOGRÁFÍA.....	129

LISTADO DE FIGURAS

CAPÍTULO I.....	3
Figura 1.1. Esquema representativo que muestra el aspecto general de una palma de cocotero (<i>Cocos nucifera</i> L.), junto con las distintas capas que conforman el fruto (mesocarpo y endocarpo).....	3
Figura 1.2. Imagen representativa de algunos de los usos y productos que pueden ser obtenidos de la palma de cocotero, en especial del fruto. a) Elaboración de casas; b) obtención de coco rallado; c) obtención de carbón activado; d) obtención de leche de coco; e) agua de cocotero procesada y f) fabricación de partes de automóvil.....	5
Figura 1.3. Esquemas representativos de la importancia del cocotero. a) Plantación de cocotero dedicada a la producción masiva de cocotero; b) Frutos de cocotero listos para la extracción de aceite virgen; c) Empleado que vive directamente del cultivo de cocotero.....	6
Figura 1.4. Imágenes representativas de plantaciones de cocotero que han sido devastadas por la enfermedad del amarillamiento letal.....	7
Figura 1.5. Imagen representativa del área de dispersión del AL en México, Centroamérica y en otros países del Caribe.....	8
Figura 1.6. Imagen que muestra los diferentes estadíos durante el desarrollo de la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero.....	9
Figura 1.7. Imágen representativa del agente causal. a) Las flechas señalan los fitoplasmas contenidos en una célula del floema de coco, estos fitoplasmas, son poseen un diametro aproximado de 142-295 nm y 1-16 µm de longitud.....	10
Figura 1.8. Imágen representativa del insecto vector. <i>Haplaxius crudus</i> , posee una longitud de 4-5 mm y tiene la cabeza y el torax color pajizo.....	11

Figura 1.9. Grafica de mortalidad, en la cual se puede observar el grado de mortalidad de las diferentes variedades probadas. Se observa que la variedad MYD (enano malayo amarillo), MXPT1 y MXPT2, presentaron menor mortalidad ante la enfermedad del AL.....	13
Figura 1.10. Esquema representativo de los diferentes sistemas inmunes innatos de las plantas. a. Primera respuesta inmune denominada PTI. b. Estado de susceptibilidad activada por efectores (ETS). c. Segunda respuesta de inmunidad activada por efectores (ETI).....	16
Figura 1.11. Respuesta hipersensible. a. Proceso de reconocimiento y activación de HR. b. Lesiones necróticas formadas por la muerte celular programada (PCD).	17
Figura 1.12. El mecanismo de defensa SAR es determinado por una primera infección en la cual se observa mayor daño (a) y posteriormente en una segunda infección en la cual se observa un menor daño (b).....	18
Figura 1.13. Imagen esquematizada, de los procesos que ocurren durante la activación del mecanismo de defensa SAR.....	19
Figura 1.14. Biosíntesis y metabolismo del AS. Abreviaturas: FAL, fenilalanina amonio liasa; ICS, isocorismato sintasa; IPL, isocorismato piruvato liasa; AB2H, ácido benzoico 2-hidroxilasa; AS, ácido salicílico; ASGT, ácido salicílico glucosil transferasa; aa, amino ácidos; ASMT, AS metil tranferasa; P2UAS, proteína 2 unida a AS; MES, metil esterasa; SEG, saliciloil éster glucosa; ASG, AS O-β glucósido; SMe, salicilato de metilo; SMeG, salicilato de metilo O-β-glucosido. (Vlot <i>et al</i> , 2009).....	22
Figura 1.15. Análisis del perfil de expresión de genes <i>PR1</i> y <i>PR5</i> , considerados marcadores de SAR, en respuesta a tratamiento con SA o INA (Cao <i>et al.</i> , 1994)..	25
Figura 1.16. Mapeo genético utilizado durante la clonación del gen <i>NPR1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Cao <i>et al.</i> , 1997).....	26
Figura 1.17. Modelo estructural de la proteína NPR1. Se observa los residuos	

Cys 82 y Cys 216, junto con el dominio repetido de <i>ankirina</i> y el dominio BTB/POZ.....	27
Figura 1.18. Esquema representativo del árbol filogenético conformado por miembros homólogos de la familia NPR1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Liu <i>et al.</i> , 2005)	27
Figura. 1.19. Imagen representativa de los seis miembros de la familia de NPR de <i>A. thaliana</i> . NPR1-NPR4 poseen cuatro exones y NPR5 y NPR6, constan de dos exones. Los seis miembros poseen los dominios conservados BTB/POZ y el dominio repetido de <i>ankirina</i>	28
Figura 1.20. Imagen representativa que muestra la manera en que NPR3 y NPR4 interactúan con la hormona vegetal ácido salicílico y su función en la regulación de NPR1 (Fu <i>et al.</i> , 2012).....	29
Figura 1.21. Grafica que muestra los niveles de peróxido de hidrógeno. Se observa que el nivel de peróxido de hidrógeno, fue aumentando al momento de que los callos fueron tratados con quitosano (Lizama <i>et al.</i> , 2007).....	33
Figura 1.22. Se observa que a una concentración de 2.5 mM de AS la planta de coco sufrió menos daño después de ser inoculado con el Oomiceto patogénico <i>Phytophthora capsici</i> (Narváez, 2010. Tesis de Maestría).....	34
Figura 1.23. Alineación múltiple de la secuencia de la proteína de NPR1 de cocotero con otras especies (banano, soya y arroz) (Narváez, 2010. Tesis de Maestría).....	34
Figura 1.24. Imagen representativa que muestra el tamaño del fragmento aislado del gen tipo-CnNPR1 de cocotero, comparado con la proteína completa de NPR1. a). Muestra los dominios conservados de la proteína NPR1 completa. b). Muestra el fragmento aislado de la proteína homólogo de NPR1 de cocotero (Nic Matos, 2012. Tesis de Maestría).....	35
Figura 1.25. Árbol filogenético Neighbor-Joining, realizado con 35 secuencias homólogas de NPR1 de diferentes especies de plantas. Secuencias homólogas	36

de NPR1 de arroz, *Arabidopsis thaliana* papaya son señaladas en Cuadros azules, verdes y naranjas, respectivamente. También se observa el nombre de las especies y el número de accesión para las otras secuencias homólogas de NPR1. Se señala en letra negrita y en triangulo rojo la secuencia tipo NPR1 aislada de la palma de cocotero. El número en los clados indica el porcentaje obtenido del análisis con un Bootstrap de 1000 réplicas.....

Figura 1.26. Árbol filogenético en el cual se observan los clados en los que fueron agrupados las secuencias aisladas en ese trabajo (Puch-Hau, 2012. Tesis de Maestría)..... 37

Figura 1.27. Diagrama general de las actividades a realizar durante el trabajo de investigación..... 40

CAPÍTULO II..... 41

Figura 2.1. Imagen representativa que muestra los principales puntos de referencia del vector de clonación pGEM-T Easy..... 47

Figura 2.2. Esquema representativo de la posición de los cebadores empleados durante las reacciones de amplificación del extremo 5' terminal del gen *CnNPR3*.. 50

Figura 2.3. Imagen representativa de una muestra de RNA y cDNA fraccionado en un gel de agarosa 1%..... 51

Figura 2.4. Imagen representativa que muestra los diferentes productos amplificados con el cebador A, bajo las diferentes temperaturas de hibridación..... 51

Figura 2.5. Alineamiento de secuencias homólogas de NPR1 de especies de *Arabidopsis thaliana*, *Elaeis guineensis* y *Phoenix dactylifera*, junto con la secuencia nueva de cocotero, empleando el programa CLUSTALX. Los aminoácidos idénticos fueron sombreados en negro y las sustituciones conservadas en gris con el programa BOXSHADE. La secuencia de aminoácidos de CnNPR3 de cocotero, presentó los dominios conservados BTB/POZ y ANKIRINA (flechas negras). Se localizó un sitio de localización nuclear (NLS). 57

También se observaron múltiples residuos Cys requeridos para la oligomerización y transactivación de la proteína (asteriscos negros).....

Figura 2.6. Árbol filogenético Neighbor-Joining, realizado con 10 secuencias homólogas de NPR1 de 2 especies de plantas. Secuencias homólogas de NPR1 de *Arabidopsis thaliana*(Cuadros en negro) y *O. sativa* (círculos en negro) son señaladas respectivamente. La nueva secuencia de cocotero se agrupó en el clado II (triángulo en negro). El número en los clados indica el valor obtenido del análisis con un Bootstrap de 1000 réplicas..... 59

CAPÍTULO III..... 63

Figura 3.1. Se observan los productos amplificados usando el cebador A y el cebador B. **Carril 1.** Marcador 1kb; **Carril 2,3.** Producto amplificado con el cebador A. **Carril 4 y 5.** Productos amplificados con el cebador B..... 70

Figura 3.2. Gel de agarosa al 1%. Muestra únicamente los fragmentos obtenidos con el cebador B. **Carril 1.** Marcador de 1kb. **Carril 2 y 3.** Productos amplificados con el cebador B..... 70

Figura 3.3. Gel de agarosa al 1%. Muestra los fragmentos que fueron purificados, para la posterior clonación y secuenciación. **Carril 1.** Marcador de masas; **Carril 2,3.** Productos amplificados con el cebador A. **Carril 4, 5, 6.** Productos amplificados con el cebador B..... 71

Figura 3.4. Imagen que muestra los productos amplificados con los tres cebadores “sentido”. Los productos amplificados corresponden al extremo 3’ terminal del cDNA de *CnNPR1*. **1Kb.** Marcador. **Carril 1.** Fragmento amplificado con el cebador CnNPR1_F1. **Carril 2.** Fragmento amplificado con el cebador CnNPR1_F2. **Carril 3.** Fragmento amplificado con el cebador CnNPR1_F3..... 71

Figura 3.5. Imagen que muestra los productos amplificados con los tres cebadores “ansentido”. Los productos amplificados corresponden al extremo 5’ terminal del cDNA de *CnNPR1*. **Carril 1.** Marcador 1 Kb Plus. **Carril 2.** Fragmento amplificado con el cebador CnNPR1_R1. **Carril 3.** Fragmento amplificado con el 72

cebador CnNPR1_R2. Carril 4. Fragmento amplificado con el cebador CnNPR1_R3.....	
Figura 3.6. Árbol filogenético donde se puede apreciar las relaciones filogenéticas existentes entre las dos secuencias homólogas de NPR1 de <i>Cocos nucifera</i> (rombos rojos) y las secuencias de homólogo de NPR1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> (triángulos negros), <i>C. papaya</i> (triángulos blancos) y <i>O. sativa</i> (cuadrados negros).....	76
CAPÍTULO IV	79
Figura 4.1. Imagen representativa del aspecto de una de las palmas sometidas al tratamiento con ácido salicílico.....	81
Figura 4.2. Esquema representativo del proceso de tratamiento de las plantas con AS. A). Planta antes de ser sometida al tratamiento con AS; B). Frasco conteniendo medio líquido Y3 estéril con 2.5 mM de AS; C). Imagen representativa de una planta sometida al tratamiento con AS.....	82
Figura 4.3. Imagen esquematizada del proceso de cosecha de los tejidos de las plantas tratadas A). Aspecto presentado por las plantas antes de ser cosechados; B). Imagen representativa del proceso de cosecha de cada uno de los diferentes tejidos.....	83
Figura 4.4. Imagen representativa de un gel de agarosa 1% fraccionado y conteniendo RNA extraído de tejido de hoja de las muestras cosechas a las 24 horas.....	87
Figura 4.5. Imagen representativa de un gel de agarosa que muestra el RNA extraído de los tejidos de hoja cosechados a las 24 horas, después de ser sometidos a un tratamiento con la enzima DNasa I, para la eliminación del ADN genómico.....	87
Figura 4.6. Imagen representativa de los productos de cDNA amplificados con la sonda 18S, junto. A). cDNA de hoja; B) cDNA de tallo.....	88

Figura 4.7. Imagen representativa de la ubicación de la sonda. A). Esquema ilustrativo de las regiones conservadas donde se muestra la ubicación de la sonda CnNPR3. B) Muestra la ubicación de la sonda en la secuencia de nucleótidos de <i>CnNPR3</i> (en amarillo) y la posición de los cebadores sentido (en verde) y antisentido (en rojo). Se observa el tamaño del amplicón que es de 90 pb	89
Figura 4.8. Imagen de la gráfica de la curva estándar de ambas sondas. Se graficaron los valores de Ct obtenidos de la amplificación de las diluciones del CDNA blanco.....	90
Figura 4.9 Perfiles de expresión del <i>CnNPR1</i> y <i>CnNPR3</i> . La expresión génica fue determinado por qRT-PCR en diferentes tejidos de plántulas de cultivo <i>in vitro</i> tratadas y no tratadas con ácido salicílico en diferentes tiempos. <i>18S</i> se utilizó como gen de referencia.....	92
CAPÍTULO V	93
Figure 5.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of CnNPR1 (A) and CnNPR3 (B) of <i>Cocos nucifera</i> . Letters shaded in black indicate the BTB/POZ domains and those shaded in gray show the Ankyrin repeats. The NPR1-like domains are underlined. The asterisks represent the stop codons.....	105
Figure 5.2 Comparison of CnNPR1 and CnNPR3 with other members of the NPR1 family from different plant species. The amino acids shaded in black indicate identical amino acids; the similar amino acids were shaded in gray. The BTB/POZ domain and an Ankyrin repeat domain are indicated with arrows. Various cysteine residues were observed, marked with asterisks (★) which control the oligomerization state (Rochon et al. 2006). A nuclear localization site was found, which is necessary for the nuclear localization of the protein (NLS) (Kinkema et al. 2000). CnNPR1 (KU926707), CnNPR3 (KT456285), AtNPR1 (NM015103), AtNPR3 (NM123879), EgNPR1 (XP_010915286), EgNPR3 (XP_010942675), PdNPR1 (XP_008782513) and PdNPR3 (XP_008787319).....	109
Figure 5.3 Predicted tridimensional structure of the NPR1 proteins of <i>Arabidopsis</i>	110

thaliana and *C. nucifera*. The crystallographic data of the human BTB/POZ domain of speckle-type (PDB Acc. No. 3hqi) and the human ankyrin domain (PDB Acc. No. 1n11) were used as template.....

Figure 5.4 Phylogenetic analysis of NPR1 proteins and homologues of monocotyledonous and dicotyledonous plants. The phylogenetic tree was generated with the MEGA software version 6.06 using the method of Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987). The number on the nodes indicates the bootstrap percentage of 2000 replicates. The sequences of amino acids of NPR1 proteins and homologues employed for the construction of the tree are derived from the GenBank database under the following accession numbers: AtNPR1 (NP_176610), AtNPR2 (NP_194342), AtNPR3 (NP_199324), AtNPR4 (NP_193701), AtNPR5 (NP_181668) and AtNPR6 (NP_191272) of *A. thaliana*; CnNPR1 (KU926707) and CnNPR3 (KT456285) of *C. nucifera*; EgNPR1 (XP_010915286) and EgNPR3 (XP_010942675) of *E. guineensis*; PdNPR1 (XP_008782513) and PdNPR3 (XP_008806697) of *P. dactylifera*; OsNPR1 (ABE11614), OsNPR2 (ABE11615), OsNPR3 (ABE11618), OsNPR4 (ABE11620) and OsNPR5 (ABE11622) of *O. sativa*..... 112

Fig. 5.5 Expression profiles of CnNPR1 and *CnNPR3* in response to SA treatment. Gene expression was determined by qRT-PCR in different tissues from plantlets cultivated *in vitro* treated and not treated with salicylic acid in different times. *18S* was used as reference gene. Data represent the mean \pm standard deviation (SD) of three independent biological samples each by triplicate by treatment. Different letters are significantly different at the 0.05 level according to Tukey test..... 114

LISTADO DE CUADROS

CAPÍTULO I	3
Cuadro 1.1. Se describen las principales características taxonómicas del cocotero.....	4
Cuadro 1.2. Familia de proteínas PR, involucradas en respuestas de defensa.....	20
Cuadro 1.3. Estudios realizados en algunos cultivos que son afectados por fitoplasmas y que presentaron una respuesta de defensa ante la aplicación de SA y/o sus análogos.....	24
Cuadro 1.4. Familias de genes homólogos a <i>NPR1</i> caracterizados en otras especies de plantas.....	30
Cuadro 1.5. Estudios de expresión realizada a <i>NPR1</i> y sus homólogos en algunas especies de plantas.....	31
Cuadro 1.6. Especies de plantas donde se ha identificado la presencia de un homólogo de <i>NPR1</i> y se ha sobreexpresado para caracterizar su función en defensa ante diferentes tipos de patógenos.....	32
CAPÍTULO II	41
Cuadro 2.1. Volumen y concentración de los reactivos empleados para la mezcla de reacción de amplificación del extremo 5' terminal del homólogo de <i>NPR1</i> de cocotero.....	46
Cuadro 2.2. Condiciones de temperatura empleados para la amplificación del extremo 5' terminal de <i>CnNPR3</i> de cocotero. En sombra negra, las diferentes temperaturas de hibridación que fueron probadas.....	46
Cuadro 2.3. Características de los cebadores empleados para el aislamiento del extremo 5' terminal del gen <i>CnNPR3</i> de cocotero.....	50

Cuadro 2.4. Se observan, tanto la secuencia total de nucleótidos como la de aminoácidos del extremo 5' terminal aislado. En sombreado negro se observa la secuencia del cebador empleado para el aislamiento de este extremo.....	52
Cuadro 2.5. Secuencia total de nucleótidos del CDNA del gen <i>CnNPR3</i> de cocotero. La parte sombreada, representa el sitio de unión de los dos extremos clonados (cebadores sentido y antisentido). El sombreado verde, representa la posición donde inicia el marco de lectura abierto y el sombreado rojo el final.....	53
Cuadro 2.6. Secuencia total de aminoácidos del marco de lectura abierto presentado por <i>CnNPR3</i> de cocotero.....	54
Cuadro 2.7. Muestra el número de accesión, la especie, el valor de E, así como el porcentaje de identidad de la nueva proteína aislada de cocotero con otras proteínas homólogas de <i>NPR1</i>	54
Cuadro 2.8. Se observan los porcentajes de identidad comparativos, presentados por los miembros de las familias de <i>NPR1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>O. sativa</i> con la secuencia de <i>CnNPR3</i> de <i>C. nucifera</i> L.....	55
CAPÍTULO III	66
Cuadro 3.1. Se indican los volúmenes de los reactivos empleados en la preparación de la mezcla de reacción para las pruebas de amplificación con cada par de cebadores. F: sentido; R: antisentido.....	66
Cuadro 3.2. Temperaturas de hibridación probadas durante la amplificación del nuevo homólogo de <i>NPR1</i> de cocotero empleando los tres pares de cebadores degenerados.....	66
Cuadro 3.3. Volúmenes de la mezcla de reacción empleados para amplificación de los extremos terminales (5'-3') del cDNA de <i>CnNPR1</i>	67
Cuadro 3.4. Condiciones de temperatura de hibridación empleados durante la amplificación de ambos extremos terminales de <i>CnNPR1</i>	67

Cuadro 3.5. Se observan las secuencias de los cebadores degenerados empleados para el aislamiento del ortólogo de <i>NPR1</i> en cocotero.....	69
Cuadro 3.6. Secuencia del fragmento clonado con los cebadores degenerados. Posteriormente el marco de lectura presentado por esta secuencia.....	72
Cuadro 3.7. Secuencia de los extremos 5'-3' terminales del cDNA de CnNPR1, amplificados con los cebadores específicos (en rojo, secuencia de cebadores F1 y R1).....	73
Cuadro 3.8. Secuencia total del cDNA de CnNPR1 de cocotero. Sombreado donde se empalman los cebadores F1 y R1.....	74
Cuadro 3.9. Porcentaje de identidad presentada por CnNPR1 con secuencias homologas de NPR1 de otras especies.....	75
CAPÍTULO IV	79
Cuadro 4.1. Se observa el total de plantas sometidas al tratamiento con AS, así como el total de plantas control, también se muestran los tiempos empleados para la cosecha de los tejidos de hoja, tallo y raíz para el estudio de expresión del gen <i>CnNPR3</i> en la palma de cocotero.....	82
Cuadro 4.2. Se observan los volúmenes empleados por cada reacción de amplificación empleando la sonda 18S.....	84
Cuadro 4.3. Condiciones de amplificación empleadas para la amplificación con la sonda 18S, usado como control interno para el estudio de expresión.....	84
Cuadro 4.4. Volúmenes de los reactivos empleados para la mezcla de reacción durante la amplificación de ambas sondas (<i>CnNPR3</i> y 18S).....	85
Cuadro 4.5. Protocolo de temperaturas empleadas durante las pruebas de expresión. Se observan también el tiempo y el número de ciclos.....	85
CAPÍTULO V	95

Table 5.1 Identity percentage of amino acids among the homologues of the NPR family of <i>C. nucifera</i> , <i>E. guineensis</i> , <i>P. dactylifera</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>O. sativa</i> . The boxes in gray indicate the highest identity percentages observed among the NPR1 type sequences of coconut palm and the NPR1 type sequences of <i>A. thaliana</i> , already functionally characterized.....	106
---	-----

ABREVIATURAS

NPR1: No expresor de genes relacionados a patogénesis-1

NLS: Sitio de localización nuclear

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PCD: Muerte celular programada

HR: Respuesta hipersensible

ORF: Marco de lectura abierto

ALC: Amarillamiento Letal del cocotero

SAR: Resistencia Sistémica Adquirida

SA: ácido salicílico

ETI: Inmunidad activada por efectores

PTI: Inmunidad activada por PAMP's

cDNA: DNA complementario

RESUMEN

El Cocotero (*Cocos nucifera* L.), es una especie monocotiledónea de importancia económica y representativa de zonas tropicales en el mundo. Además, proporciona una amplia gama de productos básicos para la alimentación y vivienda. Sin embargo, el cultivo se ha visto amenazado por diferentes patógenos, principalmente el fitoplasma 'Candidatus Phytoplasma palmae' causante de la enfermedad del amarillamiento letal (ALC). Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa capaces de combatir el ataque de patógenos, por lo que, estudiar estos mecanismos de defensa abre posibilidades para hacer frente a estos patógenos. Uno de los mecanismos de defensa es la resistencia sistémica adquirida (SAR), que inicia con una infección local y provee una protección sistémica de larga duración a la planta contra un amplio rango de patógenos (hongos, virus, bacterias, etc.). SAR es inducido por un alto nivel de concentración de ácido salicílico (AS), que al mismo tiempo activa la proteína NPR1 (no-expresor de genes relacionaos a patogénesis-1), conocido como un regulador maestro de SAR. NPR1 forma parte de una familia génica de seis miembros en *Arabidopsis thaliana* (*NPR2*, *NPR3*, *NPR4*, *NPR5* y *NPR6*). Este trabajo reporta la clonación y caracterización molecular de dos genes homólogos a la familia de *NPR* en la palma de cocotero, *CnNPR1* (accesión: KT456286) y *CnNPR3* (accesión: KT456285). A partir de la secuencia de aminoácidos de ambos genes, se identificaron los dominios de interacción proteína-proteína (BTB/POZ y ANKIRINA) y los sitios de localización nuclear (NLS), característicos de los miembros de la familia de *NPR*. El análisis filogenético mostró que *CnNPR1* se agrupa en el clado I, junto con *AtNPR1* de *Arabidopsis thaliana* y *CnNPR3* se agrupa en el clado II junto con *AtNPR3*. La aplicación exógena AS en plántulas de cocotero, permitió observar cambios en los perfiles de expresión de *CnNPR1* y *CnNPR3* en los tejidos de hoja, tallo y raíz, generando evidencia sobre su posible papel en la cascada de señalización que conduce a la activación del mecanismo de defensa SAR en cocotero. El presente estudio representa el primer reporte sobre la clonación de genes claves involucrados en el mecanismo de defensa de tipo SAR en la palma de cocotero.

ABSTRACT

Coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is a monocotyledonous species of economic importance and representative of tropical zones in the world. In addition, it provides a wide range of commodities for food and housing. However, the crop has been threatened by different pathogens, mainly the Phytoplasma '*Candidatus Phytoplasma palmae*' that causes lethal yellowing disease (LY). The plants have developed defense mechanisms able to combat the attack of pathogens, so, studying these defense mechanisms opens up possibilities to deal with these pathogens. One of the defense mechanisms is systemic acquired resistance (SAR), which starts with a local infection and provides a long-term systemic protection to the plant against a wide range of pathogens (fungi, viruses, bacteria, etc.). SAR is induced by a high level of salicylic acid, which simultaneously activates NPR1 protein (non-expressor of pathogenesis related genes-1), known as a master regulator of SAR. NPR1 is part of a six-member gene family in *Arabidopsis thaliana* (*NPR2*, *NPR3*, *NPR4*, *NPR5* and *NPR6*). This work reports the cloning and molecular characterization of two homologous genes of NPR family in the coconut palm, *CnNPR1* (accession: KU926707) and *CnNPR3* (accession: KT456285). From the amino acid sequence of both genes, protein-protein interaction domains (BTB/POZ and ANKIRIN) and nuclear localization sites (NLS), characteristic of members of the NPR family, were identified. Phylogenetic analysis showed that *CnNPR1* is clustered in clade I, together with *AtNPR1* from *Arabidopsis thaliana* and *CnNPR3* is clustered in clade II together with *AtNPR3*. The exogenous application of SA to coconut plantlets allowed to observe changes in the expression profiles of *CnNPR1* and *CnNPR3* in leaf, stem and root tissues, generating evidence about its possible role in the signaling cascade leading to the activation of the SAR defense mechanism in coconut. The present study represents the first report on the cloning of key genes involved in the SAR-type defense mechanism in coconut palm.

INTRODUCCIÓN

La palma de cocotero (*Cocos nucifera* L.), es una especie de distribución pantropical y su cultivo se acentúa en las áreas costeras de México y el mundo. El cocotero, es conocido también como el “árbol de la vida o el árbol de los mil usos”, debido a que juega un papel importante en la vida y bienestar de millones de personas en los países tropicales (FAO, 2009). La explotación del cocotero es integral, pues cada una de sus partes puede ser utilizada para múltiples aplicaciones desde la construcción hasta la industria química (Punchihewa, 1999). A nivel mundial, México está ubicado como el octavo productor de coco (1.63% de la producción total) y segundo en América, sólo después de Brasil, con una producción total de 1, 004, 710 toneladas (FAO, 2010). Sin embargo, la producción ha disminuido debido a varios factores, como el pobre rendimiento de las plantaciones, uso excesivo de variedades de baja producción, envejecimiento de los cultivos los cuales son menos productivos con el paso de los años y un aumento en la incidencia de las plagas y enfermedades. En los últimos años, una de las principales enfermedades que amenaza el cultivo del cocotero, es la enfermedad del Amarillamiento Letal (AL), la cual ha devastado millones de plantaciones del cultivo a nivel nacional y mundial, ocasionando así, grandes pérdidas económicas en el mercado (OISAR, 2010). A la fecha, la única forma de combatir la enfermedad del AL, es mediante la búsqueda y multiplicación de germoplasma (ecotipo) resistente, entre los que podemos mencionar, el Alto del Pacífico, Enano Malayo Amarillo y Enano Malayo Verde, (Zizumbo *et al.*, 2008).

Las plantas han logrado desarrollar complicados mecanismos de defensa que actúan contra diferentes tipos de patógenos y el conocimiento y uso de estos mecanismos naturales de defensa, podría permitirnos plantear mejores estrategias para el mejoramiento genético en el control de plagas y enfermedades. La resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés), es un mecanismo de defensa, que proporciona una resistencia de larga duración en toda la planta contra un amplio rango de patógenos, tales como son, virus, hongos, bacterias y protozoos. El mecanismo de defensa SAR, es activado por la molécula señal ácido salicílico, una de las principales hormonas involucradas en la regulación de varias respuestas ante el estrés y el desarrollo, tales como, resistencia a patógenos, floración, termogénesis, senescencia y respuestas al estrés abiótico (Durrant and Dong, 2004; Vlot *et al.*, 2009).

Con la finalidad de encontrar al responsable de la activación de SAR, se hicieron estudios con mutantes los cuales no presentaban respuesta ante el tratamiento con SA, y al final todos coincidían con NPR1 (No expresor de genes PR-1). NPR1, es considerado como el regulador maestro de SAR. NPR1, interactúa con factores de transcripción de tipo TGA y promueve la síntesis y acumulación de proteínas relacionadas con patogénesis (PR), contribuyendo así a la resistencia (Cao *et al.*, 1994; Durrant and Dong, 2004). NPR1, es una proteína que posee dos dominios altamente conservados de interacción proteína-proteína: un dominio BTB/POZ (Bric-a-brac, Tamtrack, Broad-Complex) y un dominio repetido de ankirina.

En la actualidad, existen pocos estudios moleculares relacionados a los mecanismos de defensa en la palma de cocotero. Entre estos, están, el tratamiento de callos de cocotero con un inductor de defensa (quitosano), donde se observó el aumento en la expresión de PR-2 (β -glucanasas, marcador de SAR) (Lizama *et al.*, 2007); el aislamiento y caracterización de secuencias candidatas a genes de resistencia (RGC's) (Puch *et al.*, 2015); también, se ha realizado un estudio sobre la posible presencia de una respuesta de tipo-SAR en cocotero, donde se observó un daño menor en plántulas inoculadas con el patógeno *Phytophthora capsici*, que fueron previamente tratadas con 2.5 mM de SA (Narváez, 2010. Datos no publicados).

En base a estos antecedentes, el propósito de este trabajo, fue aislar y caracterizar molecularmente el cDNA de genes homólogos a *NPR1* en la palma de cocotero (*Cocos nucifera* L.), así como, estudiar sus niveles de expresión en plántulas de cocotero previamente tratadas con 2.5 mM de ácido salicílico.

CAPÍTULO I

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 EL COCOTERO (*Cocos nucifera* L.)

1.1.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

El cocotero también llamado “el árbol de la vida o árbol de los mil usos”, es una planta que tiene un tronco único, alcanza una altura de hasta 20-30 m, posee una corteza lisa y gris marcada por las cicatrices anulares de las hojas viejas, hojas pinnadas y largas arqueadas de hasta 6 m de longitud, florece durante todo el año (Figura 1.1) (GESPLAN, 2008). Paradójicamente, aunque se le conoce mundialmente como “el árbol de la vida”, en realidad no es un árbol en el sentido botánico, ya que no posee ramas ni cambium (tejido de crecimiento secundario).



Figura 1.1. Esquema representativo que muestra el aspecto general de una palma de cocotero (*Cocos nucifera* L.), junto con las distintas capas que conforman el fruto (mesocarpo y endocarpo).

Las palmas de cocotero son monoicas, es decir, presentan flores masculinas y femeninas en la misma inflorescencia, una especie de rama de 0.9 a 1.2 m de largo con entre 10 a 45 ramas laterales que se produce en cada axila foliar. Una vez fecundada, la flor da origen al fruto, que es una drupa fibrosa y que puede ser de forma ovoide o elíptica. Este fruto también llamado coco, se encuentra formado por tres capas. La primera, llamada exocarpo, es dura y de textura lisa al tacto; su color puede variar, dependiendo de la variedad específica; las frutas maduras varían en color de verde a amarillo ocre y rojo naranja, pero se secan en la palma a un color pardo opaco antes de caer. A continuación, se encuentra el mesocarpo, una gruesa capa de varios centímetros de espesor formada por largas fibras que son muy resistentes y poseen muchas y variadas aplicaciones. Finalmente, en el interior del fruto se encuentra la semilla, una especie de concha sumamente dura, llamada endocarpo o huesillo, que protege una cavidad interna hueca (Figura 1.1). En cuanto a las características taxonómicas, la palma de cocotero pertenece al género *Cocos* y es un cultivo monotípico, es decir que cuenta con una sola especie (Cuadro 1.1). Se considera que existen dos variedades: altas y enanas; las cuales se caracterizan por el tamaño y altura de la palma. Las altas son, por mucho, el tipo de palmas más empleadas para cultivo en todo el mundo

Cuadro 1.1. Se describen las principales características taxonómicas del cocotero.

TAXONOMÍA	
Nombre científico	<i>Cocos nucifera</i>
Clase	<i>Angiosperma</i>
Subclase	<i>Monocotiledóneas</i>
Orden	<i>Palmaceae</i>
Familia	<i>Aracaceae</i>
Género	<i>Cocos</i>
Especie	<i>C. nucifera</i> L.

Fuente: www.conacoco.com.mx (SIAP, 2010).

1.1.3 USOS Y APLICACIONES

La palma de cocotero, es probablemente, uno de los cultivos con mayor diversidad de aplicaciones en el mundo. Las ramas, por ejemplo, se utilizan desde hace siglos para cubrir techos de chozas, casas, enramadas y terrazas, pues no solo son de muy bajo costo, sino que resultan durables y contribuyen a aportar una característica apariencia tropical a las construcciones. Además, se emplean para la elaboración de cestos, persianas, charolas para comida, abanicos, tapetes, sandalias, juguetes, sombreros y toda clase de artículos decorativos. En cuanto a la madera exterior del tallo se emplea para la elaboración de muebles, artesanías, etc. (figura 1.2). Sin embargo, a nivel mundial, es el fruto quien mayor importancia tiene para la economía, pues de éste se obtienen los principales productos, como son: fibra y sustrato, agua de coco, aceite virgen, leche de coco, carbón activado, coco deshidratado, etc. Existen, sin embargo muchas otras aplicaciones para el consumo del coco.



Figura 1.2. Imagen representativa de algunos de los usos y productos que pueden ser obtenidos de la palma de cocotero, en especial del fruto. a) Elaboración de casas; b) obtención de coco rallado; c) obtención de carbón activado; d) obtención de leche de coco; e) agua de cocotero procesada y f) fabricación de partes de automóvil.

1.1.4 IMPORTANCIA ECONÓMICA

A nivel mundial, se cultivan cerca de 12 millones de hectáreas de palma de cocotero en 86 países, lo que equivale a 2,000 millones de palmas. México se ubica como el octavo productor de coco a nivel mundial (1.63% de la producción total) y como el segundo en América, después de Brasil, con una producción total de 1, 004, 710 toneladas (FAO, 2010). La importancia económica del cultivo de cocotero, radica ampliamente en la gama de productos que se obtiene él. El cultivo de cocotero a nivel nacional, abarca una superficie aproximada de 80 mil hectáreas distribuidas entre los 12 principales estados productores: Campeche, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Tabasco, Nayarit, Sinaloa, Quintana Roo, Veracruz y Yucatán (CONACOCO, 2013). Además, es fuente de ingreso para cerca de 30 mil trabajadores que viven de las labores del proceso de producción del cultivo y de las actividades en la industria de la transformación. Este cultivo genera aproximadamente 240 mil empleos por año y el valor de la producción asciende a cerca de \$ 3,200' 000,000 (CONACOCO, 2013) (figura 1.3). Sin embargo, en los últimos años la superficie de cocotero ha disminuido debido a diversos factores tales como son la vejez de las plantaciones, la disminución de la productividad del cocotero, el uso extensivo de variedades de baja producción y el aumento en la incidencia de plagas y enfermedades tales como el anillo rojo y el amarillamiento letal del cocotero (ALC) (Harrison y Oropeza, 2008).

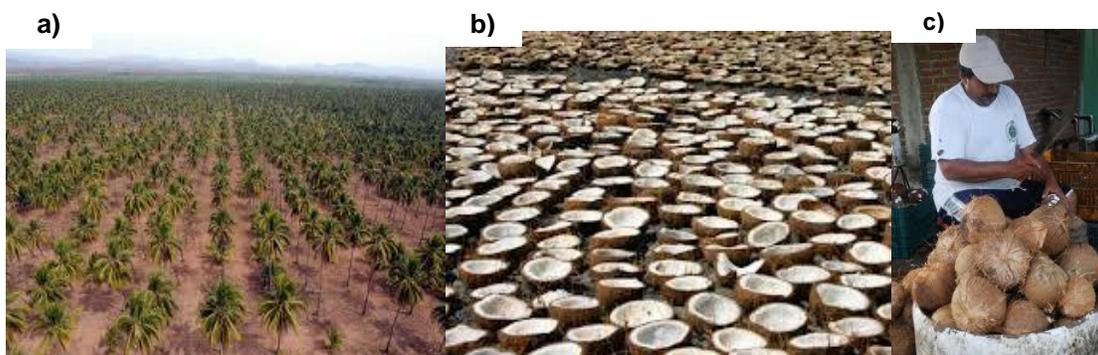


Figura 1.3. Esquemas representativos de la importancia del cocotero. a) Plantación de cocotero dedicada a la producción masiva de cocotero; b) Frutos de cocotero listos para la extracción de aceite virgen; c) Empleado que vive directamente del cultivo de cocotero.

1.1.5 ENFERMEDADES QUE AFECTAN LA PALMA DE COCOTERO

La mayoría de países productores de cocotero de América Latina y el Caribe son asolados por diferentes enfermedades que provocan la muerte de las plantas o que reducen su producción (Moscoso *et al.*, 2002). A pesar de que el cocotero no es originario de América, es afectado por enfermedades graves cuyo origen o centros de diversificación de sus patógenos, vectores o transmisores, son propios de dicho continente, tales como el Hartrot. Entre otras enfermedades presentes destacan: el complejo anillo rojo - picudo, la pudrición del cogollo y la marchitez por *Ceratocystis* porque, aparte de su importancia, manifiestan algunos síntomas externos semejantes a los típicos del ALC que dificultan el diagnóstico visual si no se cuenta con la experiencia suficiente. Asimismo, hay otras enfermedades como el sangrado del tallo, la pórroca y la quema del follaje, que llegan a tener importancia económica para algunas variedades o híbridos y en ciertos países. Sin embargo, el ALC, es considerado como la enfermedad más severa, debido al daño que ocasiona en las plantaciones de cocotero (Moscoso *et al.*, 2002).

1.2 AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO (ALC)

El amarillamiento letal del cocotero, es una enfermedad devastadora causada por fitoplasmas y afecta a cerca de 40 especies de palmas. Existe clara evidencia de que el transmisor de estos fitoplasmas es el insecto vector *Haplaxius crudus* (Harrison *et al.*, 1999). En los últimos 50 años, el ALC ha matado millones de palmas de cocotero en varios países en Latinoamérica y el Caribe, afectando drásticamente a la producción de cocotero y los escenarios de las áreas turísticas (figura 1.4) (Oropeza *et al.*, 2005).



Figura 1.4. Imágenes representativas de plantaciones de cocotero que han sido devastadas por la enfermedad del amarillamiento letal.

1.2.1 PRESENCIA Y DISPERSIÓN DEL AL EN MÉXICO

La enfermedad del AL, ha causado la muerte de cientos de millones de palmas de cocotero en la región del Caribe, América Central y México (Harrison y Oropeza, 2008). Esta enfermedad fue diagnosticada en Key West (Florida) en 1950 y posteriormente en la región de Miami en 1971, desde donde continúa extendiéndose hacia el norte. El AL se observó por vez primera en México en la Isla de Cozumel, Quintana Roo en el año de 1977 (figura 1.5), pero su presencia fue confirmada cinco años después, mediante microscopía electrónica (McCoy *et al.*, 1982). Actualmente, la enfermedad se encuentra en gran parte del Caribe (Jamaica, Gran Caimán, Cuba, República Dominicana, Haití, Bahamas), México, Belice, Florida, Texas, y más recientemente en Honduras y Guatemala (figura 1.5).



Figura 1.5. Imagen representativa del área de dispersión del AL en México, Centroamérica y en otros países del Caribe.

1.2.2 SINTOMATOLOGÍA

Durante el desarrollo de la enfermedad del Amarillamiento Letal, las palmas exhiben los siguientes síntomas visuales: el primer síntoma corresponde a la caída prematura de los frutos (Figura 1.6-1), posteriormente sobreviene la necrosis de la inflorescencia (Figura 1.6-2,3), y último la clorosis y senescencia de hojas (Figura 1.6-4,5) (Maust *et al.*, 2003). Las hojas adquieren después un color marrón, se desecan y mueren, permanecen colgando por algunos días y finalmente caen, quedando únicamente el tronco desnudo (Figura 1.6-6) (McCoy *et al.*, 1982).



Figura 1.6. Imagen que muestra los diferentes estadios durante el desarrollo de la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero.

1.2.3 AGENTE CAUSAL Y VECTOR

1.2.3.1 FITOPLASMAS

El agente causal del ALC es un fitoplasma, lo cual fue demostrado con base en: a) microscopía electrónica, encontrándosele en el floema de las plantas enfermas y no en las sanas (Beakbane *et al.* 1972). Los fitoplasmas tienen una biología única, distinguible de todas las demás bacterias fitopatógenas, debido a que requieren de diversos hospedantes para su replicación, sobrevivencia y dispersión; son de los pocos patógenos capaces de multiplicarse en organismos de dos reinos distintos: en las plantas (Reino Plantae) e insectos (Reino Animalia) (Bertaccini, 2007; Hogenhout *et al.*, 2008). Son parásitos obligados de plantas e insectos, en los que pueden encontrarse tanto dentro como fuera de sus células y, en la mayoría de los casos, necesitan de ambos hospedantes para dispersarse en la naturaleza (Hogenhout *et al.*, 2008). En las plantas, los fitoplasmas se encuentran principalmente en los elementos del floema, un ambiente rico en nutrientes que consumen indiscriminadamente (figura 1.7). Los fitoplasmas, son transmitidos a las plantas por insectos succionadores de savia, pertenecientes al orden de los homópteros (Weintraub y Beanland, 2006). Durante la transmisión, los fitoplasmas son transferidos a las células del floema por el vector y de allí se dispersan sistémicamente a toda la planta, usando la continuidad del sistema vascular de la planta, puesto que los fitoplasmas son muy pequeños, pasan por los poros de los tubos cribosos (Christensen *et al.*, 2004).

En los insectos, los fitoplasmas pueden encontrarse intra o extracelularmente en los tejidos del insecto, los patógenos deben atravesar las células intestinales, replicarse en varios tejidos del insecto, pasar a las células de las glándulas salivales, a fin de alcanzar la saliva del insecto para que de esa manera puedan ser introducidos de nuevo a una planta (Hogenhout *et al.* 2008).

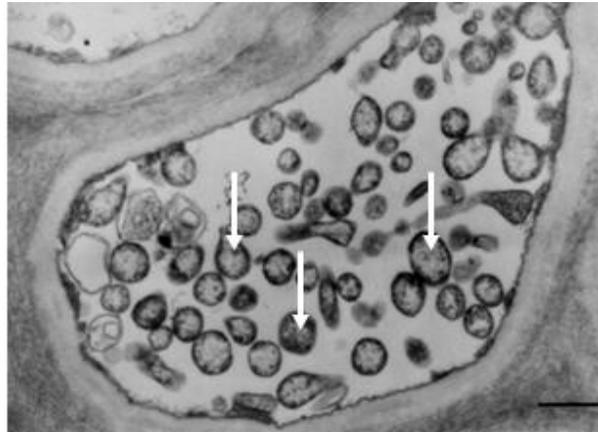


Figura 1.7. Imágen representativa del agente causal. a) Las flechas señalan los fitoplasmas contenidos en una célula del floema de coco, estos fitoplasmas, son poseen un diámetro aproximado de 142-295 nm y 1-16 μm de longitud.

Las maneras en que los fitoplasmas afectan a las plantas e insectos hospedantes son congruentes con su ciclo de vida. Puesto que los fitoplasmas dependen de las interacciones tanto con las plantas como con los vectores para su sobrevivencia y dispersión, ellos parecen volver a las plantas aún más atractivas para los vectores, aunque se desconoce cómo lo hacen. Sin embargo, los insectos prefieren tejidos u órganos vegetales jóvenes con un color verde amarillento para alimentarse y para colocar sus huevos, y precisamente estas características sintomáticas son las provocadas por los fitoplasmas en las plantas hospedantes (Hogenhout *et al.* 2008). Los fitoplasmas también pueden causar el apagamiento de las respuestas generales de defensa a insectos en las plantas, tales como las rutas de señalamiento de jasmonatos, por lo que se puede decirse que los fitoplasmas manipulan a los vectores y a las plantas hospedantes para incrementar sus oportunidades de sobrevivencia y dispersión (Hogenhout, *et al.*, 2008).

1.2.3.2 HAPLAXIUS CRUDUS

Haplaxius crudus (Van Duzee), es un salta-hojas cuyos adultos se alimentan del follaje de varias especies de palmas. Las ninfas de esta especie se desarrollan en las raíces. La dispersión natural del ALC, puede ocurrir mediante la transmisión por el homóptero *Haplaxius crudus*, que se moviliza en forma natural (mediante desplazamiento propio), moviendo el fitoplasma de palma a palma durante sus ciclos de alimentación o a grandes distancias cuando es acarreado por otras vías naturales de dispersión del insecto (vientos fuertes, otros animales, corrientes de agua, etc.) (Harrison y Elliott, 2009). Se tiene la sospecha de otros posibles vectores (homópteros) que también pudieran estar transmitiendo el ALC. Esto, debido a un estudio realizado en Jamaica, donde se reportó la detección del fitoplasma causante del ALC (*Candidatus Phytoplasma palmae*) en insectos del género (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Derbidae) (Brown *et al.*, 2006). Sin embargo, aún no ha sido posible determinar si este insecto es capaz de transmitir los fitoplasmas a los tejidos de las plantas al alimentarse. Por el momento, *H. crudus* es el único insecto que se considera vector del ALC en América (figura 1.8) (Howard y Gallo 2006). Esto, de acuerdo a diferentes pruebas realizadas en áreas afectadas por AL en Jamaica y Florida (Howard & McCoy, 1980), las cuales involucraron diferentes especies de plantas jóvenes aisladas en jaulas, en las que fueron introducidos decenas de miles de insectos. El ALC, fue exitosamente transmitido por el insecto *Haplaxius crudus* en distintas especies de palmas como: *Cocos nucifera*, *Veitchia merrillii* y *Pritchardia thurstonii* (Howard *et al.*, 1983).



Figura 1.8. Imagen representativa del insecto vector. *Haplaxius crudus*, posee una longitud de 4-5 mm y tiene la cabeza y el torax color pajizo

Recientemente, se logró la transmisión de fitoplasmas del AL a plántulas de cocotero en condiciones *in vitro*, utilizando al insecto vector *H. crudus*, esto fue llevado a cabo en un sistema que requiere de alrededor de 50 insectos y en experimentos que duraron 4 semanas (CICY, datos no publicados, 2010). También, se ha logrado la transmisión del fitoplasma del AL en palmas de *P. thusrtonii*, mediante el uso de jaulas, donde estas palmas fueron sometidos a la introducción de una gran cantidad de insectos *H. crudus* (CICY, resultados no publicados 2012). Por otra parte, una forma artificial de dispersión puede ser facilitada por el hombre al transportar plantas y/o partes de ellas que contengan fitoplasmas del ALC o insectos vectores infectados.

1.2.4 CONTROL DEL AMARILLAMIENTO LETAL (AL)

Desafortunadamente, no existen formas efectivas para eliminar los fitoplasmas de las plantas infectadas. Los insecticidas, en su momento lograron reducir los grados de dispersión pero no fue lo bastante útil (Reinert, 1977). Posteriormente, se observó, que el uso de antibióticos, como las tetraciclinas, lograba reducir los síntomas de la enfermedad pero su uso fue muy limitado, ya que son muy costosos y se requería que de aplicaciones periódicas, además que en algunos países no era permitido su uso, debido a posibles consecuencias hacia la salud (Howard & McCoy 1980; McCoy *et al.*, 1983). Actualmente, una forma eficiente para combatir esta enfermedad, es mediante el uso de germoplasma resistente con alta productividad. Desafortunadamente la identificación de estos genotipos resistentes no ha sido nada fácil, ya que para combatir la enfermedad de forma eficaz, es necesario contar con métodos ágiles de respuesta y capacidad de propagar en forma masiva y rápida a individuos seleccionados de genotipos resistentes, sin embargo, México ya se cuenta con un protocolo de propagación que posee una gran capacidad de multiplicación en base a la embriogénesis somática (Pérez-Núñez *et al*, 2006).

1.2.5 ECOTIPOS DE COCOTERO RESISTENTES AL AL

En el 2006, Zizumbo y colaboradores, expusieron 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 zona donde la enfermedad del ALC se encontraba activa. Como resultado, se observó que las variedades de Enano Malayo Amarillo y Alto del Pacífico Mexicano, presentaron un cierto nivel de resistencia a la enfermedad, debido a

que mostraron un menor índice de mortalidad, comparadas con la variedad susceptible Alto del Atlántico Mexicano, el cual fue totalmente devastada (figura 1.9) (Zizumbo *et al.*, 2008). A partir de este estudio, se han estado realizando programas de replantación, producción de híbridos (MYD-MXPT) con resistencia al AL y micropropagación mediante embriogénesis somática. Por otro lado, es posible que la resistencia presentada por estos ecotipos, este dada por algún mecanismo de defensa activo contra fitoplasmas causantes del ALC. Por lo que también, podría ser objeto de estudio para el desarrollo de marcadores moleculares o el estudio de genes claves para la activación de estos mecanismos de defensa.

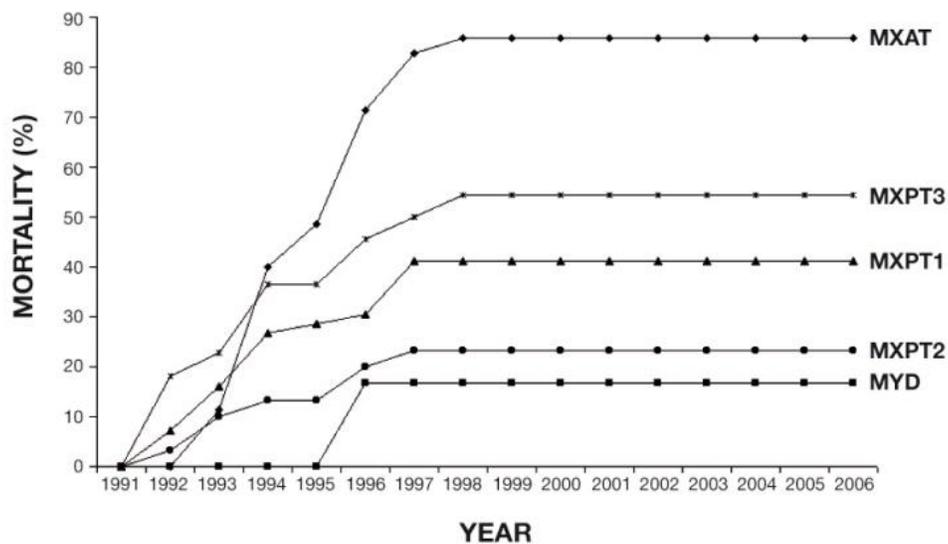


Figura 1.9. Grafica de mortalidad, en la cual se puede observar el grado de mortalidad de las diferentes variedades probadas. Se observa que la variedad MYD (enano malayo amarillo), MXPT1 y MXPT2, presentaron menor mortalidad ante la enfermedad del AL.

1.3 RESPUESTAS DE DEFENSA EN PLANTAS

El ataque por patógenos es una condición desfavorable para las plantas, que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. La velocidad evolutiva de las armas entre plantas y sus atacantes proveen plantas con un mecanismo de defensa altamente sofisticado que, parecido al sistema inmune innato de los animales, reconoce moléculas patógenas y responde mediante la activación de defensas específicas que son directas contra los invasores (Pieterse *et al.*, 2009). Las plantas poseen mecanismos de defensa *Constitutivos* (presencia de capas gruesas de cutícula, tricomas, deposición de ceras, acumulación de compuestos tóxicos) e *Inducidos* (Resistencia Sistémica Inducida, Resistencia Sistémica Adquirida, etc) que proveen en cierta forma, resistencia a la planta contra patógenos (García y Lozoya, 2004).

La respuesta de defensa se manifiesta en dos niveles. Ambos se inician, directa o indirectamente, con la percepción de un PAMP por un PRR (o el producto de un gen específico de un patógeno y su receptor correspondiente en la planta en las interacciones del tipo gen por gen). El primer nivel de respuesta es local, implica la síntesis de fitoalexinas y puede o no incorporar el elemento apoptótico de “respuesta hipersensible” (HR). Los efectos posteriores son sistémicos, se manifiestan a distancia y vienen instados por la señalización secundaria producida por las células apoptóticas o células que han activado genes defensivos. Las respuestas secundarias preparan a tejidos y órganos para defenderse de un proceso infeccioso. Tales reacciones comprenden una elevación de los niveles de toxinas defensivas constitutivas, de receptores de patógenos y de reforzamiento estructural de paredes celulares en tejidos (Vivanco *et al.*, 2005).

Las plantas interactúan con una amplia variedad de microorganismos patogénicos con diferentes estilos de vida y estrategias de infección. De acuerdo a su estilo de vida, estos patógenos generalmente se clasifican en *biótrosos*, *necrótrosos* y *hemibiótrosos* (Glazebrook, 2005; Pieterse *et al.*, 2009). Los *biótrosos*, son aquellos que mantienen a su hospedero vivo y causan un daño mínimo celular. Establecen contacto íntimamente intracelular y se alimentan de la célula hospedera. Por ejemplo, los mohos y micelios de los hongos, nematodos endoparasíticos, ciertas bacterias y virus patogénicos. Los *necrótrosos*, son aquellos que matan al tejido hospedero mediante la producción de

enzimas o toxinas que degradan la pared celular, conduciendo a la maceración del tejido hospedero, muestran un rango hospedero amplio, un ejemplo es la bacteria de raíz *Erwinia*. Por último, están los hemibiótrofos, son aquellos que muestran una fase inicial de biotrófico seguido por una necrotrofo matando a la célula hospedera (Gurr and Rushton, 2005). Para que una planta sea capaz de reconocer de manera eficiente a un patógeno y activar así los mecanismos de defensa apropiadas, existen evidencias de receptores localizados en la membrana plasmática de las células encargadas de activar estas respuestas de defensa (Glazebrook, 2005; García y Lozoya, 2004).

1.3.1 RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS

Contrario a lo que sucede en los sistemas inmunes de mamíferos compuestos de células especializadas para defensa (ej: linfocitos), la inmunidad vegetal se basa en la habilidad de cada célula para reconocer patógenos (Medzhitov and Janeway, 1997). En un ambiente rico en patógenos potencialmente dañinos, las plantas sobreviven dependiendo de la “*eficiente percepción del patógeno y las rápidas respuestas de defensa*”. Las plantas han desarrollado dos sistemas inmunes innatos para defenderse contra patógenos. El primero, es la inmunidad activada por PAMP's (PTI, por sus siglas en inglés), llevado a cabo por proteínas membranales llamadas receptores de patrones de reconocimiento (PRR, por sus siglas en inglés), que perciben firmas moleculares características de toda clase de patógenos, llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's; por sus siglas en inglés) (Medzhitov and Janeway, 1997). Los PAMP's son moléculas altamente conservadas entre las diferentes clases de microorganismos, por esta razón los PRR son altamente específicos y sensibles en la identificación de los PAMP's (Göhre y Robatzek, 2008; Benet y Mackey, 2007). La percepción de PAMPs mediante PRRs, es común para todos los organismos multicelulares y conduce a una matriz de respuestas de defensa y redistribución de la energía celular en una forma rápida, eficiente y en forma de multirespuesta, previniendo la entrada del patógeno (Nicaise *et al.*, 2009).

En la Figura 1.10a, se observa, que los PRR reconocen los PAMP activando PTI, confiriéndole a la planta una resistencia basal para evitar la virulencia del patógeno (Torto-Alalibo *et al.*, 2009; Benet y Mackey, 2007; Pieterse y Van Loon, 2004). Sin embargo, los patógenos exitosos han evolucionado, secretando efectores que flanquean actores claves de PTI para interferir con la defensa de las plantas y llevarlas hasta un estado de

susceptibilidad activada por efectores (ETS, por sus siglas en inglés) (Figura 1.10b) (Nicaise *et al.*, 2009). Posterior a la infección, la célula hospedera tiene que decidir entre morir o vivir, defendiéndose de la infección (Fu *et al.*, 2012).

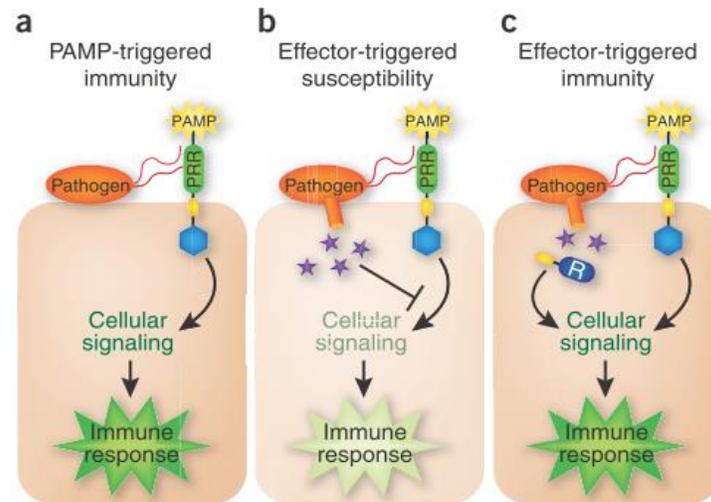
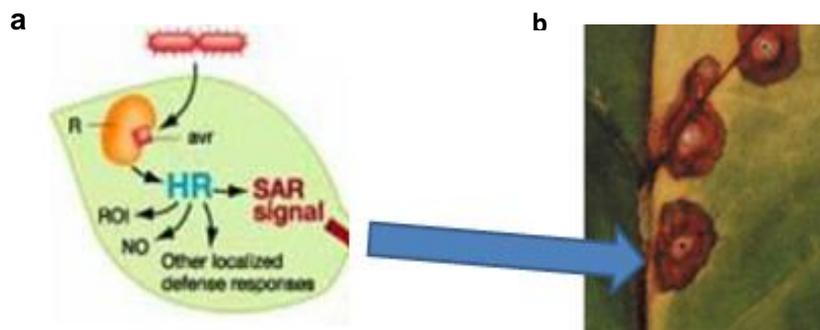


Figura 1.10. Esquema representativo de los diferentes sistemas inmunes innatos de las plantas. **a.** Primera respuesta inmune denominada PTI. **b.** Estado de susceptibilidad activada por efectores (ETS). **c.** Segunda respuesta de inmunidad activada por efectores (ETI).

Con el fin de defenderse contra los patógenos que puedan suprimir el primer mecanismo de defensa, las plantas desarrollaron una segunda respuesta de defensa activado por el reconocimiento de efectores específicos. El reconocimiento de un efector patogénico mediante una proteína de resistencia hospedera puede conducir a una inmunidad activada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés) (Figura 1.10c), la cual es caracterizada por una rápida muerte celular programada (PCD, por sus siglas en inglés) conocido como Respuesta Hipersensible (HR, por sus siglas en inglés) (Jones and Dangl, 2006; Nicaise *et al.*, 2009). El límite claramente definido de la respuesta hipersensible, indica la presencia de un mecanismo que controla la muerte celular y la supervivencia. (Durrant & Dong, 2004).

1.3.2 RESPUESTA HIPERSENSIBLE (HR)

La HR es un tipo de muerte celular programada, a menudo asociado con la resistencia de las plantas a infecciones por patógenos. La HR, se caracteriza por una necrosis localizada y lesiones en los tejidos como parte de un intento por confinar al patógeno (Hammond *et al.*, 1996; Morel & Dangl, 1997; Mur *et al.*, 2008). La HR fue observada por primera vez durante la interacción del patógeno *Puccinia graminis* con cultivos resistentes (Stakman, 1915). A partir de eso, ha sido observada en cada caso de interacción planta-patógeno. La HR en plantas, juega un papel similar al de la muerte celular programada en animales, evitar el crecimiento del patógeno. La HR, también está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina (Figura 1.11a) (Greenberg *et al.*, 1994; Morel & Dangl, 1997; Ryals *et al.*, 1996).



Buchanan Fig. 21.41

Figura 1.11. Respuesta hipersensible. **a.** Proceso de reconocimiento y activación de HR. **b.** Lesiones necróticas formadas por la muerte celular programada (PCD).

Además de la necrosis local (figura 1.11b), la detección del patógeno conduce al establecimiento de dos respuestas de defensa, la Resistencia Local Adquirida (LAR, por sus siglas en inglés) y la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) (Fu y Dong, 2013). Ambas respuestas se caracterizan por un incremento en la acumulación de proteínas relacionadas a patogénesis (PR) y de la biosíntesis de AS (Durrant and Dong, 2004). No obstante, aún quedan preguntas sin responder sobre el tipo de reacción y el programa de muerte celular que deben ser abordadas con técnicas genéticas, bioquímicas y citológicas (Kombrink y Schmelzer, 2001).

1.3.3 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (SAR)

Las plantas han desarrollado sofisticados mecanismos de defensa para hacer frente a la constante exposición de un amplio rango de patógenos microbiales (Durrant y Dong, 2004). En los noventas, Ross mostró que las plantas de tabaco sufrían cambios al ser infectadas con el virus mosaico del tabaco (TMV, por sus siglas en inglés) y posteriormente, éstas plantas desarrollaron una mayor resistencia a una segunda infección en tejidos distales (Figura 1.12) (Ross, 1961). A esta propagación de resistencia en todos los tejidos de la planta se le denominó como resistencia sistémica adquirida (SAR) (Durrant y Dong, 2004; Hammerschmidt, 1999b).

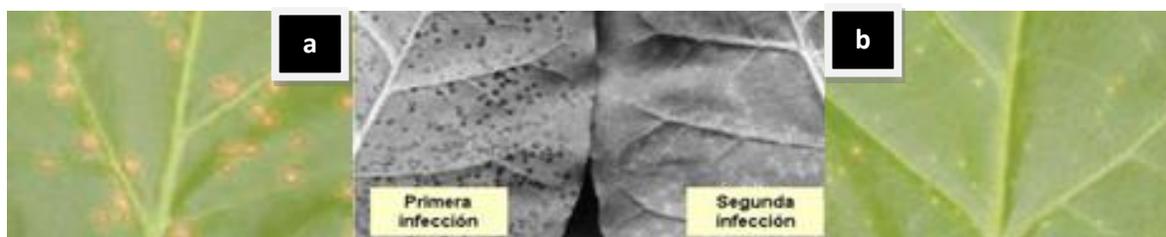


Figura 1.12. El mecanismo de defensa SAR es determinado por una primera infección en la cual se observa mayor daño (a) y posteriormente en una segunda infección en la cual se observa un menor daño (b).

SAR, es un mecanismo de defensa que confiere protección de larga duración contra un amplio espectro de microorganismos patogénicos, como son virus, bacterias, hongos, Oomicetos y fitoplasmas (Durrant y Dong, 2004; Métraux *et al.*, 2002; Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997; D'Amelio *et al.*, 2010). El mecanismo de defensa SAR, es activada por la molécula señal del ácido salicílico y compuestos análogos, esta activación, está asociada a la acumulación de proteínas relacionadas con patogénesis (PR's) (Figura 1.13) (Durrant y Dong, 2004; Görlach *et al.*, 1996; Friedich *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996; Métraux *et al.*, 1991). Las proteínas relacionadas con patogénesis están divididas en 17 familias. La función principal de la mayoría de estas familias de proteínas es limitar la actividad del patógeno, su crecimiento y dispersión. Algunas de las PRs inducidas en esta respuesta de defensa son la PR1, PR2 (β -1,3-glucanasas), PR3 (quitinasas) y PR5 (Van loon *et al.*, 2006). La acumulación de SA se presenta localmente, y en menor grado a nivel sistémico. La aplicación exógena de SA, así como sus análogos, es capaz de

inducir SAR en varias especies vegetales. Estudios recientes, demostraron que el éster metilado de SA (salicilato de metilo MeSA), juega un papel importante en el establecimiento de la SAR (Park *et al.*, 2007).

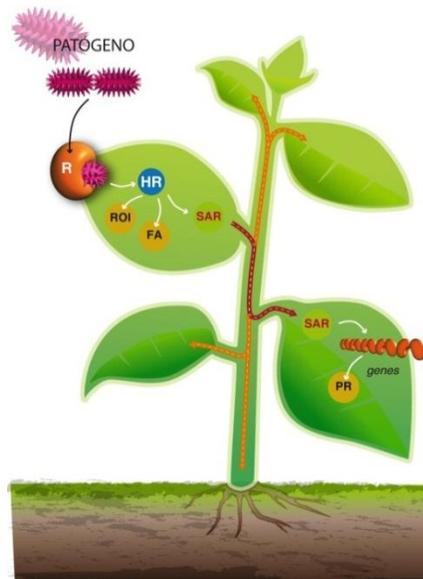


Figura 1.13. Imagen esquematizada, de los procesos que ocurren durante la activación del mecanismo de defensa SAR.

1.3.4 PROTEÍNAS RELACIONADAS A PATOGÉNESIS (PR's)

Estas proteínas también llamadas proteínas PR, son un grupo variable que se acumulan en las plantas después y durante la infección con patógenos. Las proteínas PR se identificaron inicialmente en tabaco durante la interacción con el virus del mosaico del tabaco (Van Loon y Van Kammen, 1970). La clasificación más simple se basa en los cinco grupos originalmente identificados para las proteínas PR de tabaco. Sin embargo, éstas han sido identificadas tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas, lo que ha generado una nueva clasificación (Van Loon y Van Strien, 1999). Algunas de las proteínas PR, poseen actividades definidas tal como las PR-2 (β -1,3-*glucanasas*) y PR-3 (*quitinasas*). Esto sugiere que la alta expresión de glucanasas y quitinasas durante la patogénesis tiene una función importante en la defensa contra patógenos que contienen 1,3 β -*glucano* y quitina. De hecho, plantas de trigo y arroz manipuladas genéticamente

para sobreexpresar ciertas quitinasas demostraron ser más resistentes a los hongos *Erysiphe graminis* y *Magnaporthe grisea* respectivamente (Bliffeld *et al.*, 1999, Nishizawa *et al.*, 1999). A pesar de que algunas proteínas PR, como las PR-2 y PR-3 poseen actividad antimicrobiana, aún se desconoce la función que tienen el resto de ellas durante la respuesta de defensa a patógenos y particularmente a patógenos virales. En adición se han identificado varios genes clave en respuestas a defensas, esto incluye a las proteínas PR de las cuales hasta la fecha se conocen 17 familias PR-1 a PR-17, siendo la familia PR-1 una de las más estudiadas (ver Cuadro 1.2), es altamente conservada y parece estar representada en cada especie de planta estudiada. Son notables porque se usan como marcadoras de capacidad de defensa mejorada durante la respuesta de SAR inducida por patógenos (Durrant y Dong, 2004).

Cuadro 1.2. Familia de proteínas PR, involucradas en respuestas de defensa.

Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Cbia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Cbid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatococcus-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pim</i> ')
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Cbib</i>
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Ppx</i>
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown	<i>Ypr17</i>

1.4 ÁCIDO SALICÍLICO (AS)

Por más de 200 años, el ácido salicílico ha sido estudiado por su uso medicinal en humanos (aspirina). Sin embargo, su papel principal en plantas, particularmente en respuestas de defensa contra patógenos ha llegado a ser evidente durante los últimos 20 años. El AS, forma parte de un amplio grupo de compuestos sintetizados en plantas denominados fenólicos, los cuales poseen en su estructura química un grupo hidróxilo

unido a un anillo aromático. Los compuestos fenólicos participan en muchas funciones metabólicas en plantas, como son la síntesis de lignina, actividad alelopática, y en algunos casos en la biosíntesis de compuestos relacionados con la defensa como las fitoalexinas (Rangel *et al.*, 2010). El AS en particular, influye en la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, expresión de genes asociados a senescencia, respuesta a estrés abiótico y de forma esencial en la termogénesis, así como a la resistencia a enfermedades etc. (Rangel *et al.*, 2010; Vlot *et al.*, 2009).

1.4.1 METABOLISMO AS

En relación a la biosíntesis del AS, se ha descrito que puede ser generado por dos distintas vías enzimáticas que requieren del metabolito primario corismato (Chen *et al.*, 2009). El aminoácido L-fenilalanina, puede ser convertido en ácido salicílico por dos vías, una mediante el intermediario benzoato y la otra mediante el ácido cumárico, a través de una serie de reacciones enzimáticas inicialmente catalizadas por la enzima Fenilalanina Amonio Liasa (PAL). A su vez, el corismato puede también ser convertido en AS vía isocorismato, en un proceso de dos pasos que implica la participación de las enzimas Isocorismato Sintasa (ICS) e Isocorismato Piruvato Liasa (IPL) (Verberne *et al.*, 2000; Wildermuth *et al.*, 2001) (figura 1.14).

La mayor parte del AS producido como respuesta al ataque por patógenos es sintetizado por la segunda vía en *Arabidopsis*, tabaco y tomate (Wildermuth *et al.*, 2001; Uppalapati *et al.*, 2007; Catinot *et al.*, 2008). La mayoría del AS en la planta es convertido a AS O- β -glucósido (ASG) por medio de una enzima llamada AS glucosil transferasa (ASGT) inducible por patógenos (Dean *et al.*, 2005). En *Arabidopsis thaliana*, el AS es sintetizado probablemente en cloroplastos, mientras que en tabaco la enzima ASGT parece estar localizada en el citosol. El ASG, en tabaco, es activamente transportado del citosol hacia la vacuola, donde puede funcionar como una forma almacenada inactiva que puede ser convertida a AS en caso de ser necesario (Dean *et al.*, 2005).

El salicilato de metilo (SMe), es otro derivado del AS y/o su forma glucosilada (SMeG) también puede acumularse en niveles relativamente altos *in vivo* (Shulaev *et al.*, 1997; Dean *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007). Se ha demostrado que tanto el SMe como el ASG

son biológicamente inactivos, mientras que una forma hidroxilada del AS, el ácido 2,5 dihidroxibenzóico (ácido gentísico), que también se acumula en plantas, puede inducir la expresión de genes *PR* específicos en tomate que no son inducidos por ácido salicílico (Chen *et al.*, 2009; Bellés *et al.*, 1999).

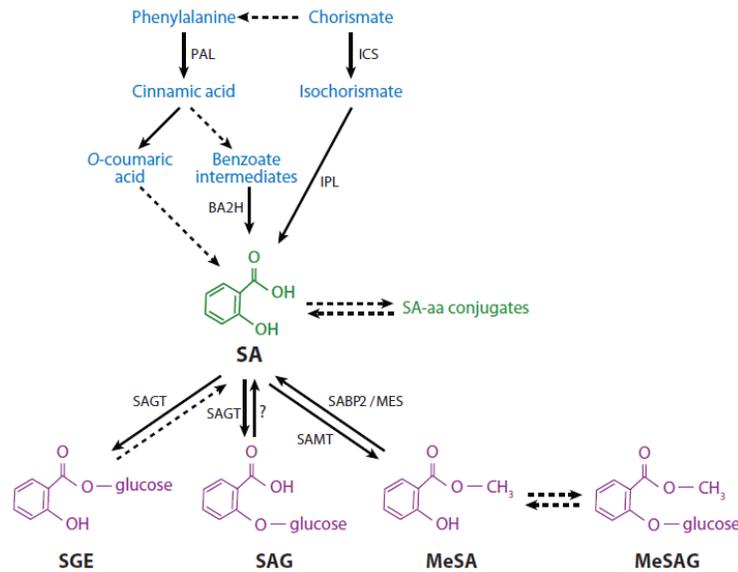


Figura 1.14. Biosíntesis y metabolismo del AS. Abreviaturas: FAL, fenilalanina amonio liasa; ICS, isocorismato sintasa; IPL, isocorismato piruvato liasa; AB2H, ácido benzoico 2-hidroxilasa; AS, ácido salicílico; ASGT, ácido salicílico glucosil transferasa; aa, amino ácidos; ASMT, AS metil tranferasa; P2UAS, proteína 2 unida a AS; MES, metil esterasa; SEG, saliciloil éster glucosa; ASG, AS O- β glucósido; SMe, salicilato de metilo; SMeG, salicilato de metilo O- β -glucosido. (Vlot *et al.*, 2009).

1.4.2 MODO DE ACCIÓN DEL AS EN RESPUESTA DE DEFENSA

En la vía de señalización mediada por el AS se ha demostrado la participación de un componente clave, la proteína NPR1 (no-expresor de genes *PR1*). NPR1 se mantiene en el citoplasma como un oligómero, el cual se forma a través de puentes disulfuro intermoleculares. La nitrosilación de NPR1 mediante el S-nitrosoglutatión en la cisteína-156 facilita su oligomerización y mantiene la homeostasis de NPR1 después de la inducción con el AS. La desoligomerización de NPR1 conduce a su activación, lo cual ocurre por cambios en el estado redox de la célula durante la respuesta inmune de varios organismos y está catalizada por tioredoxinas (Tada *et al.*, 2008). Después de su

activación, la proteína NPR1 es translocada al núcleo donde interactúa con factores de transcripción tipo TGA para inducir la expresión de genes de defensa involucrados en la activación de la SAR (Pieterse & Van Loon, 2004; Durrant & Dong, 2004). Los factores de transcripción TGA pertenecen a la familia de factores de transcripción bZIP (por sus siglas en inglés, basic región/leucine zipper motif), que en plantas regulan procesos que incluyen la defensa contra patógenos, la señalización por estrés y luz, la maduración de semillas y el desarrollo de las flores (Jakoby *et al.*, 2002). El grupo TGA está compuesto por 10 miembros en *Arabidopsis thaliana* (Jakoby *et al.*, 2002), los miembros presentan una interacción diferencial con NPR1 (Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Kesarwani *et al.*, 2007). Los factores de transcripción TGA2 y TGA3 de *Arabidopsis thaliana* muestran una fuerte afinidad por NPR1, además de que ambos se unen al elemento de respuesta al AS (elemento as-1) en el promotor de PR1 (Zhou *et al.*, 2000).

1.4.3 ACTIVIDAD DEL AS Y SUS ANÁLOGOS CONTRA FITOPLASMAS

Los fitoplasmas son bacterias patogénicas vegetales que carecen de pared celular y pertenecen a la clase Mollicutes, además están asociados con enfermedades de árboles frutales económicamente importantes, vegetales, ornamentales y arvenses (D'Amelio *et al.*, 2010). Son simbioses obligados de plantas e insectos, y en muchos casos necesitan de ambos hospederos para dispersarse en la naturaleza. En plantas, pueden permanecer restringidos en el floema (Doi *et al.*, 1967), y propagarse a través de los tubos cribosos (Hogenhout *et al.*, 2008). El control de las enfermedades causadas por los fitoplasmas es difícil y se basa principalmente en tratamientos con insecticidas contra el insecto vector, la erradicación de plantas infectadas y el uso de material vegetal sano. Los insecticidas pueden ser efectivos en disminuir la población del vector, pero representan un potencial daño a la salud humana (Wu *et al.*, 2012). Actualmente, se han hecho estudios aplicando SA y/o sus análogos sintéticos (INA y BTH) en algunos cultivos de interés comercial que son infectados por fitoplasmas y se han observado resultados exitosos (ver Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3. Estudios realizados en algunos cultivos que son afectados por fitoplasmas y que presentaron una respuesta de defensa ante la aplicación de SA y/o sus análogos.

Especie	Observaciones	Patógeno	Autor
<i>Chrysanthemum carinatum</i>	La aplicación de 2.4 mM de BTH (análogo de SA), retrasó los síntomas y redujo la multiplicación de los fitoplasmas.	Fitoplasma (<i>Candidatus Phytoplasma asteris</i>)	D'Amelio <i>et al.</i> , 2010
<i>Solanum tuberosum</i>	La aplicación de 0.001 mM de SA, redujo los síntomas de la infección, se favoreció la translocación de fotosintetizados e incrementó la calidad de los tubérculos.	Fitoplasma causante de la enfermedad de la papa de la punta morada (PPT)	Sánchez-Rojo <i>et al.</i> , 2011
<i>Solanum lycopersicum</i>	La aplicación de 0.01mM de SA redujo el grado de infección y redujo significativamente los síntomas de la enfermedad.	Fitoplasma causante de la enfermedad de la papa de la punta morada (PPT)	Wu <i>et al.</i> , 2012
<i>Vitis vinifera</i>	Plantas de campo infectadas, tratadas con inductores de resistencia, mostraron remisión de síntomas	Fitoplasma (Bois Noir)	Romanazzi <i>et al.</i> , 2009

La aplicación exógena de SA a concentraciones no tóxicas puede ser capaz de regular el estrés biótico y abiótico (Elwan y El-Hamahmy 2009). Al igual la aplicación exógena de su derivado el ácido acetilsalicílico (AAS), induce la expresión de genes relacionados con patogénesis (PR's), que promueven la resistencia contra diferentes tipos de patógenos como son virus, bacterias, Oomicetos, y hongos en especies dicotiledónea (Malamy y Klessing, 1992; Silverman *et al.*, 1995; Ryals *et al.*, 1996; Shah y Klessing, 1999 y monocotiledónea (Wasternack *et al.*, 1994; Kogel *et al.*, 1994; Gornach *et al.*, 1996; Mrris *et al.*, 1998; Pasquer *et al.*, 2005; Makandar *et al.*, 2006). Estos descubrimientos, son prueba contundente de que la aplicación de AS a los cultivos comerciales podría ayudar, o en el mejor de los casos prevenir la infección por fitoplasmas así como disminuir el desarrollo de los síntomas de la enfermedad.

1.5 NPR1 (NO EXPRESOR DE GENES *PR1*)

NPR1 (non-expressor of *PR-1*), es considerado como el regulador positivo de SAR, que se activa en respuesta a SA y se transloca al núcleo donde interactúa con factores de transcripción (*TGA*, *WRKY1*) para inducir la expresión de genes *PR* (Durrant and Dong, 2004). En la especie de *A. thaliana*, NPR1 es requerido para la activación o regulación de 2,248 genes, en respuesta a tratamiento con el análogo de ácido salicílico, BTH (Wang *et al.*, 2006). En 1994, Cao y colaboradores reportaron por vez primera la caracterización de

una mutante de *npr1* de *A. thaliana*, esta mutante fue identificada de un grupo de plantas transformadas con el constructo BGL2-GUS y mutagenizadas con Etilmetanosulfonato (EMS), posteriormente fueron seleccionados aquellas plantas insensibles al SA, así como al 2,6-dicloroisonicotínico (INA). La mutante *npr1* presentó las características, de no ser responsiva a SA e INA, al igual se observó una disminución en los niveles de expresión del gen *PR-5* (5 veces) y *PR-1* (20 veces) comparado con las plantas silvestres (figura 1.15). Esta fue la razón por la cual a la mutante se le denominó NPR1 o “No expresivo de genes *PR-1*” (Cao *et al.*, 1994).

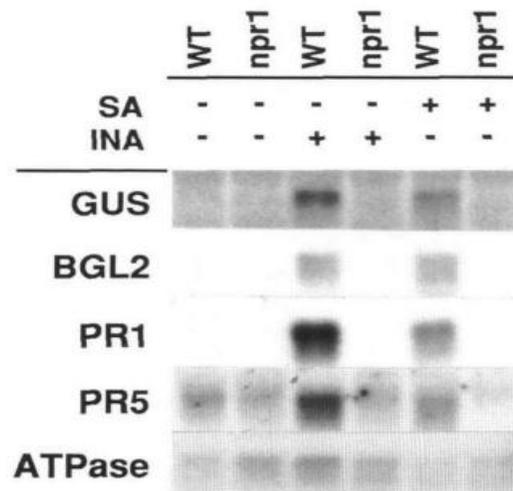


Figura 1.15. Análisis del perfil de expresión de genes *PR1* y *PR5*, considerados marcadores de SAR, en respuesta a tratamiento con SA o INA (Cao *et al.*, 1994).

1.5.1 CARACTERIZACIÓN DE NPR1

Posteriormente, lograron identificar y clonar a *NPR1*, mediante un mapa basado en aproximaciones y se encontró que codifica para una nueva proteína con repeticiones de *ankirina* (figura 1.16). La lesión en un alelo de la mutante *npr1* interrumpió la secuencia consenso de *ankirina*, sugiriendo que estas repeticiones son importantes para la función de *NPR1*. Además la transformación de la mutante con el gen silvestre *NPR1*, no sólo completó las mutaciones, sino que también restauró las respuestas a la inducción de SAR con respecto a la expresión de genes *PR* y resistencia a infecciones, además proporcionó a las plantas transgénicas más resistencia a infecciones por *Pseudomonas syringae* en ausencia de inducción de SAR (Cao *et al.*, 1997).

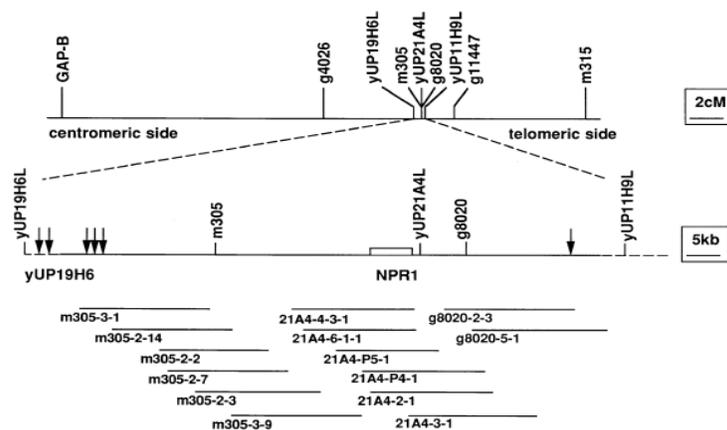


Figura 1.16. Mapeo genético utilizado durante la clonación del gen *NPR1* de *Arabidopsis thaliana* (Cao *et al.*, 1997).

Se ha logrado identificar la presencia de homólogos de *NPR1* en especies monocotiledóneas y dicotiledóneas (Zhao *et al.*, 2008; Chern *et al.*, 2005; Yuang *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2010; Henanff *et al.*, 2009, 2011; Cao *et al.*, 1994; Peraza-Echeverría *et al.*, 2012; Malnoy *et al.*, 2007), por lo que se sugieren que su función se conserva a través de las especies de plantas.

1.5.2 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA NPR1

La proteína de NPR1 posee una secuencia de localización nuclear bipartita (NLS) y dos dominios conservados de interacción proteína-proteína: un dominio BTB/POZ (Broad-complex, Tramtrack and Bric-abrac/Pox virus and Zinc Finger), el cual encuentra en el N-terminal, es un dominio característico de proteínas de unión a actina y que está involucrado en la oligomerización de proteínas y en la formación de heterodímeros (figura 1.17) (Collins *et al.*, 2001). NPR1 funciona también como substrato para ligasas de ubiquitina las cuales son base para el complejo Cullin3 (Spoel *et al.*, 2009). El otro dominio característico de la proteína, es un dominio repetido de *ANKIRINA* (Zhao *et al.*, 2008), que le permiten interactuar con factores de transcripción tipo B-Zip (TGA2, TGA3, TGA5 y TGA6) (Rochon *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 1999). NPR1, presenta también en la N-terminal un motivo fosfodegrón tipo I κ B (Collins *et al.*, 2001), residuos de Cys que controlan el estado de oligomerización y la localización nuclear de la proteína (Rochón *et*

al., 2006), y se ha identificado que la C-terminal es importante para su localización nuclear (figura 1.17) (Rochon *et al.*, 2006; Kinkema *et al.*, 2000).

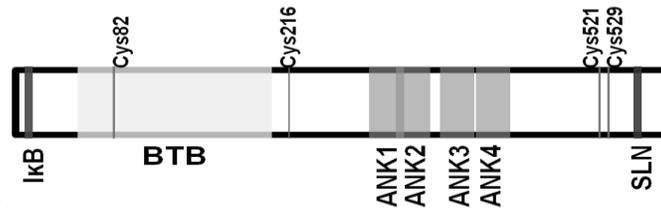


Figura 1.17. Modelo estructural de la proteína NPR1. Se observa los residuos Cys 82 y Cys 216, junto con el dominio repetido de *ankirina* y el dominio BTB/POZ.

1.5.3 FAMILIA DE NPR EN *ARABIDOPSIS* Y OTRAS PLANTAS

NPR1 forma parte de una gran familia génica, conformado por otros 5 genes homólogos denominados como, *NPR2*, *NPR3*, *NPR4*, *NPR5* (*BOP2*, Blade-On-Petiole 2) y *NPR6* (*BOP1*, Blade-On-Petiole 1) (Zhang *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Norberg *et al.*, 2005; Hepworth *et al.*, 2005 y Mckim *et al.*, 2008). Los seis miembros de esta pequeña familia génica presentan homología entre ellos, sin embargo, tienen diferencias en el tamaño de su secuencia genómica y al número de exones que poseen, así como en el tamaño de las proteínas que codifican (Figura 1.18) (Shi *et al.*, 2012).

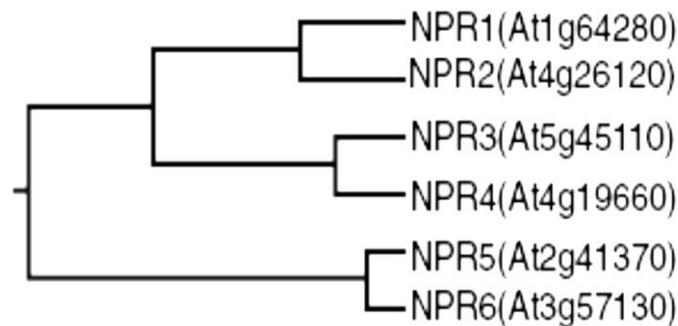


Figura 1.18. Esquema representativo del árbol filogenético conformado por miembros homólogos de la familia NPR1 de *Arabidopsis thaliana* (Liu *et al.*, 2005).

NPR1-NPR4 cada uno contiene 4 exones y codifican proteínas con tamaño similares (574-600 aminoácidos). NPR5 y NPR6, cada uno contiene 2 exones y codifican proteínas que son significativamente más pequeñas que las que codifican NPR1-NPR4 (figura 1.19). Otra de las características que comparten, es que todas poseen un dominio BTB/POZ y un dominio repetido de ANKIRINA, así como sus respectivos residuos de cisteína (Cys), involucrados directamente en el mecanismo de control redox y en la activación de la proteína (Zhang *et al.*, 2005; Hepworth *et al.*, 2005; Rochón *et al.*, 2006). Estos residuos conservados de cisteína, permiten que todas adopten una conformación estructural similar (Shi *et al.*, 2012).

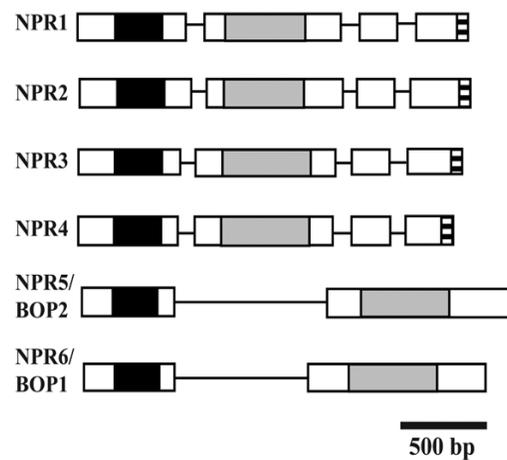


Figura. 1.19. Imagen representativa de los seis miembros de la familia de NPR de *A. thaliana*. NPR1-NPR4 poseen cuatro exones y NPR5 y NPR6, constan de dos exones. Los seis miembros poseen los dominios conservados BTB/POZ y el dominio repetido de ankirina.

En los últimos años, se han realizado diversos estudios para dilucidar la funcionalidad de cada uno de los miembros homólogos de la familia de NPR (Cao *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2012 y Mckim *et al.*, 2008). Respecto a NPR1 y sus ortólogos, se ha observado que su sobreexpresión en diferentes cultivos de plantas es capaz de aumentar la resistencia contra varios tipos de patógenos (Cao *et al.*, 1998; Chern *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2004; Fitzgerald *et al.*, 2004; Chern *et al.*, 2005; Makandar *et al.*, 2006; Malnoy *et al.*, 2007; Potlakayala *et al.*, 2007; Le Henanff *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010; Dutt *et al.*, 2015). Con la finalidad de especificar la función de NPR3 y NPR4, se han hecho diversos

trabajos, en los cuales se han encontrado resultados contradictorios, sin embargo, dos estudios sugieren que estos dos genes participan en la ruta de respuesta de defensa en plantas (Liu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Posteriores estudios, han logrado demostrar que tanto NPR3 como NPR4, funcionan como receptores de SA mediando la degradación de NPR1 por el complejo Cullin 3 ubiquitin ligasa dependiente de SA, regulando de esta manera la muerte celular programada y la inmunidad de la célula (Figura 1.20) (Fu *et al.*, 2012).

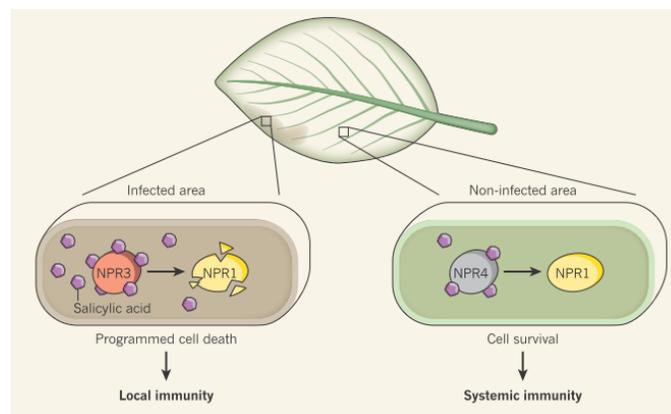


Figura 1.20. Imagen representativa que muestra la manera en que NPR3 y NPR4 interactúan con la hormona vegetal ácido salicílico y su función en la regulación de NPR1 (Fu *et al.*, 2012).

Respecto a NPR5 (BOP2) y NPR6 (BOP1), se ha reportado que ambos genes, poseen papeles funcionalmente redundantes en el control del desarrollo de órganos y simetría de hojas y flores (Hepworth *et al.*, 2005; Norberg *et al.*, 2005; McKim *et al.*, 2008; Jun *et al.*, 2010). Sin embargo, un estudio reciente determinó que BOP1 y BOP2 son inducidos por metil jasmonato y participan de alguna manera en la respuesta de defensa contra patógenos, (Canet *et al.*, 2012). Por otra parte, gracias a que se cuenta con el genoma secuenciado de algunas especies de plantas, se ha logrado determinar la presencia de pequeñas familias de genes homólogos a NPR1 dentro de su genoma, la finalidad de esto, es conocer si estos genes conservados poseen un papel funcional similar a NPR1 de *Arabidopsis* (Cuadro 1.4).

Cuadro 1.4. Familias de genes homólogos a *NPR1* caracterizados en otras especies de plantas.

Especie	Miembros	Referencias Bibliográficas
<i>A. thaliana</i>	6	The <i>Arabidopsis thaliana</i> Genome Initiative, 2005
<i>Populus trichocarpa</i>	5	Tuskan <i>et al.</i> , 2006
<i>Vitis vinifera</i>	2	Le Henanff <i>et al.</i> , 2009
<i>Oryza sativa</i>	5	Yuang <i>et al.</i> , 2007
<i>Carica papaya</i>	4	Peraza-Echevería <i>et al.</i> , 2012

1.5.4 EXPRESIÓN DE *NPR1* Y HOMÓLOGOS EN RESPUESTA A AS Y/O ANÁLOGOS

Los efectos de la aplicación exógena de AS en la bioproductividad, crecimiento, fotosíntesis, relaciones hídricas, diversas actividades enzimáticas y sus efectos en plantas expuestas a diferentes estreses bióticos y abióticos han sido discutidos. Se ha observado que la aplicación exógena de AS y/o sus análogos (BTH y/o INA), inducen la expresión de genes *PR* los cuales están involucrados en conferir resistencia a las plantas contra diferentes microorganismo patogénicos (Hayat *et al.*, 2009). Se ha observado que la sobreexpresión de *NPR1* aumenta la resistencia contra patógenos, mientras que las que presentan bajo nivel de expresión son susceptibles al ataque de patógenos. Por lo tanto, la regulación en la expresión de *NPR1* es importante para la activación de los mecanismos de defensa (Cao *et al.*, 1998). Actualmente, se ha logrado caracterizar al promotor de *NPR1* en especies como *Arabidopsis* y Cacao, donde se han encontrado elementos *cis* los cuales están involucrados en la regulación de la transcripción de *NPR1* en presencia de SA (Shi *et al.*, 2010). Además de la expresión de *NPR1*, también se ha logrado caracterizar la expresión de algunos de sus homólogos en *Arabidopsis* (*NPR3* y *NPR4*), donde se ha visto que el INA, un análogo sintético de SA, es capaz de regular la expresión de ambos genes (Zhang *et al.*, 2006). En el siguiente Cuadro, se observan algunas especies en las cuales se ha encontrado un aumento en el nivel de transcritos de *NPR1* y algunos de sus homólogos ante la aplicación de SA y sus análogos sintéticos (Cuadro 1.5).

Cuadro 1.5. Estudios de expresión realizada a NPR1 y sus homólogos en algunas especies de plantas

Especie	Gen	Inductor	Expresión	Autor
<i>A. thaliana</i>	<i>NPR1</i>	SA/INA	Hubo aumentó en nivel de transcritos	Cao <i>et al.</i> , 1994
<i>M. acuminata</i>	<i>NPR1</i>	SA	Hubo aumentó en nivel de transcritos	Endah <i>et al.</i> , 2008
<i>I. batatas</i>	<i>NPR1</i>	SA	Hubo aumentó en nivel de transcritos	Guan-Shui <i>et al.</i> , 2009
<i>A. thaliana</i>	<i>NPR3 & NPR4</i>	INA	Hubo aumentó en nivel de transcritos de ambos	Zhang <i>et al.</i> , 2006
<i>N. glutinosa</i>	<i>NPR3</i>	SA/INA	Hubo aumentó en nivel de transcritos	Zhang <i>et al.</i> , 2010
<i>V. vinifera</i>	<i>NPR1 & NPR3</i>	BTH	Hubo aumentó en nivel de transcritos de ambos	Le Henanff <i>et al.</i> , 2009

1.5.5 ESTUDIOS BIOTECNOLÓGICOS DE *NPR1* EN PLANTAS

Varios estudios han logrado sobreexpresar *NPR1* en diferentes especies de plantas (Cuadro 1.6). Los resultados de la sobreexpresión en algodón (Parkhi *et al.*, 2010), naranja (Zhang *et al.*, 2010), zanahoria (Wally *et al.*, 2009), canola (Potlakayala *et al.*, 2007), *Arabidopsis thaliana* (Cao *et al.*, 1998), trigo (Fitzgerald *et al.*, 2004), tomate (Lin *et al.*, 2004) y manzana (Malnoy *et al.*, 2007) han permitido llegar a la conclusión de que el aumento en el número de copias de *NPR1* aumenta la resistencia a bacterias y hongos. Un caso particular de la sobreexpresión de *NPR1* en arroz, se observó un incremento en la resistencia a bacterias, sin embargo se produjo un efecto pleiotrópico, este efecto fue originado debido a los niveles constitutivamente altos de AS presentes en esta especie (Fitzgerald *et al.*, 2004; Chern *et al.*, 2005).

Cuadro 1.6. Especies de plantas donde se ha identificado la presencia de un homólogo de *NPR1* y se ha sobreexpresado para caracterizar su función en defensa ante diferentes tipos de patógenos.

Especie	Patógeno	Fuente
<i>Cotton</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	Parkhi <i>et al.</i> , 2010
<i>Citrus</i>	<i>Xanthomonas Citri</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2010
<i>D. carota L.</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria radicina</i> and <i>S. sclerotiorum</i> / <i>Erysiphe heraclei</i> , <i>Xanthomonas hortorum</i>	Wally <i>et al.</i> , 2009
<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>B. napus</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Potlakayala <i>et al.</i> , 2007
<i>A. thaliana</i>	<i>Psm ES4526</i>	Cao <i>et al.</i> , 1998
<i>O. sativa</i>	<i>X. oryzae pv oryzae</i>	Chern <i>et al.</i> , 2005
<i>S. lycopersicum</i>	<i>Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici</i> <i>Stemphylium solani</i>	Lin <i>et al.</i> , 2004
<i>Triticum sp.</i>	<i>F. graminearum</i> <i>Venturia inaequalis</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Gymnosporangium juniperi-virginianae</i>	Makandar <i>et al.</i> , 2006 Malnoy <i>et al.</i> , 2007
<i>M. pumila</i> <i>T. cacao</i>	<i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>	Shi Zi <i>et al.</i> , 2010

1.6 ESTUDIOS SOBRE MECANISMOS DE DEFENSA EN LA PALMA DE COCOTERO

1.6.1 EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS A DEFENSA EN CALLOS DE COCOTERO

Hasta el momento se han realizado algunos estudios en los cuales se han reportado la posible presencia de mecanismos de defensa en cocotero. Por ejemplo, en el primer estudio realizado, se trataron cultivos *in vitro* de cocotero (callos) con quitosano, el cual funciona como un inductor general de mecanismos de defensa. Los resultados mostraron que el tratamiento con quitosano a una concentración de 10 mg/mL resultó en un incremento en la actividad de *1,3 β-glucanasas*, las cuales son proteínas del grupo PR-2 que han sido aceptadas como parámetros inductivos de defensa en plantas. Además, se observó la acumulación de peróxido de hidrogeno, que como se sabe, su incremento es uno de los eventos que se desencadenan durante la respuesta de hipersensibilidad (figura 1.21).

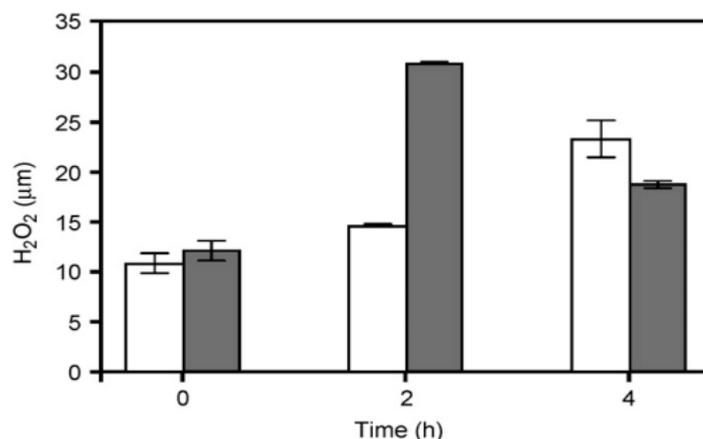


Figura 1.21. Grafica que muestra los niveles de peróxido de hidrógeno. Se observa que el nivel de peróxido de hidrógeno, fue aumentando al momento de que los callos fueron tratados con quitosano (Lizama *et al.*, 2007).

Posteriormente, la adición de quitosano modificó diferencialmente la expresión de algunos genes, cuya secuencia de DNA mostró alta similitud a receptores tipo quinasas, proteínas tipo *Verticillium* y sustitutos de oxidasa mitocondrial 1b. La adición de AS a los callos también modificó abundantemente la transcripción para estos genes, mientras que el Metil jasmonato (MeJa) no pareció influir en su expresión, lo cual, implica que el SA en callos de cocotero participa como señal en las respuestas de defensa (Lizama *et al.*, 2007).

1.6.2 INDUCCIÓN DE SAR EN PLANTAS DE COCOTERO

En un segundo estudio se evaluó la presencia de un posible mecanismo de defensa tipo SAR en plantas de cocotero y su posible activación por la hormona SA. En este estudio las plantas *in vitro* de cocotero fueron expuestas a concentraciones de 0.1 y 2.5 mM de AS y posteriormente inoculadas con el Oomiceto *P. capsici*. Los resultados mostraron que el sistema de plantas *in vitro* Cocotero-*P. capsici* (patógeno modelo) podría funcionar para evaluar mecanismos de defensa en cocotero. Las plantas *in vitro* no tratadas (figura 1.22A) y las que fueron tratadas con 1 mM de AS, desarrollaron una enfermedad tipo pudrición de cogollo con daño en hojas y tallo al ser inoculadas con el patógeno (figura 1.22B), mientras que las plantas tratadas con 2.5 mM de AS, presentaron una reducción de estos síntomas (figura 1.22C).

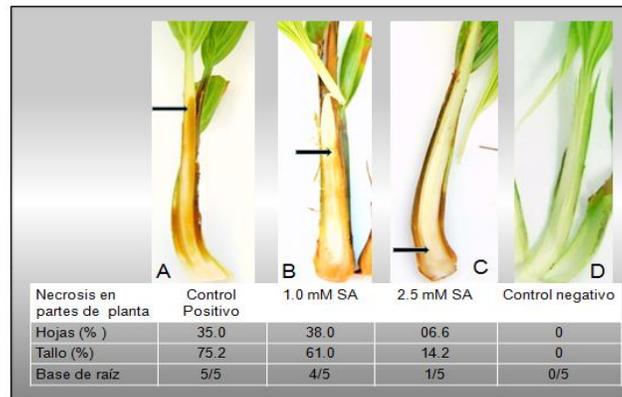


Figura 1.22. Se observa que a una concentración de 2.5 mM de AS la planta de coco sufrió menos daño después de ser inoculado con el Oomiceto patogénico *Phytophthora capsici* (Narváez, 2010. Tesis de Maestría).

Posteriormente en ese mismo estudio se comprobó la presencia de un gen homólogo de *NPR1* en el genoma de cocotero. Para esto, se empleó un par de cebadores degenerados diseñadas a partir de secuencias homologas de *NPR1* de las especies de *Arabidopsis*, tabaco, tomate, arroz y maíz (F1-AGGCAYTGGAYTCDGATGATGTTGA, R1-TCTYTHCKCATYGCAGCCAKRTGRAG). Como resultado, se obtuvo la secuencia de nucleótidos de un fragmento de aproximadamente 217 pb que presentó un 82% de identidad con el gen *NPR1* de Musa del grupo ABB del cultivar *Dongguan Dajiao*, molécula tipo RNAm (Narváez, 2010. Tesis de Maestría) (figura 1.23).

<i>C. nucifera</i>	1	-----ALDSDDELVKLLLESNTTLDANALHYAAAYCDSKVVAELEMGSANVNLNDRGYTPLHMAAMRKE-----	69
Musa ABB Group	248	DPMLEKRIKRIHRALDSDDELVKLLLESVGLDQTYALHYAAAYCDSKVVAELELDLGSANVNLKNDRGYTPHLLAAMRREPAVIVSLITKGAS	343
<i>Glycine max</i>	261	DALSLKRITRIHRALDSDDELVKLLLESITLDEANALHYAAAYCDSKVVSEVLGLANVNLNRSRGYTVLHIAAMRKEPSIIIVSLITKGAC	356
<i>Oryza sativa</i>	300	DPVHEKRVRIHRALDSDDELVKLLLESEITLDDANALHYAAAYCDSKVVSELDLRLANLNLKNSGTYALHLLAAMRREPAIIMCLLNKGA	395

Figura 1.23. Alineación múltiple de la secuencia de la proteína de NPR1 de cocotero con otras especies (banano, soya y arroz) (Narváez, 2010. Tesis de Maestría).

Por lo que, estos resultados mostraron por vez primera, que bajo las condiciones empleadas, *P. capsici* puede causar síntomas de pudrición de cogollo y además se observó una reducción del daño aplicando AS, al igual obtuvo evidencia de la presencia de un homólogo de *NPR1* en el genoma de cocotero, lo que sugiere que la SAR podría estar operando como un sistema de defensa en esta planta (Narváez, 2010. Tesis de Maestría).

1.6.3 CARACTERIZACIÓN DEL cDNA DE UN HOMÓLOGO DE LA FAMILIA DE NPR EN COCOTERO

Con el fin de darle continuidad al trabajo de investigación antes mencionado, se realizó un tercer estudio en el cual se obtuvo la secuencia del extremo 3' terminal del homólogo de *NPR1* de cocotero, que fue de 1,134 pb y tuvo un marco de lectura de 316 aminoácidos (figura 1.24). El análisis de este fragmento mostró un 84% de identidad con el gen homólogo de *NPR1* de *Mussa del grupo ABB* y 76% de identidad con *Oriza sativa* (Nic Matos, 2012. Tesis de Maestría).

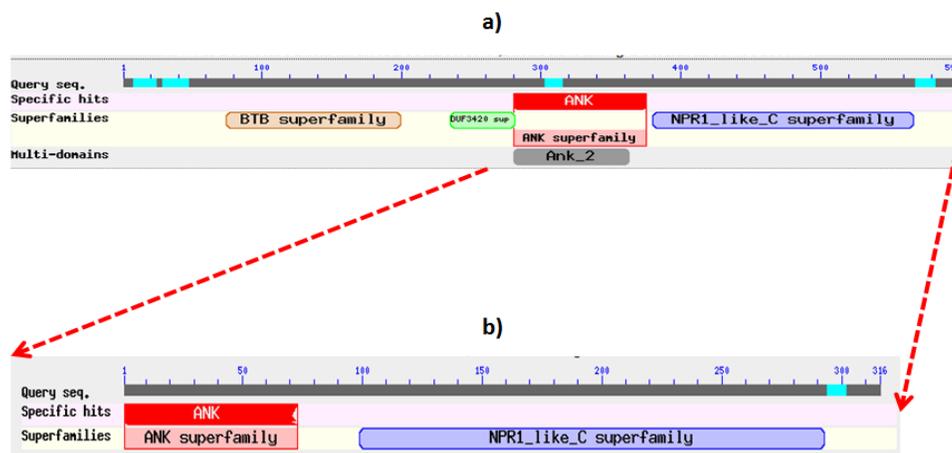


Figura 1.24. Imagen representativa que muestra el tamaño del fragmento aislado del gen tipo-CnNPR1 de cocotero, comparado con la proteína completa de NPR1. **a).** Muestra los dominios conservados de la proteína NPR1 completa. **b).** Muestra el fragmento aislado de la proteína homólogo de NPR1 de cocotero (Nic Matos, 2012. Tesis de Maestría).

Posteriormente el análisis filogenético realizado a esta nueva secuencia de aminoácidos de cocotero, presentó homología con NPR3 y NPR4 de *Arabidopsis thaliana* (figura 1.25). Por lo tanto, esta nueva secuencia es un homólogo de NPR1. De acuerdo a la literatura, esta proteína podría estar actuando como un regulador negativo de SAR en la palma de cocotero (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo, Fu y colaboradores, encontraron que ambas proteínas homologas de NPR1 (NPR3 y NPR4), funcionan como receptores de la molécula de ácido salicílico, regulando a la proteína NPR1 y activando de esta manera la respuesta inmune de la planta de *Arabidopsis thaliana* (Fu *et al.*, 2012). De acuerdo a la

homología mostrada con NPR3 y NPR4 de *A. thaliana*, es posible que la palma de cocotero también posea una familia génica de NPR's.

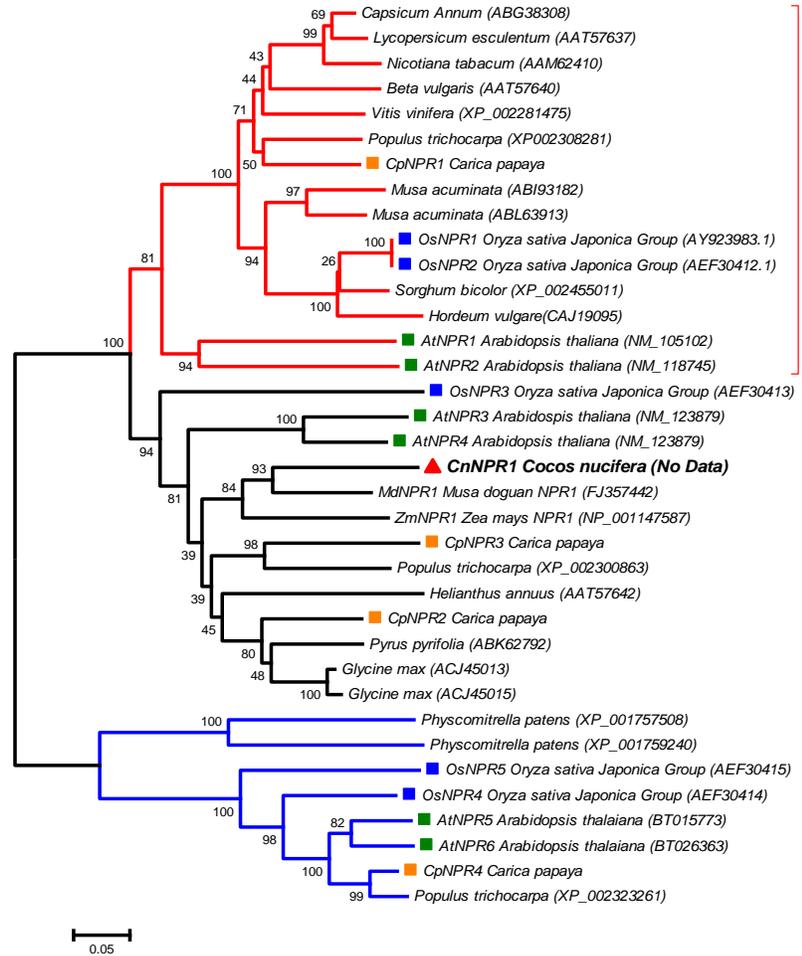


Figura 1.25. Árbol filogenético Neighbor-Joining, realizado con 35 secuencias homólogas de NPR1 de diferentes especies de plantas. Secuencias homólogas de NPR1 de arroz, *Arabidopsis thaliana* papaya son señaladas en Cuadros azules, verdes y naranjas, respectivamente. También se observa el nombre de las especies y el número de accesión para las otras secuencias homólogas de NPR1. Se señala en letra negra y en triángulo rojo la secuencia tipo NPR1 aislada de la palma de cocotero. El número en los clados indica el porcentaje obtenido del análisis con un Bootstrap de 1000 réplicas.

1.7 JUSTIFICACIÓN

El presente estudio se enfocará en clonar y caracterizar el cDNA de secuencias de genes homólogos a *NPR1* en cocotero, *NPR1* es considerado el regulador clave en la respuesta de defensa SAR, una respuesta de larga duración y de amplio espectro contra patógenos. Diversos estudios concluyen, que la expresión de *NPR1* es regulada por la fitohormona ácido salicílico, hormona que participa en la regulación de los mecanismos de defensa contra patógenos. El cocotero es un cultivo que es atacado por una amplia variedad de patógenos, principalmente por fitoplasmas, por tanto, el presente estudio permitirá conocer si la palma de cocotero posee algún gen homólogo clave involucrado en la ruta de activación de la respuesta de defensa SAR y si estos son activados por la fitohormona ácido salicílico.

1.8 HIPÓTESIS

El genoma de cocotero posee genes homólogos a la familia de NPR, los cuales modifican su expresión ante la presencia de la hormona ácido salicílico.

1.9 OBJETIVO GENERAL

1. Clonar y caracterizar *in silico* la secuencia completa de cDNA de genes homólogos a la familia de NPR en cocotero.
2. Caracterizar el nivel de expresión de los genes homólogos a *NPR1*, en tejidos de plántulas *in vitro* de cocotereros previamente tratados con ácido salicílico.

1.9.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Amplificar y caracterizar molecularmente el extremo 5'-terminal del cDNA de *CnNPR3*.
- 2) Amplificar y caracterizar el DNA y cDNA de cocotero, empleando cebadores degenerados para la búsqueda del ortólogo de *NPR1*.
- 3) Amplificar y caracterizar molecularmente los extremos 5'-3' terminales del cDNA del ortólogo de *NPR1* en cocotero.
- 4) Clonar y caracterizar *in silico* la secuencia completa de DNA y cDNA de los genes homólogos de *NPR1* en cocotero.

- 5) Diseñar sondas TaqMan para el estudio de expresión de los genes homólogos a *NPR1* en cocotero.
- 6) Determinar el nivel de expresión de los genes homólogos a *NPR1* en plántulas de cocotero previamente tratadas con ácido salicílico.

1.10 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

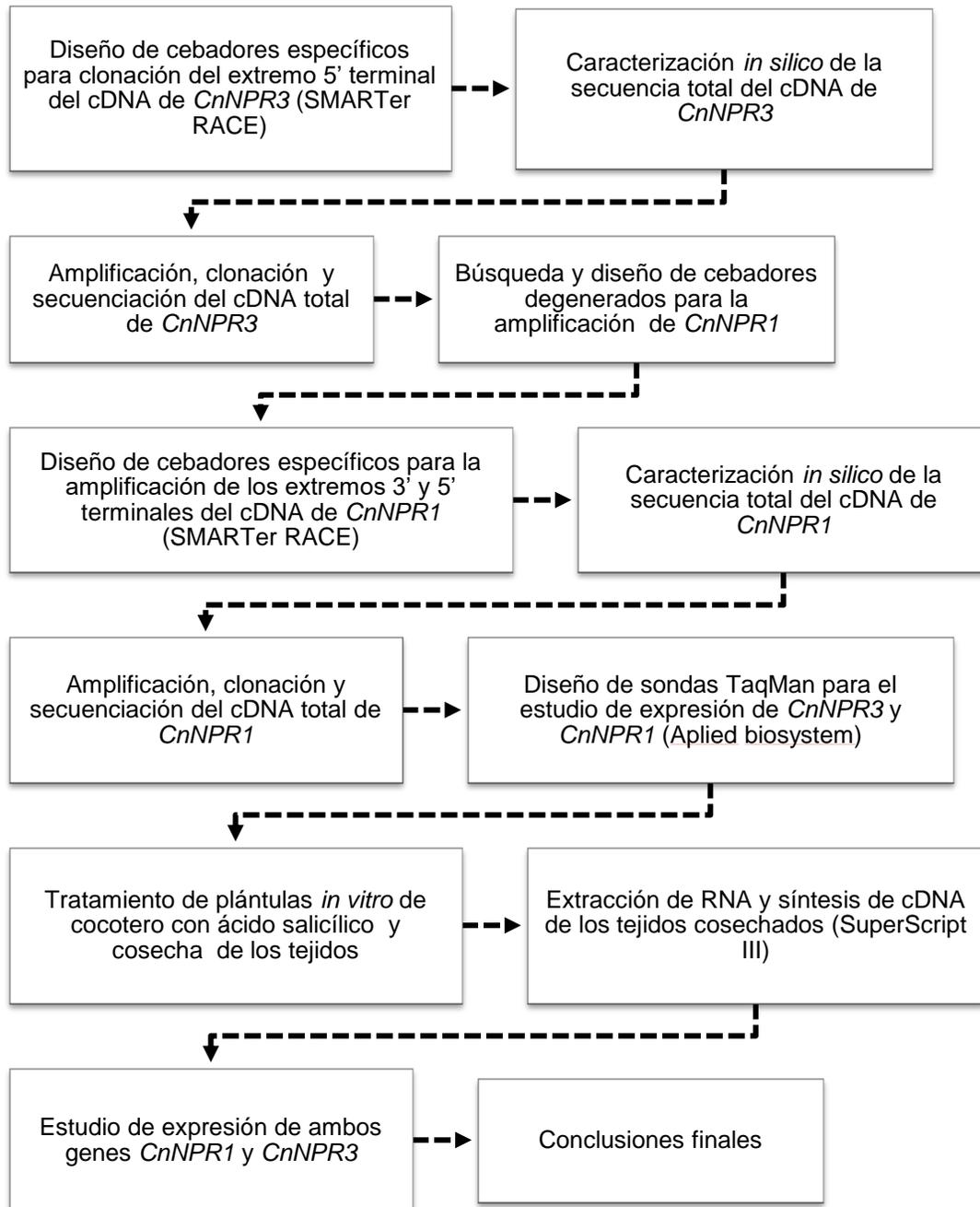


Figura 1.27. Diagrama general que muestra cada uno de las actividades a realizar durante todo el trabajo.

CAPÍTULO II

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL EXTREMO 5' TERMINAL DEL cDNA DE *CnNPR3* EN LA PALMA DE COCOTERO

2.1 INTRODUCCIÓN

El cocotero, es un cultivo tropical que es atacado por una amplia gama de microorganismos patogénicos, principalmente por fitoplasmas, y a la fecha, poco se ha hecho por conocer y entender los mecanismos de defensa con los que cuenta este cultivo. Existen ciertos ecotipos que han mostrado cierta resistencia ante el taque de patógenos, en especial a los fitoplasmas, sin embargo, se desconoce si algún mecanismo de defensa se esté activando para combatir estos microorganismos patogénicos (Zizumbo *et al.*, 2008). Molecularmente, en callos de cocotero, se ha logrado observar la activación de ciertos genes involucrados en la respuesta de defensa, mediante la aplicación de un compuesto inductor (quitosano), emulando el ataque por patógenos (Lizama *et al.*, 2007). También se han logrado determinar la presencia de ciertos genes de resistencia (*R*) en el genoma de cocotero, y su expresión se ve regulada por la fitohormona ácido salicílico (AS), una hormona que participa en la ruta de activación de mecanismos de defensa contra patógenos en plantas (Puch-Hau *et al.*, 2015).

Uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas es la resistencia sistémica adquirida (SAR), que es una respuesta de larga duración y de amplio espectro contra varios patógenos (Durrant y Dong, 2004). La activación del mecanismo de defensa SAR, está ampliamente relacionado con el aumento en la concentración de la fitohormona ácido salicílico (AS), la cual activa una ruta de señalización para la expresión de genes relacionados con patogénesis (*PR*'s). NPR1 (non-expresor de genes *PR-1*), es un gen considerado como un regulador clave para la activación de SAR, y se activa en presencia de AS (Cao *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1998). NPR1 interacciona con factores de transcripción de tipo TGA y activa la transcripción de genes relacionados a

patogénesis (*PR-1*) (Durrant and Dong, 2004; Liu *et al.*, 2005; Pieterse y Van Loon, 2004; Kinkema *et al.*, 2000).

NPR1 forma parte de una gran familia génica en *Arabidopsis thaliana* y otros cultivos. La familia de NPR en *Arabidopsis*, consta de otros 5 homólogos, *NPR2*, *NPR3*, *NPR4*, *NPR5* (*BOP2*, Blade-On-Petiole-2) y *NPR6* (*BOP1*, Blade-On-Petiole-1). Estructuralmente son muy similares, poseen un dominio conservado BTB/POZ y un dominio repetido de ANKIRINA. Cuentan también con un sitio de localización nuclear (NLS), con excepción de *NPR5* y *NPR6*, que se activa y dirige a la proteína al núcleo para interactuar con otras proteínas. Poseen residuos de cisteína (Cys) conservados involucrados en el mecanismo de control redox (Kinkema *et al.*, 2000). A pesar de estas similitudes, poseen ciertas diferencias entre ellas. *NPR1-NPR4*, poseen 4 exones en su secuencia genómica y codifican proteínas con tamaños similares (574-600 aminoácidos), mientras que *NPR5* y *NPR6*, poseen solo 2 exones y codifican proteínas que son significativamente más pequeños comparados con los que codifican *NPR1* a *NPR4*.

Evidencias recientes muestran que es posible que el cocotero posea un mecanismo de defensa tipo SAR. En un estudio previo, inocularon plántulas de cocotero con el patógeno *Phytophthora capsici* que previamente habían sido tratadas con AS. Se observó, que las plántulas tratadas presentaron síntomas menos severos a comparación con las que no fueron tratadas con AS. Posteriormente, empleando cebadores degenerados diseñados de secuencias consenso de *NPR1*, se logró clonar un fragmento de DNA del genoma de cocotero que presentó identidad con secuencias de *NPR1* (Narváez *et al.*, 2010. Datos no publicados). Sin embargo, debido al tamaño del fragmento de DNA previamente clonado, fue difícil caracterizarlo molecularmente. Posteriormente, en un segundo trabajo se logró aislar el extremo 3' terminal de la secuencia del cDNA de este fragmento inicial de DNA. Los análisis bioinformáticos posteriores, determinaron que esta nueva secuencia de cocotero presentó homología con *NPR3* y *NPR4* de *Arabidopsis* (Nic-Matos *et al.*, 2012. Datos no publicados).

En los últimos años se han realizado diversos estudios para dilucidar la funcionalidad de cada uno de los miembros homólogos de la familia de NPR (Cao *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2012 y Mckim *et al.*, 2008). Respecto a *NPR1* y sus ortólogos, se ha observado que su sobreexpresión en diferentes cultivos de plantas es capaz de aumentar

la resistencia contra varios tipos de patógenos (Cao *et al.*, 1998; Chern *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2004; Fitzgerald *et al.*, 2004; Chern *et al.*, 2005; Makandar *et al.*, 2006; Malnoy *et al.*, 2007; Potlakayala *et al.*, 2007; Le Henanff *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010; Dutt *et al.*, 2015). A pesar de que NPR3 y NPR4 muestran resultados contradictorios, se sugiere que ambos genes participan en la ruta de activación de las respuestas de defensa en plantas (Liu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha demostrado que ambos funcionan como receptores de SA mediando la degradación de NPR1 regulando así la respuesta de inmune en plantas (Fu *et al.*, 2012). NPR5 (BOP2) y NPR6 (BOP1) poseen papeles funcionalmente redundantes en el control del desarrollo de órganos y simetría de hojas y flores (Hepworth *et al.*, 2005; Norberg *et al.*, 2005; McKim *et al.*, 2008; Jun *et al.*, 2010). Sin embargo, un estudio reciente determinó que ambos genes (BOP1 y BOP2), son inducidos por metil jasmonato y participan de alguna manera en la respuesta de defensa contra patógenos (Canet *et al.*, 2012).

En base a los antecedentes antes mencionados y debido al papel importante que juega *NPR1* y sus homólogos en la respuesta de defensa SAR contra el ataque de patógenos en plantas, el objetivo de este capítulo fue la amplificación del extremos 5' terminal y la caracterización molecular del cDNA de *CnNPR3* en la palma de cocotero. El hecho de no contar con la secuencia del genoma de cocotero, ha sido un factor limitante para estudiar genes claves que regulan directamente la ruta de señalización de los mecanismos de defensa de este cultivo. Por otro lado, saber que la palma de cocotero posee genes que son claves para la ruta de activación de algún mecanismo de defensa contra patógenos (SAR, en este caso) contribuye grandemente al conocimiento básico, de cómo estos mecanismos actúan en cocotero ante el ataque de patógenos y abre una ventana de posibilidades para que en un futuro se pueda realizar mejoramiento genético en el cultivo.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La clonación de ambos extremos 5' y 3' terminal del CDNA de *CnNPR3* en la palma de cocotero, fueron realizados empleando el kit comercial SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech).

2.2.1 DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 5' TERMINAL DEL CDNA DE *CnNPR3*

El cebadores específicos fueron diseñados a partir de la secuencia de nucleótidos previamente clonada de *CnNPR3* (Nic-Matos, 2012. Tesis de maestría). El diseño se realizó con el programa OligoPerfect™ Designer (Invitrogen), tomando en cuenta los parámetros sugeridos en el manual del SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech).

- Tener un tamaño de entre 23-28 pb.
- Tener un porcentaje de GC de 50-70%
- Tener una Temperatura de hibridación (T_m) de 65-70°C
- No ser complementario con el cebador del 3' terminal.
- Ser específico para el gen de interés.

Posteriormente, las secuencias de los cebadores fueron analizados con el programa Oligo-Analyzer (V.1.0.2), para verificar que cumplan con los parámetros antes mencionados.

2.2.2 EXTRACCIÓN DE RNA

El RNA se extrajo pulverizando 0.5 g de tejido de hoja (con N_2) en un mortero previamente esterilizado (RNAsaway). Luego se adicionó 2.5 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 β -*mercaptoetanol* (1 μ L/mL) calentado previamente a 65°C. Posteriormente, 1 mL de la mezcla (tejido y buffer) fue transferido a un tubo Eppendorf de 2 mL e incubado a 65°C por 10 minutos. Se adicionó 1 mL de la mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 14,000 RPM durante 5 minutos, luego el sobrenadante fue recuperado en un tubo nuevo de Eppendorf de 2 mL y se agregó 800 μ L de isopropanol (-20°C) + 100 μ L de

acetato de sodio (3 M) al sobrenadante y se incubó a -20°C por 1 hora. Después, el sobrenadante se transfirió a unas columnas llamadas RNAspin Mini Colum (Kit RNAspin Mini) y centrifugado a 10,000 RPM por 1 minuto. El filtrado fue desechando. Luego, se adicionaron 350 µL del buffer MDB (provisto por el kit) se centrifó nuevamente a 10,000 RPM por 1 minuto y se desechó el filtrado. Posteriormente, se le aplicaron 95 µL de una mezcla de DNasa I (provisto por el kit) a la columna y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Luego para inactivar la enzima, se le agregaron a la columna 200 µL de buffer RA2 junto con 600 µL del buffer RA3 y se centrifugó durante 1 minuto a 10,000 RPM el filtrado fue desechado. Se lavó con 250 µL de buffer RA3 nuevamente pero esta vez centrifugando a 10,000 RPM por 2 minutos. Posteriormente, la columna fue transferida a un tubo nuevo Eppendorf de 1.5 mL y el RNA fue eluído aplicando 30 µL agua libre de nucleasas al centro de la columna y centrifugando a 13,000 rpm durante 1 minuto. Finalmente la integridad del RNA fue observada en un gel de agarosa al 1.5 % en una cámara electroforética a 95V y 175A.

2.2.3 SÍNTESIS DE cDNA PARA AMPLIFICAR EL EXTREMO 5' TERMINAL DE *CnNPR3*

El CDNA se sintetizó a partir de 1 µg de RNA total empleando la transcriptasa reversa provista por el Kit de SMARTer RACE (SMARTScribe™ Reverse Transcriptase). La síntesis del CDNA se realizó de acuerdo a al protocolo provisto por el manual del SMARTer™ RACE (Clontech), empleando adaptadores de acuerdo a al extremo que se pretende amplificar. Para la síntesis del cDNA del extremo 5' terminal, se usaron los adaptadores: SMARTer IIA Oligonucleotide y el 5'-RACE CDS Primer A.

2.2.4 AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 5' TERMINAL DE *CnNPR3* DE COCOTERO

La amplificación del extremo 5' terminal de *CnNPR3* se realizó empleado los cebadores específicos previamente diseñados. Las reacciones de amplificación se hicieron con la enzima Mango Taq™ ADN Polymerase (BIOLINE). El volumen y la concentración total de los reactivos usados durante las reacciones de amplificación se especifican a continuación (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Volumen y concentración de los reactivos empleados para la mezcla de reacción de amplificación del extremo 5' terminal del homólogo de *NPR1* de cocotero.

Reactivos	Volumen
cDNA	3 µL
5X Buffer (-MgCl ₂)	5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1 µL
Mezcla de dNTPs (10 mM)	0.5 µL
Universal Primer Mix (UPM 10 µM)	2.5 µL
Gene Specific Primer (10 pMol)	2.5µL
Mango Taq ADN Polymerase (5 U/µL)	0.5 µL
Agua estéril	10 µL
Volumen Total	25 µL

Posterior a la mezcla de reacción, se procedió con las condiciones de amplificación del extremo 5' terminal de *CnNPR3*. Durante la amplificación se probaron varios programas de temperatura. Posteriormente, se probaron diferentes temperaturas de hibridación (68, 66, 64 y 62°C) hasta encontrar la adecuada. A continuación, se presenta el programa con el cual se logró amplificar correctamente el extremo 5' terminal del gen *CnNPR3* (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Condiciones de temperatura empleados para la amplificación del extremo 5' terminal de *CnNPR3* de cocotero. En sombra negra, las diferentes temperaturas de hibridación que fueron probadas.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	2 minutos	1
94	30 segundos	5
72	3 minutos	
94	30 segundos	
70	30 segundos	5
72	3 minutos	
94	30 segundos	
	30 segundos	28
72	3 minutos	
72	10 minutos	1

2.2.5 CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Los productos amplificados fueron purificados con el kit QIAquick (QIAGEN) y posteriormente ligados al vector de clonación pGEM-T-Easy (Promega) de acuerdo a las instrucciones del proveedor (figura 2.1). Seguidamente, fueron clonados en *Escherichia*

coli y crecidas sobre medio LB, empleando el antibiótico ampicilina (100 mg/L) como agente selectivo de colonias transformadas. Se seleccionaron las colonias transformadas y se crecieron en medio LB líquido por 16 h. A continuación, se realizó una PCR empleando los cebadores universales denominados M13 (sentido y antisentido), para amplificar la región múltiple de clonación del vector pGEM-T-Easy, con la finalidad de confirmar la presencia del producto amplificado del extremo 5' terminal de *CnNPR3*.

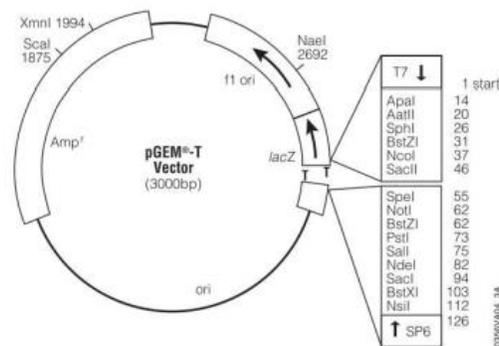


Figura 2.1. Imagen representativa que muestra los principales puntos de referencia del vector de clonación pGEM-T Easy.

Por último, se extrajo el plásmido mediante el kit comercial MiniPrep QIAprep (QIAGEN). El plásmido extraído se visualizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y cuantificado con la ayuda del marcador de masas HighMass (Invitrogen). El proceso de secuenciación fue realizado por la compañía Davis Sequencing (Universidad de Davis en California).

2.2.6 ANÁLISIS *IN SILICO* DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS

El fragmento clonado fue analizado con el programa BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para determinar la identidad con secuencias homólogas a NPR1. El marco de lectura abierto se obtuvo con el programa bioinformático TRASLATE de BIOTOOL-Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>). Posteriormente la secuencia de aminoácidos fue analizado con el programa BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con el fin de determinar el porcentaje de homología con secuencias homólogas de NPR1, caracterizadas y reportadas en la base de datos del GeneBank.

2.2.7 EMPALME DE LOS EXTREMOS 3' Y 5' TERMINALES DE *CnNPR3* DE COCOTERO

Posterior a los análisis correspondientes de identidad, se procedió a realizar el empalme de ambos extremos, teniendo como punto de unión los cebadores sentido y antisentido (Forward y Reverso) empleados para la amplificación de ambos extremos. Para el extremo 3' terminal, se empleó el cebador sentido y para el extremo 5' el antisentido. El empalme de estas secuencias fue para determinar el tamaño aproximado de la secuencia de nucleótidos y el marco de lectura abierto para este nuevo gen. En base al tamaño aproximado de la secuencia de nucleótidos de *CnNPR3*, se diseñaron cebadores para intentar aislar el cDNA total del *CnNPR3*. Estos cebadores fueron diseñados para amplificar el marco de lectura abierto del cDNA de *CnNPR3*. Posteriormente, estos mismos cebadores fueron empleados para amplificar el DNA genómico.

2.2.8 MATRIZ DE IDENTIDAD DE LA NUEVA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE COCOTERO

Luego de amplificar la secuencia del cDNA de *CnNPR3*, se procedió con el análisis *in silico*. Para ello se inició con una matriz de identidad comparando la secuencia de aminoácidos de *CnNPR3* de cocotero con los miembros de la familia de NPR de *A. thaliana*, *C. papaya* y *O. sativa*. Esto con la finalidad de determinar con cuál de ellos mostraba mayor identidad nuestra nueva secuencia. Para este análisis se contempló únicamente la secuencia que va del dominio BTB/POZ al dominio de ANKIRINA.

2.2.9 ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA CON PROTEÍNAS HOMÓLOGAS DE NPR1

La secuencia de aminoácidos de *CnNPR3* se alineó con secuencias homólogas de NPR1 de las especies de *Arabidopsis thaliana*(AtNPR1, AtNPR3), *Elais guinensis* (EgNPR3) y *Phoenix dactylifera* (PdNPR3) extraídas de la base de datos del GeneBank, con el fin de caracterizar los dominios conservados de la proteína *CnNPR3*. El alineamiento fue realizado con el programa CLUSTALW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) y posteriormente las partes conservadas fueron sombreadas con el programa BOXSHADE (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

2.2.10 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LA NUEVA SECUENCIA DE COCOTERO

El análisis filogenético fue realizado empleando 15 secuencias homólogas de NPR1 de diferentes especies de plantas. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) y un análisis de bootstrap con 1000 réplicas. Este análisis filogenético fue realizado utilizando el software MEGA v. 5.0 y se emplearon las secuencias de aminoácidos de las familias de proteínas homólogas de NPR1 de *Arabidopsis thaliana* (seis miembros) y *O. sativa* (cinco miembros).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 CEBADORES DISEÑADOS

Se logró diseñar 2 cebadores para el aislamiento del extremo 5' terminal del gen *CnNPR3* de cocotero, los cuales presentaron las siguientes características (ver Cuadro 2.3):

Cuadro 2.3. Características de los cebadores empleados para el aislamiento del extremo 5' terminal del gen *CnNPR3* de cocotero.

Cebador	Secuencia	Tamaño	Tm (°C)	%GC	ES
CnNPR3-A	GGAATCACAGTAGGCAGCTGCATAGTG	27 pb	68	52	No
CnNPR3-B	GCTCTTTGGAATCACAGTAGGCAGCTGC	28 pb	68	50	No

Tm. Temperatura de hibridación; **%GC.** Porcentaje de los nucleótidos GC; **ES.** Estructuras secundarias.

Estos cebadores se encuentran ubicados dentro del extremo 3' terminal (ver figura 2.2). El cebador A se encuentra ubicado al inicio de la secuencia conocida y el cebador B, fue diseñado unas bases después del cebador A. Debido a esto, se consideró emplear el cebador B para la primera reacción de amplificación y al cebador A, para una segunda reamplificación de ser necesario (figura 2.2).

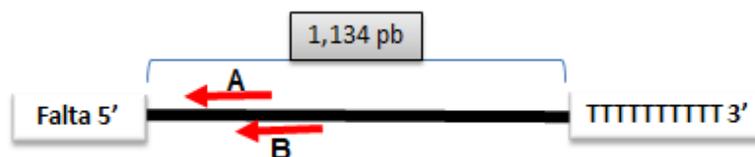


Figura 2.2. Esquema representativo de la posición de los cebadores empleados durante las reacciones de amplificación del extremo 5' terminal del gen *CnNPR3*.

2.3.2 RNA EXTRAÍDO Y cDNA SINTETIZADO

El RNA extraído para la síntesis de cDNA fue de buena calidad, en la imagen, se observan claramente las subunidades 28S y 18S ribosomales. No hubo contaminación por ADN, por lo que se procedió con la síntesis de CDNA (Figura 2.3).

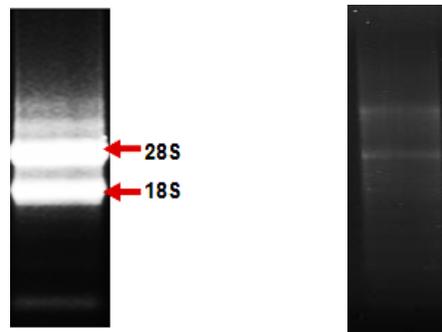


Figura 2.3. Imagen representativa de una muestra de RNA y cDNA fraccionado en un gel de agarosa 1%.

2.3.3 PRODUCTOS AMPLIFICADOS DEL EXTREMO 5' TERMINAL DEL CDNA DE *CnNPR3*

De las cuatro temperaturas hibridación probadas para los cebadores A y B (62, 64, 66 y 68°C), sólo el cebador A, presentó un mejor producto amplificado a 62°C (figura 2.4), mientras que el cebador B no presentó ningún producto amplificado (dato no mostrado).

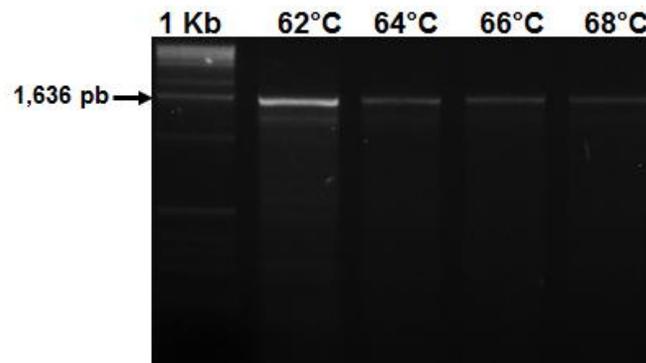


Figura 2.4. Imagen representativa que muestra los diferentes productos amplificados con el cebador A, bajo las diferentes temperaturas de hibridación.

2.3.4 SECUENCIA DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS DEL EXTREMO 5' TERMINAL

El tamaño de la secuencia del producto amplificado del extremo 5' terminal del gen *CnNPR3* de cocotero, fue de 1,072 pb y presentó un marco de lectura abierto de 307 aminoácidos (ver Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4. Se observan, tanto la secuencia total de nucleótidos como la de aminoácidos del extremo 5' terminal aislado. En sombreado negro se observa la secuencia del cebador empleado para el aislamiento de este extremo.

Secuencia de nucleótidos	
3'	GGAATCACAGTAGGCAGCTGCATAGTG TGTAGCATTGGCATCATCTAAAGTGATGTCTGATTCACTAAG AAGCAACTTCACAAGTTCAACATCATCAGAATCCAGGGCCCTATGGATTCTTCTAATTCTTTTCTCATGTA CAGGGTCTACAATCAAGGAATTTGGTTCATCGGGCTGGGCTTTGAGGCGGATCGATTTAATCTCCTCAGCA ACTTCATGCGGCAGCTCCTTCTCAAGAGAGATATTGTCCAGATCAGATCTTGCTACCCTTTTGATACAGTG ACTAAGTAAGTTGATAAGGCGACGCTGCAAAAGAGAGACCAACTCTGGAATCTGAAACACAGACGACGCA TACAACAACCTCCACCACGAAAGTGATCGCAGGCCGGCAAGCATCATGAGCGCACATCGGATCCACACACAC CGACACCTCCGGCGGAGCCGGCTTCAGCTTCCCAGTGTAATAAGCTCAAGAAATTCATGAAGGCCTCGC GCCCGACCCGGCCGTGCGGCACCAATTCACTCATCTCGTACCTCGGCTTCCCTCCCTCCTGCCGACATCCA CCACCGGCGCCGGCGCCGGGAGAGGTCGTGAAAGAACCGGCTCCTCGCCGCCAGGATGCAGCG GTGGACGCCGACCCGGGCGCCCTCGACGACGATCTCGGCATCGCTGCAGTCGAATTCGGAGTGGAGGAGGA GGCGCTCGAGGTTGGAGCTCAGCTTGCCAAGGCTCACACCTCGAGGTTGCCCCCGGCTCGTTGGCCGG GCGCCGACGGGCAGGGCGGGTGGCCGGGCGAAGAAGCGGGAGGGGGGAGCGGGCATAGACGCTTGTGCCAT TGGAGAGGTTAGAAGGAGGAGGTGGACGCTTCAGAGAAGAGAGGGCTCCCGCTAGATTGGGCCCATGCAAC CAGACACGGCCCAACAAGAGGAAGAACCTAGGCAAGAAGCTGCTTATGATCCCGATCGGCCATAGGTTCTTC CCTTAAGGA 5'
Secuencia de aminoácidos	
	M A Q A S M P A P P S R F F A R P P A L P V G A R P T R P G G N L E V V S L G K L S S N L E R L L L H S E F D C S D A E I V V E G A P V G V H R C I L A A R S R F F H D L F S G A G A G A G G G C R Q E G G K P R Y E M S E L V P H G R V G R E A F M N F L S Y L Y T G K L K P A P P E V S V C V D P M C A H D A C R P A I T F V V E L L Y A S S V F Q I P E L V S L L Q R R L L N F V E K A L V E D V I P I L L V A V H S Q L N Q L L S H C I K R V A R S D L D N I S L E K E L P H E V A E E I K S I R L K A Q P D E P N S L I V D P V H E K R I R R I H R A L D S D D V E L V K L L L S E S D I T L D D A N A T H Y A A A Y C D S

2.3.5 SECUENCIA TOTAL DEL cDNA DE *CnNPR3* DE COCOTERO

El tamaño aproximado del cDNA de *CnNPR3* de acuerdo al empalme de ambos extremos terminales fue de 2,184 pb, teniendo como punto de unión de ambos extremos la secuencia de los cebadores usados para su amplificación (Ver Cuadro 2.5. Sombreado en

rojo). Los cebadores diseñados para la amplificación del cDNA total, amplificaban el inicio y el final del marco de lectura abierto de CnNPR3 (sombreados en gris).

Cuadro 2.5. Secuencia total de nucleótidos del CDNA del gen *CnNPR3* de cocotero. La parte sombreada, representa el sitio de unión de los dos extremos clonados (cebadores sentido y antisentido). El sombreado verde, representa la posición donde inicia el marco de lectura abierto y el sombreado rojo el final.

Secuencia de nucleótidos
<p>TCCTTAAGGGAAGAACCTATGGCCGATCGGGATCATAAGCAGTTCTTGCCTAGGTTCTTCTCTTGTGGG CCGTGTCTGGTTGCATGGGCCCAATCTAGCGGGAGCCCTCTCTTCTCTGAAGCGTCCACCTCCTCCTTCTA ACCTCTCCAATCGCACAAAGCGTCTATGCCCGCTCCCCCTCCCGCTTCTTCGCCCCGGCCACCCGCCCTGCC CGTCGGCGCCCCGGCCAACGAGGCCGGGGGCAACCTCGAGGTGGTGGAGCCTTGGCAAGCTGAGCTCCAACC TCGAGCGCCTCCTCCTCCACTCCGAATTCGACTGCAGCGATGCCGAGATCGTTCGTCGAGGGCGCCCCGGTC GGCGTCCACCGCTGCATCCTGGCGGCGAGGAGCCGGTTCTTTTACGACCTCTTCTCCGGCGCCGGCGCCGG CGCCGGTGGTGGATGTCGGCAGGAGGGAGGGAAGCCGAGGTACGAGATGAGTGAATTGGTGCCGCACGGCC GGGTGGGGCGGAGGCCCTTCATGAATTTCTTGAGCTATTTGTACACTGGGAAGCTGAAGCCGGCTCCGCCG GAGGTGTCGGTGTGTGGATCCGATGTGCGCTCATGATGCTTGCCGGCCTGCGATCACTTTCTGGTGGGA GTTGTGTATGCGTCGTCTGTGTTTCAGATTCCAGAGTTGGTCTCTCTTTTGCAGCGTCGCCTTCTCAACT TTGTTGAGAAGGCTCTTGTGGAAGATGTAATCCCTATCCTTCTGGTTGCGGTACACTCACAACCTTAATCAG TTACTTAGTCACTGTATCAAAAGGGTAGCAAGATCTGATCTGGACAATATCTCTCTTGAAGAAGGAGCTGCC GCATGAAGTTGCTGAGGAGATTAAATCGATCCGCCTCAAAGCCCAGCCCGATGAACCAAATTCCTTGATTG TAGACCCTGTACATGAGAAAAGAATTAGAAGAATCCATAGGGCCCTGGATTCTGATGATGTTGAACCTTGTG AAGTTGCTTCTTAGTGAATCAGACATCACTTTAGATGATGCCAATGCTACACACTATGCAGCTGCCTACTG TGATTCCAAAGTTGTAGCAGAGTTGTTAGAAGTGGGGTCACTAATGTGAATCTGAAGAATCATAGAGGAT ACACACCCCTCCATTTAGCTGCCATGAGAAGGGAGCCAGCTATTATTGTTTCTTCTTCCACAAAGGTGCT TCTGCATCAGAAACAACATCTGATGGGCAGAGTGCTGTTATGATTTGTAGGAGGCTAACAAAGGGCAAAAAGA TTATAATACAAAGACTCAGCAGTGTCAAGAGTCAAATAAAGACCGGATATGCATTGACATTCTAGAGAGAG AGATGCGGAGGAATCCCATGGCTGTGGAAGACTCGGTACATCACCGTTATTAGCTGATGACCTTCAAATG AAGCTTCTGTACCTGGAAAACAGAGTTGCATTTGCGAGATTATTCTTCCCTGCTGAAGCCAAGGTAGCCAT GGAATTTGCACAAGCAGAGACAACATCAGAATTCAGAGTCTTTTGGACATCAAGGAGCTCAAGTAACCTGA GGGAGGTTGATCTGAATGAGACACCTACAATGCAGAACAACCGGCTACGTTTCGAGGGTTGATGCCCTTGTG AAAACAGTGGAGCTGGGCAGGCGCTATTTCCACATTGTTTACAAGTTTTGGATAAGTTTTCTCGAAGAAGA CTTGCACGATCTGTTCTACCTTCAGAAGGGAACACCCGATGAGCAAAAGATCAAGCGGATGCGTTTCTGCG AGTTAAAGGAGGATGTTGCAAGGCCTTCAACCAGGACAAGGCTGATAGCGTCCGCTCGGGGCTGTCTTCA TCATCATCATCATCCTCCTCATTGAAGGGTGATAACAAGGCATTCCAAGGCTGTAATGAAGTTGTAGAGTT ATTGTGGTACATGTATTATAGATAGATGCTACATGAGGTGATATTAGCTGCCTGAAATCTAAACCATCAGG AGAGGCTGCACATCAGAGTAGTTGCTTTTTTTTCGTGCTGCAGAACGATGTCATGAGTGTGTTTCTTGGCT CTCTCTCTCTCTCTATTCTTGGCCTTCCAGCATAACAGAAGTGGAGCATGCTCTCAAAAAAAAAAAAAATA AGAAAAACCCCTTGTTCAATTGCCGTTACGTAGCGAATCGAATTCCTCGCGGACGC</p>

Posteriormente, la secuencia de nucleótidos, presentó seis posibles marcos de lectura, pero sólo uno de ellos tuvo un marco de lectura abierto de 596 aminoácidos (Ver Cuadro 2.6).

Cuadro 2.6. Secuencia total de aminoácidos del marco de lectura abierto presentado por CnNPR3 de cocotero.

Secuencia de aminoácidos	
M	A
Q	A
S	M
P	A
P	P
S	R
F	F
A	R
P	P
A	L
P	V
G	A
R	P
T	R
P	G
G	N
L	E
V	V
S	L
G	K
L	S
S	N
L	E
R	L
L	L
H	S
E	F
D	C
S	D
A	E
I	V
V	E
G	A
P	V
G	V
H	R
C	I
L	A
A	R
S	R
F	F
H	D
L	F
S	G
A	G
A	G
A	G
G	G
C	R
Q	E
G	G
K	P
R	Y
E	M
S	E
L	V
P	H
G	R
V	G
R	E
A	F
M	N
F	L
S	Y
L	Y
T	G
K	L
K	P
A	P
P	E
V	S
V	C
V	D
P	M
C	A
H	D
A	C
R	P
A	I
T	F
V	V
E	L
L	Y
A	S
S	V
F	Q
I	P
E	L
V	S
L	L
Q	R
R	L
L	N
F	V
E	K
A	L
V	E
D	V
I	P
I	L
L	V
A	V
H	S
Q	L
N	Q
L	L
S	H
C	I
K	R
V	A
R	S
D	L
D	N
I	S
L	E
K	E
L	P
H	E
V	A
E	E
I	K
S	I
R	L
K	A
Q	P
D	E
P	N
S	L
I	V
D	P
V	H
E	K
R	I
R	R
I	H
R	A
L	D
S	D
D	V
E	L
V	K
L	L
L	S
E	S
D	I
T	L
D	D
A	N
A	T
H	Y
A	A
A	Y
C	D
S	K
V	V
A	E
L	L
E	L
G	S
S	N
V	N
L	K
N	H
R	G
Y	T
P	L
H	L
A	A
M	R
R	E
P	A
I	I
V	S
L	L
T	K
G	A
S	A
S	E
T	T
S	D
G	Q
S	A
V	M
I	C
R	R
L	T
R	A
K	D
Y	N
T	K
T	Q
Q	C
Q	E
S	N
K	D
R	I
C	I
D	I
L	E
R	E
M	R
R	N
P	M
A	V
E	D
S	V
T	S
P	L
L	A
D	D
L	Q
M	K
L	L
Y	L
E	N
R	V
A	F
A	R
L	F
F	P
A	E
A	K
V	A
M	E
I	A
Q	A
E	T
T	S
E	L
R	G
L	L
T	S
R	S
S	V
N	L
R	E
V	D
L	N
E	T
P	T
M	Q
N	K
R	L
R	S
R	V
D	A
L	V
K	T
V	E
L	G
R	R
Y	F
P	H
C	S
Q	V
L	D
K	F
L	E
E	D
L	H
D	L
F	Y
L	Q
K	G
T	P
D	E
Q	K
I	K
R	M
R	F
C	E
L	K
E	D
V	R
K	A
F	N
Q	D
K	A
D	S
V	R
S	G
L	S
S	S
S	S
S	S
S	S
S	S
S	S
S	S
L	K
G	D
T	R
A	F
Q	G
C	N
E	V
V	E
L	L
W	Y
M	Y
Y	R

2.3.6 PORCENTAJE DE IDENTIDAD DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CnNPR3 DE COCOTERO

La secuencia de aminoácidos de la nueva secuencia aislada de cocotero, presentó identidad con NPR3 de las especies de: *Elaeis guineensis*, *Phoenix dactylifera*, *Musa acuminata*, *Vitis vinifera*, *Brachypodium distachyon*, *Jatropha curcas*, *Arabidopsis thaliana* y presentó identidad con NPR4 de *Arabidopsis thaliana*.

Cuadro 2.7. Muestra el número de accesión, la especie, el valor de E, así como el porcentaje de identidad de la nueva proteína aislada de cocotero con otras proteínas homólogas de NPR1.

Accesión	Especie	Valor E	Identidad
XP_010942675.1	Regulatory protein NPR3-like (<i>Elaeis guineensis</i>)	0.0	94%
XP_008806697.1	Regulatory protein NPR3-like (<i>Phoenix dactylifera</i>)	0.0	92%
XP_009397343.1	Regulatory protein NPR3-like (<i>Musa acuminata</i>)	0.0	80%
XP_002274045.1	Regulatory protein NPR3-like (<i>Vitis vinifera</i>)	0.0	72%
XP_010272311.1	Regulatory protein NPR3-like isoform X1 (<i>Nelumbo nucifera</i>)	0.0	71%
XP_003569900.1	Regulatory protein NPR3-like (<i>Brachypodium distachyon</i>)	0.0	69%
XP_012089954.1	Regulatory protein NPR3-like (<i>Jatropha curcas</i>)	0.0	69%
NP_199324.2	NPR1-like protein 3 (<i>A. thaliana</i>)	0.0	59%
NP_193701.1	NPR1-like protein 4 (<i>A. thaliana</i>)	0.0	57%

2.3.7 MATRIZ DE IDENTIDAD

El análisis de la matriz de identidad, mostró que la nueva secuencia de aminoácidos aislada de cocotero, presentó un mayor porcentaje de identidad con las secuencias homólogas a NPR3 de las familias de *Arabidopsis thaliana* y *O. sativa* (ver Cuadro 2.8). Por lo tanto, es probable que esta nueva secuencia aislada, pertenezca a un homólogo de NPR3 de *Arabidopsis thaliana* y *O. sativa*.

Cuadro 2.8. Se observan los porcentajes de identidad comparativos, presentados por los miembros de las familias de NPR1 de *Arabidopsis thaliana* y *O. sativa* con la secuencia de CnNPR3 de *C. nucifera* L.

	AtNPR1	AtNPR2	AtNPR3	AtNPR4	AtNPR5	AtNPR6
CnNPR3	42%	43%	62%	59%	35%	35%
Valor de E	2e-90	3e-85	5e-148	2e-140	1e-54	7e-55
	OsNPR1	OsNPR2	OsNPR3	OsNPR4	OsNPR5	
CnNPR3	45%	46%	61%	34%	32%	
Valor de E	8e-86	8e-84	6e-135	3e-46	9e-46	

2.3.8 ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE CnNPR3 CON SECUENCIAS HOMÓLOGAS DE NPR1

El alineamiento nos permitió determinar que la nueva proteína homólogo de NPR1 de cocotero, posee los dos dominios conservados involucrados en la interacción proteína-proteína (BTB/POZ & un dominio repetido de Ankirina). El dominio BTB/POZ, se encuentra ubicado cerca de la N-terminal de la proteína que va del aminoácido 57 al 188 abarcando un total de 132 aminoácidos (Figura 2.5). El dominio BTB/POZ actúa como un modulador de la interacción proteína-proteína que es capaz de asociarse con proteínas iguales e interactuar con proteínas sin el dominio BTB. Estudios funcionales han mostrado que el dominio BTB está involucrado en transcripción, represión, regulación citoesquelética, tetramerización, entrada de iones calcio y en la ubiquitinación/degradación de proteínas (Stogios *et al.*, 2005). Esta secuencia de cocotero presentó varios residuos Cys 82, los cuales se reducen para activar la proteína de NPR1 del complejo oligómero y así permitir su entrada al núcleo (figura 2.5) (Mou *et al.*, 2003).

La secuencia de cocotero, también presentó el dominio repetido de Ankirina, el cual consiste en 4 repeticiones de 33 aminoácidos (Figura 2.5) (Cao *et al.*, 1997). Las repeticiones de Ankirina se ha observado que existen sólo como un simple dominio de proteína o en conjunción con otros dominios en la misma proteína NPR1 (Mosavi *et al.*, 2004). El dominio repetido de Ankirina ha sido identificado en diversos grupos de proteínas involucradas en señalización célula-célula, integridad del citoesqueleto, transcripción y regulación del ciclo celular, respuestas inflamatorias, desarrollo y varios fenómenos de transporte (Mosavi *et al.*, 2004). Estas repeticiones se han encontrado que están involucradas en interacciones proteína-proteína (Mosavi *et al.*, 2004). La región C-terminal de la proteína homólogo de NPR1 de cocotero presentó aminoácidos básicos, que son característicos del sitio de localización nuclear (NLS) (Nigg, 1997). Kinkema y colaboradores mostraron a través de mutagénesis que los cinco residuos en la C-terminal de AtNPR1 son esenciales para su translocación nuclear (figura 2.5) (Kinkema *et al.*, 2000). Estos aminoácidos son conservados en la secuencia de aminoácidos de CnNPR3 de cocotero, lo cual sugiere que posiblemente, esta nueva proteína es translocada al núcleo de la célula de cocotero.

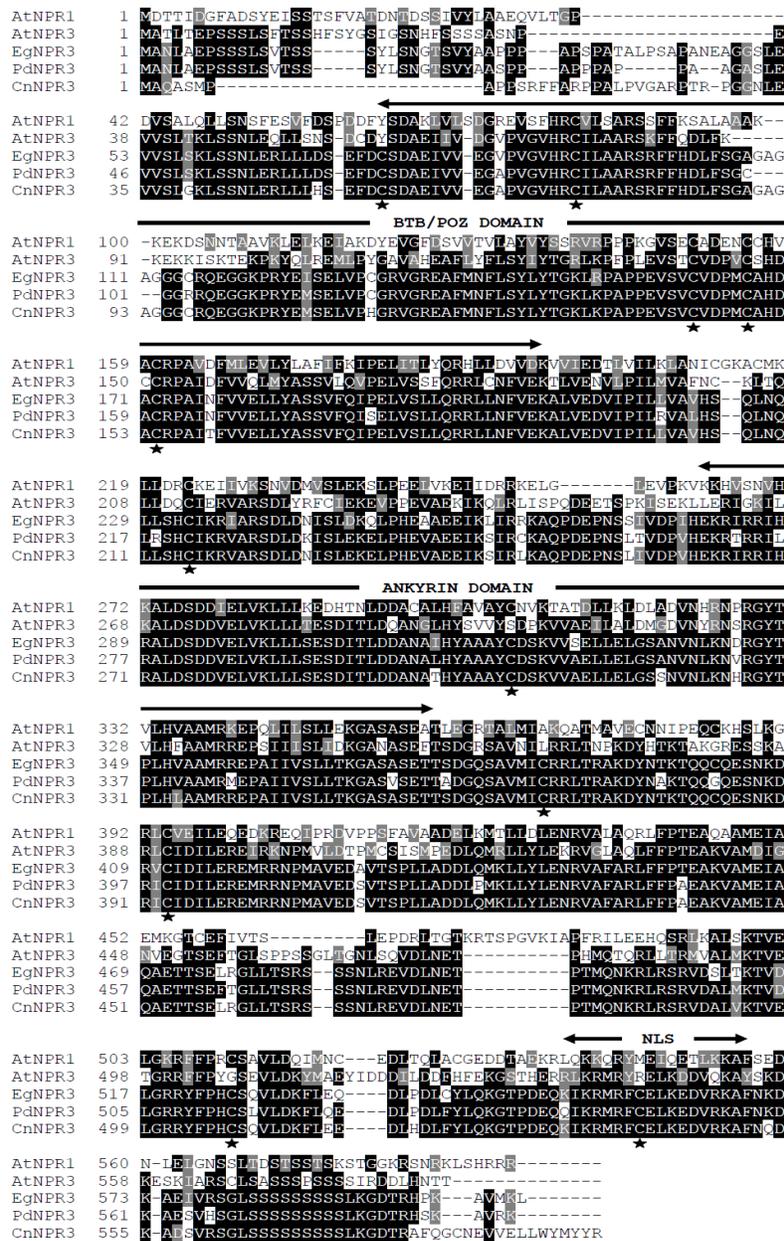


Figura 2.5. Alineamiento de secuencias homólogas de NPR1 de especies de *Arabidopsis thaliana*, *Elaeis guineensis* y *Phoenix dactylifera*, junto con la secuencia nueva de cocotero, empleando el programa CLUSTALX. Los aminoácidos idénticos fueron sombreados en negro y las sustituciones conservadas en gris con el programa BOXSHADE. La secuencia de aminoácidos de CnNPR3 de cocotero, presentó los dominios conservados BTB/POZ y ANKYRINA (flechas negras). Se localizó un sitio de localización nuclear (NLS). También se observaron múltiples residuos Cys requeridos para la oligomerización y transactivación de la proteína (asteriscos negros).

2.3.9 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se realizó el árbol filogenético empleando los miembros de la familia de NPR de las especies de *Arabidopsis thaliana* (AtNPR1, AtNPR2, AtNPR3, AtNPR4, AtNPR5 y AtNPR6) y *O. sativa* (OsNPR1, OsNPR2, OsNPR3, OsNPR4 y OsNPR5), cuyas secuencias fueron descargadas de la base de datos del GeneBank. Las secuencias homólogas de NPR1 se agruparon en tres clados diferentes (I, II y III). En cada clado hubo dos homólogos representativos de la familia de NPR de *A. thaliana*, así como *O. sativa*. El homólogo de NPR1 de cocotero se agrupó en el clado dos en el mismo clado que NPR3 y NPR4 de *A. thaliana*. Esto, hace suponer que esta nueva proteína de cocotero podría estar actuando como un regulador negativo del mecanismo SAR en la palma de cocotero (Figura 2.6) (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo, en un estudio reciente en la planta modelo *A. thaliana*, se descubrió que estos dos parálogos de NPR1 (*NPR3 - NPR4*), funcionan como receptores de la señal inmune de AS y se encargan de la regulación de NPR1 en respuesta a diferentes niveles de AS en la planta, controlando de esta manera la muerte celular programada y la inmunidad celular (Qing Fu *et al.*, 2012).

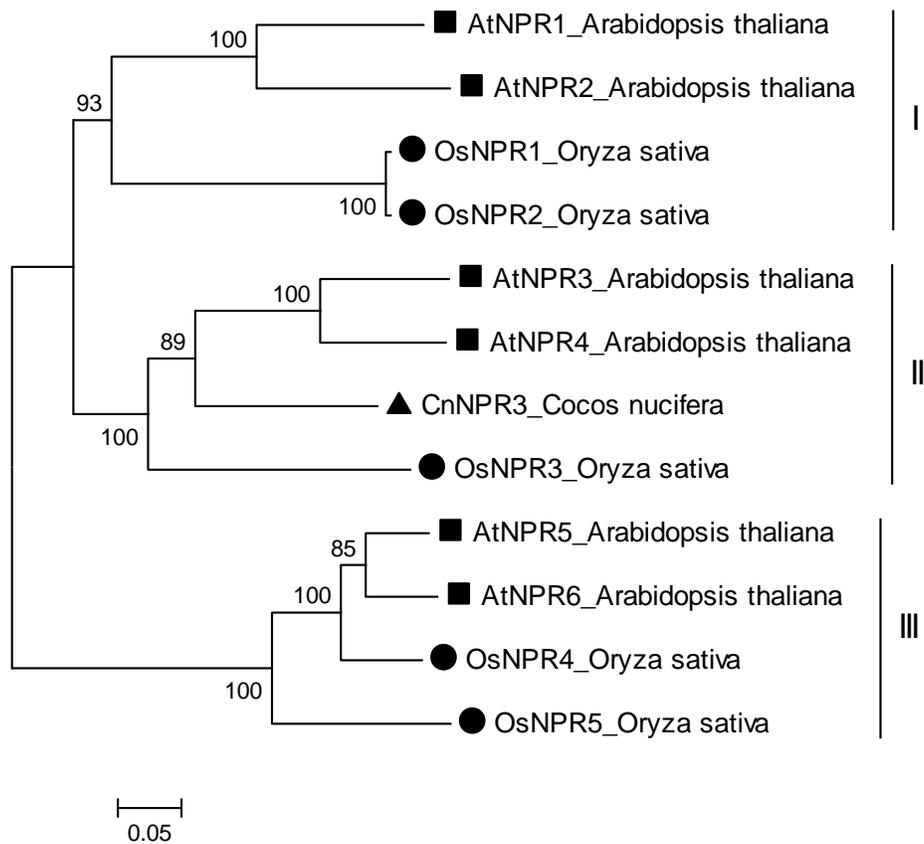


Figura 2.6. Árbol filogenético Neighbor-Joining, realizado con 10 secuencias homólogas de NPR1 de 2 especies de plantas. Secuencias homólogas de NPR1 de *Arabidopsis thaliana* (Cuadros en negro) y *O. sativa* (círculos en negro) son señaladas respectivamente. La nueva secuencia de cocotero se agrupó en el clado II (triángulo en negro). El número en los clados indica el valor obtenido del análisis con un Bootstrap de 1000 réplicas.

2.4 DISCUSIÓN

El cocotero es un cultivo de gran importancia económica a nivel mundial, sin embargo, como en la mayoría de los cultivos, es atacado por varios tipos de patógenos, principalmente los fitoplasmas, los cuales son los causantes del amarillamiento letal, enfermedad que ha devastado grandes plantaciones en todo el mundo. Sin embargo, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa estructurales y sistémicos capaces de contrarrestar los ataques de diferentes patógenos. Uno de estos me efectos de defensa se es la resistencia sistémica inducida (SAR), un mecanismo de amplio espectro capaz de proteger a las plantas contra varios tipos de patógenos (Durrant & Dong). Esta respuesta se inicia con una infección local, el cual va seguido de una respuesta sistémica. Durante el proceso de infección se lleva a cabo la acumulación de la hormona ácido salicílico, que a su vez activa a la proteína NPR1. NPR1 (no expresor de genes *PR1*), conocido también como el regulador principal de SAR (Durrant & Dong, 2004). Esta proteína posee dos dominios de interacción proteína-proteína, el dominio BTB y el dominio repetido de ankirina. A partir de la identificación y clonación de NPR1 de *Arabidopsis* (Cao et al., 1994; 1997), se ha venido realizando la clonación y caracterización molecular de genes homólogos de NPR1 de especies como tabaco (Liu et al., 2002), girasol (Radwan et al., 2005), tomate (Ekengren et al., 2003), arroz (Yuexing et al., 2007; Chern et al., 2005), manzana (Malnoy et al., 2007), uva (Le Henanff et al., 2009) y banano (Zhao et al., 2008; Endah et al., 2008).

En este capítulo se logró amplificar los extremos 5' y 3' terminales del cDNA de una secuencia homologa a un miembro de la familia de NPR de *Arabidopsis*. El alineamiento de esta secuencia de cocotero, permitió determinar los dominios característicos de los miembros de la familia de NPR, el dominio BTB/POZ y el dominio repetido de ankirina (Rochon et al., 2006; Hepwort et al., 2005; Liu et al., 2005; Cao et al., 1997). También se pudo determinar un sitio de localización nuclear (NLS), necesario para el importe nuclear de la proteína (Kinkema et al., 2000). Actualmente, no se sabe si la palma de cocotero posee otros miembros homólogos a la familia de NPR, debido a que su genoma aún no ha sido secuenciado. Sin embargo, existen estudios donde se han realizado el transcriptoma de cocotero (Nejat et al., 2015), pero aún no se han reportado la presencia de secuencias homólogas a NPR1. La posibilidad de que cocotero posea otros miembros

son altos, ya que existen varias especies que poseen una familia, tal es el caso de Uva, *Arabidopsis*, Populus, Uva, Papaya y Arroz, las cuales se han encontrado que poseen una pequeña familia de NPR (Yu et al., 2002; The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2005; Tuskan et al., 2006; Jaillon et al., 2007; Moroldo et al., 2008; Peraza-Echeverría et al., 2012).

La secuencia aislada se le denominó como CnNPR3, debido a que presentó homología con secuencias de NPR3, principalmente de las especies de *Arabidopsis thaliana*, *Elaeis guineensis*, *Phoenix dactylifera*, *Oryza sativa* y *Carica papaya*. De acuerdo a la literatura, NPR3 de *Arabidopsis* funciona como receptor del AS (Fu et al., 2012), por lo que es posible que esta nueva proteína de cocotero también sea un receptor de AS. Sin embargo, la función de esta nueva proteína de coco es cuestionable, faltaría hacer otros estudios para determinar su función específica.

2.5 CONCLUSIONES

1. Empleando el kit GeneRacer, se logró la amplificación y clonación de los extremos 5' y 3' terminales del cDNA de esta nueva secuencia homóloga de NPR1 de cocotero y posteriormente, mediante el diseño de cebadores específicos se logró la amplificación y clonación del cDNA total. El tamaño del cDNA fue de 2,184 pb y presentó un marco de lectura de 596 aminoácidos.
2. La caracterización molecular de esta nueva secuencia de cocotero, permitió identificar los dominios de interacción proteína-proteína altamente conservados (BTB/POZ y ANKIRINA) y el sitio de localización nuclear (NLS).
3. De acuerdo al análisis filogenético, esta secuencia presentó homología con la secuencia de NPR3 de *Arabidopsis*, por lo que se le denominó como CnNPR3.

CAPÍTULO III

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL cDNA DE *CnNPR1* EN LA PALMA DE COCOTERO

3.1 INTRODUCCIÓN

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es uno de los cultivos más importantes de las zonas tropicales, donde es una fuente de alimentos, bebidas, combustible, medicina y como material de construcción (Harries, 1978). La producción de la palma de cocotero a nivel mundial, es de 12,000 millones de hectáreas (FAO, 2014). Desafortunadamente, este cultivo es afectado por varios tipos de plagas, principalmente los fitoplasmas causantes de la enfermedad del amarillamiento letal del cocotero (ALC), enfermedad que ha matado millones de palmas en Jamaica, Cuba, Islas caimán, Estados Unidos, México Belice, Honduras, Guatemala (Harrison y Oropeza, 2008). El AL es causado por fitoplasmas (Beakbane *et al.*, 1972; McCoy 1972) y se dispersa muy rápidamente (McCoy *et al.*, 1983), pues es transmitido por un insecto volador, el homóptero *Haplaxius crudus*, identificado como vector en estudios realizados en Florida (Howard *et al.*, 1982; Harrison y Oropeza, 1995) y en México (CICY, México; resultados no publicados). Este insecto se encuentra ampliamente distribuido en los países tropicales de Latinoamérica y el Caribe (Villanueva-Barradas, 1991). El uso de antibióticos e insecticidas para controlar al patógeno y al vector tiene una utilidad parcial, pero no suficiente para el control de la enfermedad (McCoy *et al.*, 1983), el empleo de germoplasma resistente ha sido eficiente en el combate de ALC (Harrison y Oropeza, 2008).

Por otro lado, recientemente se reportó en Jamaica que al usar una combinación de prácticas culturales, que incluyen principalmente detección temprana del AL en las plantas, derribo y destrucción de palmas infectadas y la eliminación de arvenses hay una reducción en la incidencia de la enfermedad (Oropeza *et al.*, 2009). Estas mismas prácticas han dado el idéntico resultado en una enfermedad similar al ALC en Ghana (Nkansah-Poku *et al.*, 2009)

Las plantas poseen de forma natural mecanismos de defensa contra patógenos, y una de ellas es la resistencia sistémica adquirida (SAR), la cual es una de las armas más importantes que poseen para defenderse ante el ataque de patógenos (Durrant y Dong, 2004; Cao *et al.*, 1997). La SAR se produce cuando la célula vegetal identifica ciertas moléculas producidas por los patógenos llamadas efectores, lo que desencadena una respuesta primaria conocida como la HR (Heat, 2000) que a su vez desencadena la SAR (Durrant & Dong, 2004). Molecularmente la SAR, se caracteriza por un incremento en la expresión de genes *PR*, considerados marcadores de esta respuesta (Durrant y Dong, 2004).

NPR1 es un coactivador transcripcional que juega un papel principal en la regulación transcripcional de respuesta a patógenos (Pieterse y Van Loon, 2004; Cao *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1994). *NPR1*, fue aislado por primera vez en 1997 a partir de una mutante de *Arabidopsis thaliana* insensible a SA e INA, los cuales presentaron bajos niveles de expresión de los genes marcadores de SAR (*PR1* y *PR5*) denominando a este gen “no expresivo de genes *PR-1*” (Cao *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1994). *Arabidopsis* posee una familia génica de *NPR1*, que comprende a otros cinco miembros *NPR2*, *NPR3*, *NPR4*, BLADE-ON-PETIOLE2 (BOP2, también llamado *NPR5*) y BOP1 (también llamado *NPR6*) (Zhang *et al.*, 2006; Hepworth *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). Cada uno de los miembros posee un dominio conservado BTB/POZ y un dominio repetido de ANKIRINA. Además, cada miembro contiene también un conjunto de residuos de cisteínas que están involucrados en el mecanismo de control redox (Hepworth *et al.*, 2005).

Actualmente, se cuenta con una secuencia de cDNA de un gen homólogo a *NPR1*, que de acuerdo a los análisis bioinformáticos realizados, presentó homología con *NPR3* de *Arabidopsis thaliana*, por lo que se le denominó como *CnNPR3* (Nic-Matos, 2012. Tesis de maestría). Sin embargo, debido a la homología con *NPR3* y a la posible función, fue necesario buscar al homólogo (ortólogo) de *NPR1* que confiere la resistencia a patógenos y funciona como regulador del mecanismo de defensa SAR. En base a estos antecedentes, existe la posibilidad de que la palma de cocotero posea otros miembros homólogos a la familia de NPR, por ende, el objetivo de este capítulo fue la búsqueda, clonación y caracterización molecular del homólogo (ortólogo) de *NPR1*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 DISEÑO DE CEBADORES

Para el aislamiento del cDNA de *CnNPR1*, se buscó en la literatura y se encontraron tres pares de cebadores degenerados diseñados a partir de secuencias consenso de genes *NPR1* de especies como *Arabidopsis thaliana*, *Carica papaya*, *Brassica napus* y *Oryza sativa*. Estos cebadores fueron usados para el aislamiento del homólogo de *NPR1* en las especies de cacao (Shi et al., 2010), banano (Endah et al., 2008) y camote (Guan-Shui et al., 2009). Estos cebadores se denominaron: Cebador A, B y C.

Posteriormente, se diseñaron dos cebadores específicos para el aislamiento de los extremos 5'-3' del cDNA de *CnNPR1*. Estos cebadores específicos fueron diseñados con el programa OligoPerfect™ Designer (Invitrogen), en base a las características sugeridas en el manual SMARTer™ RACE CDNA Amplification Kit (Clontech).

- Tener un tamaño de entre 23-28 pb.
- Tener un porcentaje de GC de 50-70%
- Tener una Temperatura de hibridación (T_m) de 65-70°C
- No ser complementario con el cebador del 3' terminal.
- Ser específico para el gen de interés.
-

Por último las secuencias de los cebadores fueron analizados con el programa Oligo-Analyzer (V.1.0.2), para verificar que cumplan con las características antes mencionadas.

3.2.2 AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL cDNA DE *CnNPR1* DE COCOTERO

Se llevó a cabo la amplificación del ADN y cDNA de cocotero con los cebadores degenerados. La mezcla de reacción se realizó como se indica en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Se indican los volúmenes de los reactivos empleados en la preparación de la mezcla de reacción para las pruebas de amplificación con cada par de cebadores. F: sentido; R: antisentido.

Reactivo	Volumen
Agua	11.2 µL
Buffer	5 µL
MgCl ₂	1 µL
dNTP's	0.5 µL
Cebador-F	2 µL
Cebador-R	2 µL
Taq polimerasa	0.3 µL
Templado	3 µL
Volumen total	25 µL

La amplificación se llevó a cabo mediante PCR Touch-Down, debido a las diferentes temperaturas de hibridación de cada cebador (ver Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Temperaturas de hibridación probadas durante la amplificación del nuevo homólogo de *NPR1* de cocotero empleando los tres pares de cebadores degenerados.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	5 minutos	1 ciclo
94	30 segundos	
47	30 segundos	5
72	1 minuto	
94	30 segundos	
49	30 segundos	5
72	1 minuto	
94	30 segundos	
51	30 segundos	5
72	1 minuto	
94	30 segundos	
53	30 segundos	5
72	1 minuto	
94	30 segundos	
55	30 segundos	30
72	1 minuto	

72	10 minutos	1
----	------------	---

Los extremos 5'-3' terminales se amplificaron empleando los cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia parcial de cDNA de *CnNPR1* obtenida con los cebadores degenerados. Los volúmenes de la mezcla de reacción empleados para esta amplificación se describen a continuación:

Cuadro 3.3. Volúmenes de la mezcla de reacción empleados para amplificación de los extremos terminales (5'-3') del cDNA de *CnNPR1*.

Reactivos	Volumen
CDNA	3 µL
5X Buffer (-MgCl ₂)	5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1 µL
Mezcla de dNTPs (10 mM)	0.5 µL
UniveSARI Primer Mix (UPM 10 µM)	2.5 µL
Gene Specific Primer (10 pMol)	2.5 µL
Mango Taq ADN Polymerase (5 U/µL)	0.5 µL
Agua estéril	10 µL
Volumen Total	25 µL

GSP. Gene specific primer, corresponde a los cebadores diseñados (Forward y Reverse). **UPM.** Univesall Primer Mix, cebadores del Kit del Smarter RACE.

Cuadro 3.4. Condiciones de temperatura de hibridación empleados durante la amplificación de ambos extremos terminales de *CnNPR1*.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	5 minutos	1
94	30 segundos	5
72	3 minutos	
94	30 segundos	5
66	30 segundos	
72	3 minutos	
94	30 segundos	30
62	30 segundos	
72	3 minutos	
72	10 minutos	1

Durante las amplificaciones para el caso del extremo 3' terminal, se probó únicamente el cebador "sentido" (Forward) de cada par de cebador diseñado, mientras que para el extremo 5' terminal, se probó únicamente el cebador "antisentido" (Reverse) de cada par diseñado, esto de acuerdo al manual del SMARTer™ RACE (Clontech). Por último, estos

fragmentos amplificados, tanto, con los cebadores degenerados como con los cebadores específicos fueron clonados en el vector PGEM T-Easy y secuenciados por la compañía Davis sequencing (USA).

3.2.3 ANÁLISIS *IN SILICO* DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

El marco de lectura abierto de los fragmentos secuenciados fue determinado empleando el programa TRANSLATE (<http://web.expasy.org/translate/>) y la identidad de los fragmentos fueron determinados con el programa BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El alineamiento de las secuencias de aminoácidos fue realizado empleando el programa CLUSTALX (Larkin *et al.*, 2008) y los aminoácidos conservados fueron sombreados con el programa BOXSHADE (Hofmann y Barón). El alineamiento permitió determinar las regiones conservadas de esta nueva secuencia de aminoácidos aislada de cocotero. Por último, se realizó un árbol filogenético para determinar la homología de esta nueva secuencia con el programa MEGA versión 6.06 (Tamura *et al.*, 2013) empleando el método de distancia Neighbor-Joining. El árbol filogenético fue realizado empleado secuencias de aminoácidos de los homólogos de la familia de NPR de *A. thaliana*, *O. sativa*, *C. papaya* y *C. nucifera* (CnNPR3, previamente caracterizada).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 CEBADORES DEGENERADOS Y ESPECÍFICOS

Los cebadores degenerados y los cebadores específicos, presentaron las siguientes características (ver Cuadro 3.5).

Cuadro 3.5. Se observan las secuencias de los cebadores degenerados empleados para el aislamiento del ortólogo de *NPR1* en cocotero.

CEBADORES DEGENERADOS					
Nombre	Secuencia	T _m (°C)	Amplicón	Secuencia aislada	Literatura
Cebador A	TATTGTCAARTCTRATGTAGAT	47	1,776 pb	<i>TcNPR1</i>	Shi <i>et al.</i> , 2010
	GAARAAYCGTTTCCCKAGTTCCAC	65			
Cebador B	GAGCTTTTGGATCTCGCACTTGCAGA	71	570 pb	<i>MNPR1</i>	Endah <i>et al.</i> , 2008
	CCGAGCTCCACTGTTTTGGAGAGTGCT	72			
Cebador C	ATTGTCAARTCTRAYGTDGAT	52	600 pb	<i>IbNPR1</i>	Guan-Shui <i>et al.</i> , 2009
	AACTCTGTTTTCAAGGT	44			
CEBADORES ESPECIFICOS					
Nombre	Secuencia	T _m (°C)			
CnNPR1-1	GGTATACTGAAGAAGGAGAAGCCTCTCC	65			
	AGAGAAACGGAAGCTTCTCCTATTTGT	64			
CnNPR1-2	ACAAATAGGAGAAGCTTCCGTTTCTCT	64			
	GGAGAGGCTTCTCCTTCTTCAGTATAACC	65			
CnNPR1-3	CCTAGGTTGTA CTCCAACCCTTCAAC	65			
	GTTGAAGGGTTTGGAGTACAACCTAGG	65			

3.3.2 PRODUCTOS AMPLIFICADOS CON LOS CEBADORES DEGENERADOS

Los productos amplificados con los cebadores degenerados A y B, empleando DNA como templado, presentaron fragmentos de diferentes tamaños (figura 3.1). De los fragmentos amplificados 4 presentaron bandas de mayor intensidad (indicadas en flechas). Estos fueron los fragmentos que se clonaron y secuenciaron.

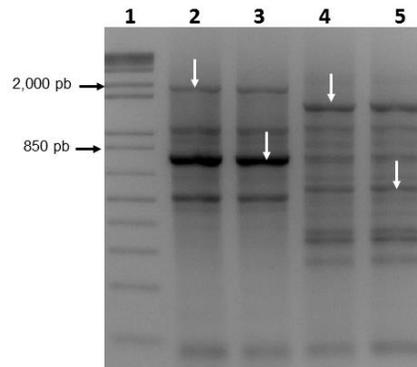


Figura 3.1. Se observan los productos amplificados usando el cebador A y el cebador B. **Carril 1.** Marcador 1kb; **Carril 2,3.** Producto amplificado con el cebador A. **Carril 4 y 5.** Productos amplificados con el cebador B.

Posteriormente, bajo las mismas condiciones de amplificación y con los mismos cebadores, empleando cDNA como templado, sólo se obtuvo un fragmento de aproximadamente 600 pb con el cebador B, mientras que con el cebador A, no se amplificó nada (figura 3.2).

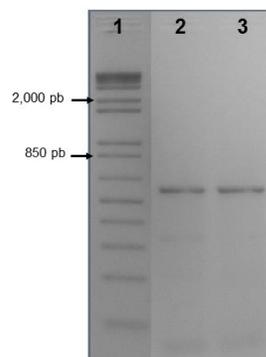


Figura 3.2. Gel de agarosa al 1%. Muestra únicamente los fragmentos obtenidos con el cebador B. **Carril 1.** Marcador de 1kb. **Carril 2 y 3.** Productos amplificados con el cebador B.

En total, fueron 5 fragmentos purificados, de los cuales se lograron clonar sólo tres fragmentos (indicados en flechas en la figura 3.3). Los demás fragmentos no se ligaron al vector pGEM T-Easy, por lo tanto no fue posible clonarlos.

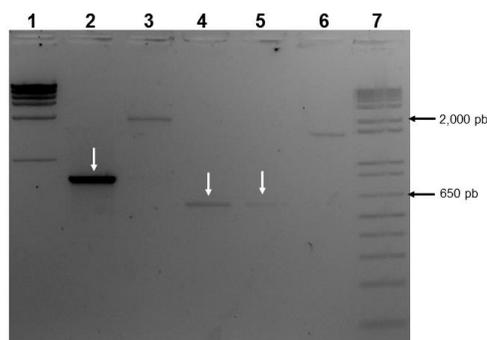


Figura 3.3. Gel de agarosa al 1%. Muestra los fragmentos que fueron purificados, para la posterior clonación y secuenciación. **Carril 1.** Marcador de masas; **Carril 2,3.** Productos amplificados con el cebador A. **Carril 4, 5, 6.** Productos amplificados con el cebador B.

Cabe resaltar que con el cebador C, no se obtuvo ninguna amplificación con ADN ni con cDNA, por lo que no se agregó ninguna imagen (imagen no mostrada).

3.3.3. PRODUCTOS AMPLIFICADOS DE LOS EXTREMOS 5'-3' TERMINALES DEL cDNA DE *CnNPR1*

Posteriormente, con los cebadores específicos “sentido” (F1, F2 y F3) se lograron amplificar 3 fragmentos de diferentes tamaños cada uno (Figura 3.4). Seguido a esto, con los cebadores específicos “antisentido” (R1, R2 y R3) también se amplificaron 3 fragmentos (Figura 3.5).

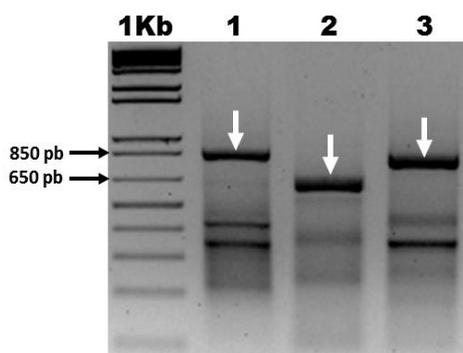


Figura 3.4. Imagen que muestra los productos amplificados con los tres cebadores “sentido”. Los productos amplificados corresponden al extremo 3' terminal del cDNA de *CnNPR1*. **1Kb.** Marcador. **Carril 1.** Fragmento amplificado con el cebador *CnNPR1_F1*. **Carril 2.** Fragmento amplificado con el cebador *CnNPR1_F2*. **Carril 3.** Fragmento amplificado con el cebador *CnNPR1_F3*.

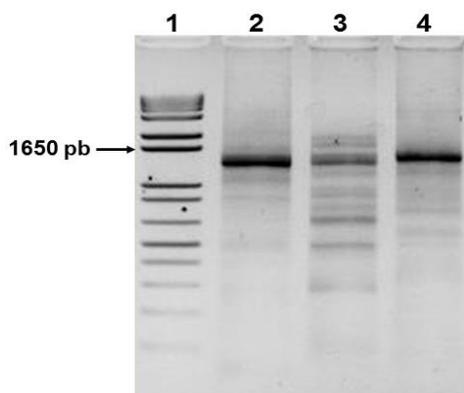


Figura 3.5. Imagen que muestra los productos amplificados con los tres cebadores “ansentido”. Los productos amplificados corresponden al extremo 5' terminal del cDNA de *CnNPR1*. **Carril 1.** Marcador 1 Kb Plus. **Carril 2.** Fragmento amplificado con el cebador CnNPR1_R1. **Carril 3.** Fragmento amplificado con el cebador CnNPR1_R2. **Carril 4.** Fragmento amplificado con el cebador CnNPR1_R3

3.3.4 SECUENCIA PARCIAL DEL cDNA DE *CnNPR1*

De los fragmentos amplificados con los cebadores degenerados, se logró obtener un fragmento de aproximadamente 650 pb, presentando un marco de lectura abierta de 179 aminoácidos (Cuadro 3.6).

Cuadro 3.6. Secuencia del fragmento clonado con los cebadores degenerados. Posteriormente el marco de lectura presentado por esta secuencia.

Secuencia de nucleótidos (651 pb)

```
CCGGATTACCCTGGACCTTTGCTGGACGTTGGCTCACATGTTCTTTTCATTGCGTATTCCCTTGATTTCTGTGG
GATAAGCCGAGCTCCACTGTTTTGGAGAGTGCTTTTCATTGAGCGAGATGCTCCTCCTTGATCCTGAAAGGTG
TTTCGTTTTAAATCCACCGATGTCTTCTGGTTTTGTGGTTGAAGGGTTTGGAGTACAACCTAGGGTGAAC TCCAA
AGTCCCATCCACTTGAGCAATGTCCATGGCAACTTTTGCCATCGCAAGAGAAAACGGAAGCTTCTCCTA
CGGTTCTCAAGGTACAACAATCTACCACGCAGGTCATCACCTGCCATCGCAAGAGAAAACGGAAGCTTCTCCTA
TTTGTGGGTCCCTTCTTTTCAGCTTGCTCTAATATTTCAATGCACAAGCGATCCTTGGGAGAGGCTTCTCCTTC
TTCAGTATACCTATTGTAATCCACGGACTTGGTAAGTCTTTTCGAGATTTGAAGTGCTTTTCTTCCATCTAAC
GTTAGATCGGATGGTCTAGCTCCCTTTGTTAGAAGGGACACGATAATTTTGGTTCTTTACGCATCGCAGCCA
TGTGAAGTACGGTGTAACCCCTTGGGTCCCTGTGATTAACATCTGCAAGTCCGAGATCCTAAAGCTC
```

Secuencia de aminoácidos (179 aa)

```
MAAMRKEPKIIVSLLTKGARPSDLTLDGRKALQISKRLTKSVDYNYRYTEEGEASPKDRLCIEILEQAERRDPQ
IGEASVSLAMAGDDLGRLLYLENRVALARVLFPM EAKVAMDIAQVDGTLLEFTLGCTPNPSTTNQKTSVDLNE
TPFRIKEEHLARMKALSKTVELGLSHRNQNTQ
```

3.3.5 SECUENCIA DE LOS EXTREMOS 5'-3' TERMINALES DE *CnNPR1*

Posterior a la obtención del primer fragmento parcial de *CnNPR1* con los cebadores degenerados, se logró obtener la secuencia de los extremos 5'-3' terminales del cDNA de *CnNPR1* de cocotero (Cuadro 3.7).

Cuadro 3.7. Secuencia de los extremos 5'-3' terminales del cDNA de *CnNPR1*, amplificados con los cebadores específicos (en rojo, secuencia de cebadores F1 y R1).

NUCLEÓTIDOS EXTREMO 5' (651 pb)

AATACATGGGGAGCCTTTTCGCTGTCTTTCCCTCTTCTTTTTCTCCGATCAAATCCAGATCTCTGCCGTCTCTGT
 TTCTCCCTCCACAGCCTCCCACCCTTTCCATTACTTCCATCCCGACCAAATCCCCTGCGATCCAGGTGCGGGA
 ACATGGAAGCGAGCCACCTCACCGTCGCGACGGCGTTTCTCAGATTCCGGACAACGGCAGCAGCGTCTGCTCCGG
 CGACGCCGTCCCCGCTCCGGCGGACTCGCCTGCCGCCGACTTGGAGGCCCTCCGCCGCCTCTCCGACAACCTG
 AGCTCCGTCTTCCAGTCGCCGGAGTTTGAATTCTGCACCGACGCCCGCATCACCGTCGCCGGCAGCCCCCAC
 GGGAGGTCGGCGCCACCCTGCGTGTCTCTCCGCCCGGAGCCCCCTTCTTCCGCGAGGTGTTTCGGAAGCGGGA
 GAAAGGGGTGCCGGCGAAGCTGGAGCTCAGGGAGCTGGTGAGGGACTTGGAGGTCGGGTACGAGGCCCTGGTG
 GCGGTCTTGGGGTACCTCTACAGCGGGAGGGTGGGCCCGCTCCCGAGCGTGGTCTGTACGTGCGTCGACGAGG
 AGTGCTCTCACGAGGGCTGCCGGCCCGCTTGACTTTCATGGTCGAGGTGCTCTATGCTTCCCTCACCTTCCA
 GATCTCCGAGTTGGTCAACCTCTTCCAGCGACATCTTCTTGATATTCTTGAGAAGGTGGCCATAGATGACATA
 CCGGTGATTCTAAACGTTGCAAATCTATGCAGTAAGTCTTGTGCCAGATTGCTTCCCAAATGCATTGAAATAG
 TAGTGAGGTCGGACCTGGACGCCGTACACTGGACAAGGCATTGCCTCCAGATATTGTGAAGCAAATAATAGA
 TTTACGGATAAAGTTTTGGATTAGTTGGACCTGAAAACAGTGGCTTTTTCTGATAAAACACGTGAAGAGAATACAC
 AGGGCCCTTGATTACAGACGATGTTGAATTAATCAGAATGTTGCTGAAGGAGGGGCACACCTCCTTAGATGACT
 CTTACGCACTGCATTATGCTGTAGCACATTGTGACTCAAAAATCACTACAGAGCTGCTGGATCTTGGACTTGC
 AGATGTTAATCACAGGGACCCAAGGGTTACACCGTACTTTCATGCTGCGATGCGTAAAGAACCAAAAATT
 ATCGTGTCCCTTCTAACAAAGGGAGCTAGACCATCCGATCTAACGTTAGATGGAAGAAAAGCACTTCAAATCT
 CGAAAAGACTTACCAAGTCCGTGGATTACAATA**GGTATACTGAAGAAGGAGAAGCCTCTCCA**AGGATCGCTT
 GTGCATTGAAATATTAGAGCAAGCTGAAAGAAGGGACCCACAAATAGGAGAAGCTTCCGTTTTCTCT

AMINOÁCIDOS EXTREMO 5' (410 aa)

MEASHLTVATAFSDSDNGSSVCSGDAVPAPADSPAADLEALRRLSDNLSVVFQSPFEFECTDARITVAGSPPR
 EVGAHRCVLSARSPFFREVFARKREKGVPAKLELRELVRDLEVGYEALVAVLGYLYSGRVGPLPSVVTCTVDEE
 CSHEGCRPAVDFMVEVLYASFQI SELVNLFQRHLLDILEKVAIDDIPVILNVANLCSKSCARLLPKCIEIV
 VRSDLDAVTLDKALPPDIVKQIIDLRISFGLVGPENSGFSDKHVKRIHRALDSDDVELIRMLLKEGHTSLDDS
 YALHYAVAHCDSKIITELLDLGLADVNRDPRGYTVLHMAAMRKEPKIIVSLLTKGARPSDLTLDGRKALQIS
 KRLTKSVLDYNRYTEEGEASPKDRLCIEILEQAERRDPQIGEASVS

NUCLEÓTIDOS EXTREMO 3' (1,151 pb)

GAGCTTTAGGATCTCGCACTTGAGATGTTAATCACAGGGACCCAAGGGGTTACACCGTACTTACATGGCTG
 CGATGCGTAAAGAACCAAAAATTATCGTGTCCCTTCTAACAAAGGGAGCTAGACCATCCGATCTAACGTTAGA
 TGGAAGAAAAGCACTTCAAATCTCGAAAAGACTTACCAAGTCCGTGGATTACAATA**GGTATACTGAAGAAGGA**
GAAGCCTCTCCAAGGATCGCTTGTGCATTGAAATATTAGAGCAAGCTGAAAGAAGGGACCCACAAATAGGAG
 AAGCTTCCGTTTTCTCTTTCGATGGCAGGTGATGACCTGCGTGGTAGATTGTTGTACCTTGAGAACCAGATTGC
 TCTGGCAAGGGTATTATTCCCCATGGAGGCAAAAGTTGCCATGGACATTGCTCAAGTGGATGGGACTTTGGAG
 TTCACCCTAGGTTGTACTCCAAACCTTCAACCACAAACCAGAAGACATCGGTGGATTTAAACGAAACACCTT
 TCAGGATCAAGGAGGAGCATCTCGCTCGAATGAAAGCACTCTCTAGAACAGTGGAAGTGGGCAAGCGTTTTCTT
 CCCACGGTGTCTCAGAGGTTCTTAACATGATCATGGATGATGACTACGCAGAGTTCACTTCTCTGGGGCAAGAT
 GCCTCGGAGGAGAAAAGGAAGAGATACCGTGAGCTGCAAGATGTTCTCACAAAAGCATTTAGCGAGGACAAGG
 TGGAATTTGATAAGTCCACCATCTCATCTTCATCATCAACATCATGGTCGAGAATATGAAGTTTCGCATCCAG
 CGGTGGCTCTGTTTGTAGATTTCGTAGTCTTCTCTCCTTTTAAAGCTCGCTTGTTTACCGGGTTTTCTTGGA
 TGCCAAGGGGATTATTTGTTGCCACATTCAAAGAAGGTCGACCCTCCCCTCAAATGTTGCTGTAAATATGGAC

GTTTAATGCACATATTTGTTCTCCTAAAATTACTCTTGGGTGGGTGATGTAATTGCCAATTCGCCTCCCTCTT
CTCGCCACGTCGCGCTTCCGTCAGCTCTATCGGGGCTCCCTTAAGTTCGATATGCTACGACCTCGACCCA
GATAGGGATGTTTCGATGCATCGCTGATACGGCTTCGCTTGACTGGATCCAGTCTA

AMINOÁCIDOS EXTREMO 3' (240 AA)

MAAMRKEPKIIVSLLTKGARPSDLTLDGRKALQISKRLTKSVLDYNYRYTEEGEASPKDRLCIEILEQAERRDPQ
IGEASVSLAMAGDDLGRLLYLENRVALARVLFPMKAVMDIAQVDGTLFTLGTTPNPSTTNQKTSVDLNE
TPFRIKEEHLARMKALSRTVELGKRFFPRCSEVLNMIMDDDYAEFTSLGQDASEEKRKRYRELQDVLTKAFSE
DKVEFDKSTISSSSSTSWSRI

Los extremos aislados de empalmaron y se obtuvo la secuencia total del cDNA del gen CnNPR1 de cocotero.

Cuadro 3.8. Secuencia total del cDNA de CnNPR1 de cocotero. Sombreado donde se empalman los cebadores F1 y R1.

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS (2,223 pb)

>CnNPR1 (2,223 pb)

AATACATGGGGAGCCTTTCGCTGTCTTTCCCTCTTCTTTTTCTCCGATCAAATCCAGATCTCTGCCGTCTGT
TTCTCCCTCCACAGCCTCCACCCCTTTCCATTACTTCCATCCCGACCAAATCCCCTGCGATCCAGGTGCGGGA
ACATGGAAGCGAGCCACCTCACCGTCGCGACGGCGTTCTCAGATTTCGGACAACGGCAGCAGCGTCTGCTCCGG
CGACGCCGTCCCCGCTCCGGCGGACTCGCCTGCCGCCGACTTGGAGGCCCTCCGCCGCTCTCCGACAACCTG
AGCTCCGTCTTCCAGTCGCCGGAGTTTGAATTCTGCACCGACGCCCGCATCACCGTCGCCGGCAGCCCCCAC
GGGAGGTGCGCGCCACCCTGCGTGCTCTCCGCCCGGAGCCCTTCTTCCGCGAGGTGTTTCGGAAGCGGGA
GAAAGGGGTGCCGGCGAAGCTGGAGCTCAGGGAGCTGGTGAGGGACTTGGAGGTTCGGGTACGAGGCCCTGGT
GCGGTCTTGGGGTACCTCTACAGCGGGAGGGTGGGCCCGCTCCCGAGCGTGGTCTGTACGTGCGTCGACGAGG
AGTGCTCTCACGAGGGCTGCCGGCCCGCGTTGACTTCATGGTCGAGGTGCTCTATGCTTCCCTTACCTTCCA
GATCTCCGAGTTGGTCAAACCTCTTCCAGCGACATCTTCTTGATATTCTTGAGAAGGTGGCCATAGATGACATA
CCGGTGATTCTAAACGTTGCAAATCTATGCAGTAAGTCTTGTGCCAGATTGCTTCCCAAATGCATTGAAATAG
TAGTGAGGTTCGGACCTGGACGCCGTCACTGGACAAGGCATTGCCTCCAGATATTGTGAAGCAAATAATAGA
TTTACGGATAAGTTTTGGATTAGTTGGACCTGAAAACAGTGGCTTTTTCTGATAAACACGTGAAGAGAATACAC
AGGGCCCTTGATTACAGACGATGTTGAATTAATCAGAATGTTGCTGAAGGAGGGGCACACCTCCTTAGATGACT
CTTACGCACTGCATTATGCTGTAGCACATTGTGACTCAAAAATCACTACAGAGCTGCTGGATCTTGGACTTGC
AGATGTTAATCACAGGGACCCAAGGGTTACACCGTACTTCACATGGCTGCGATGCGTAAAGAACCAAAAATT
ATCGTGCCCTTCTAACAAAGGGAGCTAGACCATCCGATCTAACGTTAGATGGAAGAAAAGCACTTCAAATCT
CGAAAAGACTTACCAAGTCCGTGGATTACAATA**GGTATACTGAAGAAGGAGAAGCCTCTCC**CAAGGATCGCTT
GTGCATTGAAATATTAGAGCAAGCTGAAAGAAGGGACCCACAAATAGGAGAAGCTTCCGTTTCTCTTTCGATG
GCAGGTGATGACCTGCGTGGTAGATTGTTGTACCTTGAAGAACCAGATTGCTCTGGCAAGGGTATTATTCCCA
TGGAGGCAAAAGTTGCCATGGACATTGCTCAAGTGGATGGGACTTGGAGTTCACCTAGGTTGTACTCCAAA
CCCTTCAACCACAAACCAGAAGACATCGGTGGATTTAAACGAAACACCTTTCAGGATCAAGGAGGAGCATCTC
GCTCGAATGAAAGCACTCTCTAGAACAGTGGAACTGGGCAAGCGTTTTCTTCCACGGTGTCTCAGAGGTTCTTA
ACATGATCATGGATGATGACTACGAGAGTTCACTTCTCTGGGGCAAGATGCCTCGGAGGAGAAAAGGAAGAG
ATACCGTGAGCTGCAAGATGTTCTCACAAAAGCATTTAGCGAGGACAAGGTGGAATTTGATAAGTCCACCATC
TCATCTTTCATCATCAACATCATGGTCGAGAATATGAAGTTTCGCATCCAGCGGTGGCTCTGTTTGTAGATTC
GTAGTCTTCTCTCTTTTAAAGCTCGCTTGTACCAGGGTTTTCTTGGCATGCCAAGGGGATTATTTGTTGCC
ACATTCAAAGAAGGTGACCCCTCCCTCAAATGTTGCTGTAAATATGGACGTTTAAATGCACATATTTGTTCTC
CTAAAATTACTCTTGGGTGGGTGATGTAATTGCCAATTCGCCTCCCTCTTCTCGCCACGTCGCGCTTCCGTC
GCTCTATCGGGGCTCCCTTAAGTTCGATATGCTACGACCTCGACCAACTGATAGGGATGTTTCGATGCATCG
CTGATACGGCTTCGCTTGACTGGATCCAGTCTA

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS (570 aa)

MEASHLTVATAFSDSDNGSSVCSGDAVPAPADSPAADLEALRRLSDNLSSVFQSPFEFCTDARITVAGSPPR

```

EVGAHRCVLSARSPFFREVFSAKREKGVPAKLELRELVRDLEVGYEALVAVLGYLYSGRVGGLPSVVCTCVDEE
CSHEGCRPAVDFMVEVLYASFTFQISELVNLFQRHLLDILEKVAIDDI PVILNVANLCSKSCARLLPKCIEIV
VRSDLDVAVTLKALPPDIVKQIIDLRISFGLVGPENSGFSDKHVKRIHRALDSDDVELIRMLLKEGHTSLDDS
YALHYAVAHCDISKITTELLDLGLADVNHRDPRGYTVLHMAAMRKEPKIIVSLLTKGARPSDLTLDGRKALQIS
KRLTKSVLDYNRYTEEGEASPKDRLCIEILEQAERRDPQIGEASVSLAMAGDDLGRLLYLENRVALARVLFPM
EAKVAMDIAQVDGTLGCTPNPSTTNQKTSVDLNETPFRIKEEHLARMKALSRTVELGKRFFPRCSEVLN
MIMDDDYAEFTSLGQDASEEKRKRYRELQDVLTKAFSEDKVEFDKSTISSSSSTSWSRI

```

3.3.6 ANALISIS *INSILICO* DE CnNPR1

La secuencia de aminoácidos presentó identidad con secuencias homólogas a NPR1 de especies como: *Elaeis guineensis*, *Phoenix dactylifera* y *Musa acuminata* (ver Cuadro 3.9).

Cuadro 3.9. Porcentaje de identidad presentada por CnNPR1 con secuencias homologas de NPR1 de otras especies.

Especie	Valor de E	Identidad
<i>Elaeis guineensis</i>	0.0	95%
<i>Phoenix dactylifera</i>	0.0	92%
<i>Musa acuminata</i>	0.0	76%
<i>Vitis vinifera</i>	0.0	68%
<i>Nicotiana tabacum</i>	0.0	66%
<i>Solanum tuberosum</i>	0.0	66%

3.3.7 ÁRBOL FILOGENÉTICO

El árbol filogenético se construyó con la finalidad de conocer la relación evolutiva entre las secuencias homólogas a NPR1 aisladas de cocotero con secuencia homólogas a NPR1 de especies como *A. thaliana*, *O. sativa* y *C. papaya* (Figura 3.6). El árbol estuvo compuesto por tres principales clados (I, II, III), respaldados con valores de bootstrap. El clado I agrupó CnNPR1 junto con AtNPR1, AtNPR2, OsNPR1. En el clado II, agrupó a CnNPR3 junto con AtNPR3, AtNPR4, OsNPR3, EgNPR3 y PdNPR3. Y por último en el clado III se agruparon las secuencias de AtNPR5, AtNPR6, OsNPR4 y OsNPR5 (Fig. 4). De acuerdo a esto, se puede inferir que ambas secuencias homólogas a NPR1 de cocotero, se encuentran cercanamente relacionadas con las secuencias homólogas de NPR1 de las especies antes mencionadas. Se puede observar que ambas secuencias de

cocotero mostraron estar más emparentadas con los homólogos de NPR1 de especies monocotiledóneas.

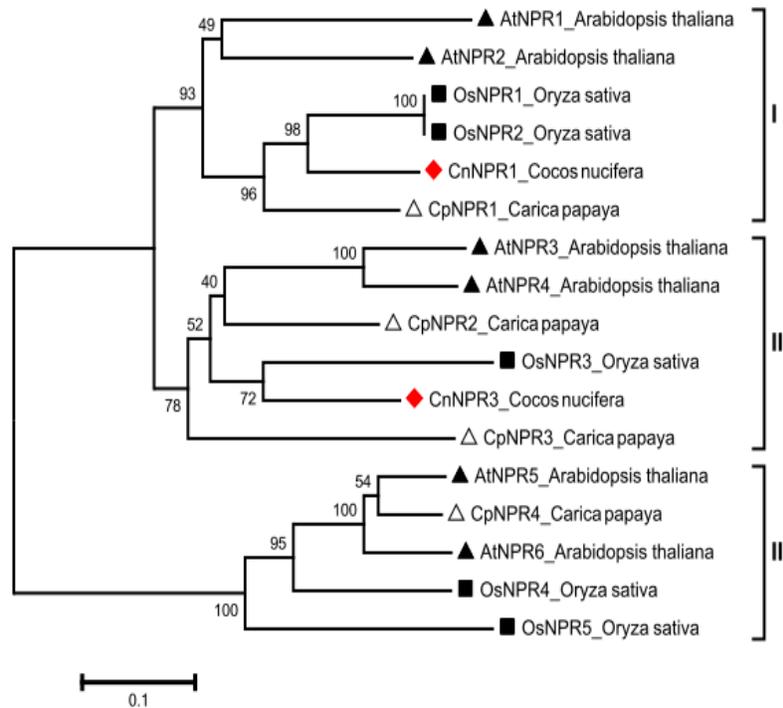


Figura 3.6. Árbol filogenético donde se puede apreciar las relaciones filogenéticas existentes entre las dos secuencias homólogas de NPR1 de *Cocos nucifera* (rombos rojos) y las secuencias de homólogo de NPR1 de *Arabidopsis thaliana* (triángulos negros), *C. papaya* (triángulos blancos) y *O. sativa* (cuadrados negros).

3.4 DISCUSIÓN

En 1994, Cao y colaboradores descubrieron una planta mutante de *Arabidopsis* que no respondía a los inductores de SAR (INA y AS). Posteriormente ellos le llamaron como NPR1 o “No expresor de genes PR1”. Mediante un mapeo génico se logró ubicar la secuencia del gen que había sido metilado y se logró dilucidar la estructura del gen. Y estudios posteriores demostraron que la sobreexpresión de NPR1 en plantas mutantes de *Arabidopsis*, restauraba la respuesta de defensa SAR. En base a estos trabajos, NPR1 fue considerado como el regulador positivo de la respuesta de defensa SAR en plantas

(Cao et al., 1994; 1997; 1998; Durrant & Dong, 2004). A partir de esos estudios, se han clonado y secuenciado secuencias homólogas a NPR1 en otras especies de plantas como son, arroz, papaya, cacahuete, musa, cacao (Yuan et al., 2007; Peraza-Echeverría et al., 2012; Wu et al., 2014; Endah et al., 2008; Zi et al., 2010), esto con la finalidad de saber si estos cultivos que son atacados por patógenos son capaces de activar una respuesta de defensa SAR.

Este capítulo reporta la amplificación y clonación del cDNA de un gen homólogo a la familia NPR, denominada *CnNPR1*, esto es, por la especie en la cual fue clonada. Esta nueva secuencia presentó los dos dominios conservados involucrados en la interacción proteína-proteína, el dominio BTB/POZ y el dominio repetido de ankirina (Cao et al., 1997; Mou et al., 2003; Mosavi et al., 2004; Stogios et al., 2005). Presentó también un sitio de localización nuclear (NLS), necesario para el importe de la proteína al núcleo (Kinkema et al., 2000), también se observaron varios residuos Cys, los cuales son necesarios para la transactivación de la proteína (Mou et al., 2003; Rochon et al., 2006). Filogenéticamente, esta secuencia de cocotero presentó homología con miembros de la familia NPR, principalmente con NPR1 y NPR2 de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Carica papaya*. Debido al alto porcentaje de identidad y a la homología presentada con NPR1 de *Arabidopsis* y Arroz, se puede inferir que CnNPR1 podría funcionar como un regulador positivo de la respuesta SAR en la palma de cocotero y actuar como receptor del AS (Cao et al., 1994; 1997; 1998; Wu et al., 2012; Yuan et al., 2007).

3.5 CONCLUSIONES

1. Se logró la amplificación y clonación molecular de una nueva secuencia homóloga de la familia de NPR en la palma de cocotero.
2. En base al análisis *in silico* y molecular, se logró caracterizar esta nueva secuencia, el cual, debido a su alto porcentaje de identidad y homología con NPR1 de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*, se le denominó CnNPR1.
3. Se logró identificar los dominios característicos de CnNPR1, dominio BTB/POZ y Ankirina, así como, un sitio de localización nuclear y varios residuos Cys.

CAPITULO IV

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE *CnNPR1* y *CnNPR3* EN PLANTULAS DE COCOTERO TRATADAS CON AS

4.1 INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado complicados mecanismos de defensa contra diferentes tipos de patógenos. Uno de ellos se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR). La activación SAR, se correlaciona con la expresión de genes relacionados a la patogénesis (*PR*). SAR está acompañada por un incremento en los niveles endógenos de AS y puede ser inducido por la aplicación exógena de AS o sus análogos INA y BTH (Durrant & Dong 2004; Makandar et al. 2006). *NPR1*, es un regulador positivo esencial de la expresión de genes inducidos por AS y SAR. Varios estudios han mostrado que la sobreexpresión de *NPR1* promueve resistencia a una variedad de bacterias y hongos patogénicos (Cao et al., 1994; Glazebrook et al., 1996; Ryal et al., 1997; Shah et al., 1997). *NPR1* o genes homólogos de *NPR1* juegan un papel principal en la resistencia sistémica adquirida en plantas (Durrant & Dong, 2004). *NPR1* es además funcionalmente conservado en diversas especies de plantas y algunas de estas secuencias de *NPR1* han sido depositadas en el GenBank.

El genoma de *A. thaliana*, posee 6 secuencias homólogas de *NPR1* y el genoma de arroz cuenta con 5 genes homólogos de *NPR1* (Chern et al., 2005; Hepwort et al., 2005; Yuan et al., 2007). Los análisis funcionales han revelado que los *NPR1*'s de otras especies u homólogos de *NPR1* de otras especies pueden tener diferentes funciones biológicas. *NPR1* y/o genes homólogo de *NPR1* confieren resistencia a enfermedades contra hongos y bacterias (Chern et al. 2001; Despre's et al. 2003; Malnoy et al. 2007; Yuan et al. 2007), pero algunos pueden estar involucrados en otros procesos biológicos.

Existen pocos reportes enfocados en el estudio de expresión de *NPR1* y sus homólogos. Entre las especies en las cuales se ha logrado caracterizar la expresión de homólogos de *NPR1* están, *Arabidopsis thaliana*, *Teobroma cacao*, *Nicotiana glutinosa* y *Musa spp. ABB*, donde se ha observado también un incremento en el nivel de sus transcritos ante agentes inductores como AS (Zhang et al., 2009; Zhao et al., 2008) o su análogo sintético

INA (Zhang *et al.*, 2006). En algunos casos, este incremento en la expresión, conlleva a un aumento en la resistencia a patógenos. Sin embargo, Zhang y colaboradores en el 2006, mostraron que una doble mutante de *npr3/npr4*, inducía resistencia a las plantas de *Arabidopsis thaliana* contra patógenos, por lo que es posible que estos genes estén actuando como reguladores negativos de SAR. Por otro lado, la caracterización de genes *NPR1* u homólogos en otras especies es mínima, con respecto a la amplia gama de patógenos que van surgiendo. A pesar de que existen, apenas algunos estudios con respecto a la expresión de genes homólogos a *NPR1* en plantas, el estudio de expresión de estos genes en especies monocotiledóneas es menor (Endah *et al.*, 2008).

En cocotero, se ha evaluado el efecto de AS contra el patógeno *Phytophthora capsici*, donde las plántulas de cocotero fueron tratadas con 1 M y 2.5 mM de AS de forma independiente, previo a la inoculación con este Oomiceto patogénico y también se determinó la presencia de un homólogo de *NPR1* en cocotero. Como resultado, las plantas tratadas con 2.5 mM de AS mostraron una mayor tolerancia a *P. capsici* en comparación con las plántulas control y también se obtuvo un fragmento de aproximadamente 200 pb el cual mostró homología con *NPR1* de *Arabidopsis* (Narváez Cab, 2010. Tesis de Maestría). Posteriormente se clonaron ambos extremos 3' y 5' terminales de este homólogo de *NPR1* y caracterizó *in silico* mostrando homología con *NPR3* de *Elaeis guineensis*, *Phoenix dactylifera*, *Oryza sativa* y *Arabidopsis thaliana*. Posteriormente, a esta nueva secuencia cDNA se le denominó como *CnNPR3*, debido a su alto porcentaje de identidad con genes *NPR3* (Nic Matos, 2012. Tesis de Maestría y Estudio reciente, capítulo II). De acuerdo a los antecedentes antes mencionados, se planteó como objetivo principal de este capítulo caracterizar los niveles de expresión del *CnNPR3* en plantas de cocotero previamente tratadas con 2.5 mM de AS empleando la técnica de PCR tiempo real.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal empleado para el tratamiento, fueron plantas *in vitro* de cocotero de la variedad Alto del Pacífico (AP), los cuales presentaban una talla aproximada de entre 25 y 30 cm de altura. Esta variedad de cocotero ha presentado resistencia a la enfermedad del amarillamiento letal (Zizumbo *et al.*, 2008), sin embargo, se desconoce si posee algún mecanismo de defensa involucrado en esta resistencia, motivo por el cual, esta variedad fue empleada para este estudio.



Figura 4.1. Imagen representativa del aspecto de una de las palmas sometidas al tratamiento con ácido salicílico.

4.2.2 TRATAMIENTO DE PLANTAS *IN VITRO* DE COCOTERO CON SA

Las palmas *in vitro* de cocotero fueron lavadas con agua estéril y transferidas a medio líquido Y3, el cual contenía 2.5 mM de SA. Las plantas fueron sometidas a tratamiento durante el tiempo que duró el experimento. Los tejidos de las plantas fueron cosechados en intervalos de tiempo que van desde las 0 horas hasta las 120 horas (0h, 42h, 48h, 72h, 96h y 120h). Para este ensayo, se emplearon tres plantas por cada tiempo, incluyendo los controles. Se tomaron como controles, las plantas que no fueron sometidas al tratamiento con SA (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Se observa el total de plantas sometidas al tratamiento con AS, así como el total de plantas control, también se muestran los tiempos empleados para la cosecha de los tejidos de hoja, tallo y raíz para el estudio de expresión del gen *CnNPR3* en la palma de cocotero.

Tiempo del tratamiento (horas)	Plantas Tratadas	Plantas Control
0	3	3
24	3	3
48	3	3
72	3	3
96	3	3
120	3	3
Total	18	18

El medio Y3 empleado durante el tratamiento con SA, contenía sacarosa sin carbón activado, debido a la capacidad del carbón de disminuir la absorción del SA. El ensayo se realizó en frascos de cristal (cajeteros) cubiertos con bolsas especiales que permiten el intercambio gaseoso (bolsas de polipropileno), evitando de esta manera la acumulación del gas etileno, el cual se sabe actúa como un regulador negativo de SAR. Las plantas sometidas estuvieron en contacto con el medio con SA y las plantas control al medio sin AS, hasta el tiempo en que los tejidos comenzaron a ser cosechados (Figura 4.2).

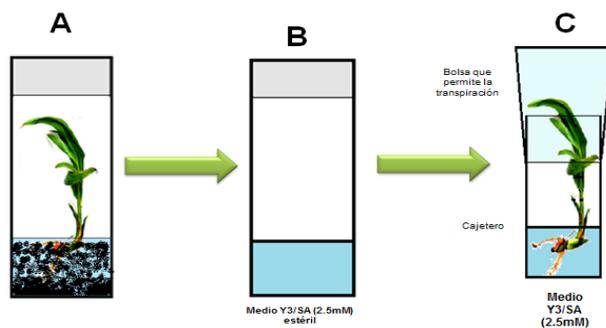


Figura 4.2. Esquema representativo del proceso de tratamiento de las plantas con AS. **A).** Planta antes de ser sometida al tratamiento con AS; **B).** Frasco conteniendo medio líquido Y3 estéril con 2.5 mM de AS; **C).** Imagen representativa de una planta sometida al tratamiento con AS.

Posteriormente, los tejidos de hoja, tallo y raíz fueron cosechados en los periodos de tiempo antes mencionados y puestos en congelación a -80°C hasta su posterior extracción del RNA (Figura 4.3).

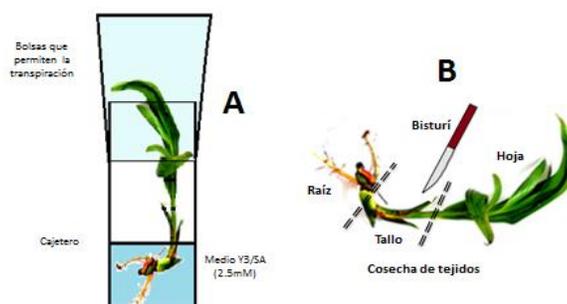


Figura 4.3. Imagen esquematizada del proceso de cosecha de los tejidos de las plantas tratadas A). Aspecto presentado por las plantas antes de ser cosechados; **B).** Imagen representativa del proceso de cosecha de cada uno de los diferentes tejidos.

4.2.3 EXTRACCIÓN DE RNA

La extracción del RNA, se realizó para los tejidos de hoja, tallo y raíz. El protocolo de extracción de RNA fue el mismo que el usado para la extracción del RNA que se empleó para el aislamiento del extremo 5' terminal del gen *CnNPR3* de cocotero (capítulo II).

4.2.4 TRATAMIENTO DEL RNA CON DNASA I

El RNA fue tratado con la enzima DNasa I (Ambión) para la eliminación del DNA contaminante. El tratamiento se realizó para un volumen de 30 μ L de RNA. El protocolo empleado fue el siguiente: primero se agregó 0.1 volumen del buffer 10X DNasa I (Ambión), luego 1 μ L de la enzima DNasa I y se mezcló suavemente. Posteriormente la muestra se incubó a 37°C por 1 hora. Después, se adicionó 0.1 volumen del inactivador (DNasa Inactivation Reagent) a la mezcla previamente incubada y se incubó nuevamente a temperatura ambiente (25°C) por 2 minutos. Por último, la muestra fue centrifugada a 11,000 rpm por 1 minuto y se recuperó el sobrenadante desechando la pastilla formada (inactivador). Las muestras tratadas fueron visualizadas en un gel de agarosa al 1%.

4.2.5 SÍNTESIS DE CDNA

El cDNA fue sintetizado con la enzima Retrotranscriptasa *SuperScript III* (Invitrogen), a partir de 1 μ g del RNA total, para un volumen total de 20 μ L, el cual contiene: 4 μ L del buffer 5X (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40, 50% (v/v) glicerol), 1 μ L de la mezcla de dNTPs (10 mM), 2 μ L de DTT (0.1 M), 1

μL de RNAsaOUT (40 U/ μL), 1 μL Random Primers (300 ng). La mezcla se incubó a 42°C por 1 hora y posteriormente se inactivó la Retrotranscriptasa a 70°C durante 15 minutos. Finalmente el cDNA fue amplificado con la sonda 18S, usado como un control interno para el estudio de expresión. El volumen de la mezcla de reacción y las condiciones de temperatura de amplificación se describen a continuación (Ver Cuadro 4.2 y 4.3).

Cuadro 4.2. Se observan los volúmenes empleados por cada reacción de amplificación empleando la sonda 18S.

Reactivo	Volumen x reacción
Agua	8.8 μL
Mater Mix	10 μL
Sonda-18S	0.2 μL
Templado	1 μL
Volumen total	20 μL

Cuadro 4.3. Condiciones de amplificación empleadas para la amplificación con la sonda 18S, usado como control interno para el estudio de expresión.

Temperatura	Tiempo	No. ciclos
50°C	2 minutos	1 ciclo
95°C	10 minutos	1 ciclo
95°C	15 segundos	40 ciclos
62°C	1 minuto	

4.2.6 DISEÑO DE SONDAS TAQMAN PARA EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN

Las sondas TaqMan fueron diseñadas a partir del alineamiento de secuencias de nucleótidos de genes homólogos que presentaron identidad con las secuencias de *CnNPR1* y *CnNPR3* en base al GenBank. Se emplearon las secuencias de: *Elaeis guineensis*, *Phoenix dactylifera*, *Musa*, *Brachypodium distachyon*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Vitis vinifera*, *Ricinus comunis*, *Populus trichocarpa* y *Glycine max*. El alineamiento se realizó con el programa CLUSTALX y fueron sombreadas con el programa BOXSHADE. El alineamiento ayudó a encontrar puntos divergentes en ambas secuencia de cocotero (*CnNPR1* y *CnNPR3*) para mayor especificidad de la sonda.

4.2.7 PRUEBAS DE AMPLIFICACIÓN DE SONDAS *CnNPR1*, *CnNPR3* y *18S*

Una vez sintetizadas ambas sondas (*CnNPR1*, *CnNPR3* y *18S*), se procedió con la estandarización de 2 principales condiciones de amplificación: la temperatura de hibridación y el volumen de la mezcla de reacción. Inicialmente, se probaron varios volúmenes para la mezcla de reacción, sin embargo, la siguiente mezcla fue la que mostró mejor resultado (Ver Cuadro 4.4).

Cuadro 4.4. Volúmenes de los reactivos empleados para la mezcla de reacción durante la amplificación de ambas sondas (*CnNPR3* y *18S*).

Sonda_ <i>CnNPR1</i>		Sonda_ <i>CnNPR3</i>		Sonda_ <i>18S</i>	
Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
Agua	6.5 µL	Agua	7.5 µL	Agua	7.8 µL
Master Mix	10 µL	Mater Mix	10 µL	Master Mix	10 µL
Sonda	0.5 µL	Sonda	0.5 µL	Sonda	0.2 µL
Templado	3 µL	Templado	2 µL	Templado	2 µL
Vol. total	20 µL	Vol. total	20 µL	Vol. total	20 µL

Master Mix. Mezcla de reactivos que contienen dNTP's, buffer, MgCl, Taq.

Posteriormente, al igual que los volúmenes de la mezcla, se probaron varias temperaturas de hibridación, hasta encontrar un protocolo de amplificación adecuado para el estudio de expresión (Ver Cuadro 4.5).

Cuadro 4.5. Protocolo de temperaturas empleadas durante las pruebas de expresión. Se observan también el tiempo y el número de ciclos.

Temperatura (°C)	Tiempo	No. ciclos
50	2 minutos	1
95	10 minutos	1
95	15 segundos	40
62	1 minuto	

Cabe señalar, que las condiciones de amplificación para la sonda *18S*, fueron las mismas que para la sonda *CnNPR1* y *CnNPR3*.

4.2.8 CURVA ESTÁNDAR PARA LA SONDAS *CnNPR1*, *CnNPR3* y *18S*

La curva estándar, es una manera de determinar la eficiencia de amplificación de la PCR tiempo real. La curva estándar fue realizada para las 3 sondas (*CnNPR1*, *CnNPR3* y *18S*). Se tomó una muestra de cDNA previamente amplificada con las sondas. Se realizó una serie de diluciones de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} . Los valores de Ct (ciclo umbral, por sus siglas en inglés) fueron graficados contra los valores de las diluciones.

4.2.9 ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE *CnNPR1* Y *CnNPR3* EN LOS TEJIDOS DE COCOTERO

Una vez optimizado las condiciones de amplificación, se procedió con el estudio de expresión de ambos genes *CnNPR1* y *CnNPR3*. La amplificación de las sondas se hizo por triplicado para cada tejido. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en el equipo Rotor-Gene Q (QUIAGEN).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 RNA EXTRAÍDO Y TRATADO CON DNASA I

En la figura 4.4, se visualiza un gel de agarosa al 1%, conteniendo el RNA previamente extraído del tejido de hoja de las muestras que fueron cosechadas a las 24 horas, tanto las plantas controles como de las plantas sometidas a tratamiento (Figura 4.4). Se observa, que el RNA extraído, resultó ser adecuado para los posteriores estudios de expresión, salvo, que estaban contaminados ADN genómico, por lo que fue necesario realizar un tratamiento con la enzima DNAsa I (Ambión).

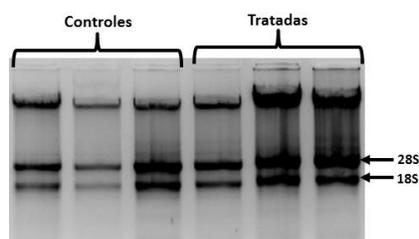


Figura 4.4. Imagen representativa de un gel de agarosa 1% fraccionado y conteniendo RNA extraído de tejido de hoja de las muestras cosechas a las 24 horas.

En la figura 4.5, se observa un gel de agarosa al 1%, conteniendo las muestras de RNA de los tejidos de hoja cosechadas a las 24 horas y después de ser sometidas a un tratamiento con la enzima DNAsa I, se puede verificar que no se presenta ninguna contaminación con ADN.

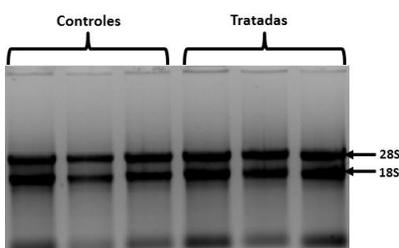


Figura 4.5. Imagen representativa de un gel de agarosa que muestra el RNA extraído de los tejidos de hoja cosechados a las 24 horas, después de ser sometidos a un tratamiento con la enzima DNAsa I, para la eliminación del ADN genómico.

4.3.2 cDNA SINTETIZADO

El cDNA para el estudio de expresión fue correctamente sintetizado (figura 4.6). En la imagen se observa la amplificación de cada uno de los cDNA's sintetizados y todos amplifican con un valor de Ct muy cercano entre ellos. Esto significa que son adecuados para el estudio de expresión. Otra característica es que, fueron amplificados con una sonda que será usada como control interno (18S), por lo que, es correcto que existan diferencias en el valor de Ct entre ellos.

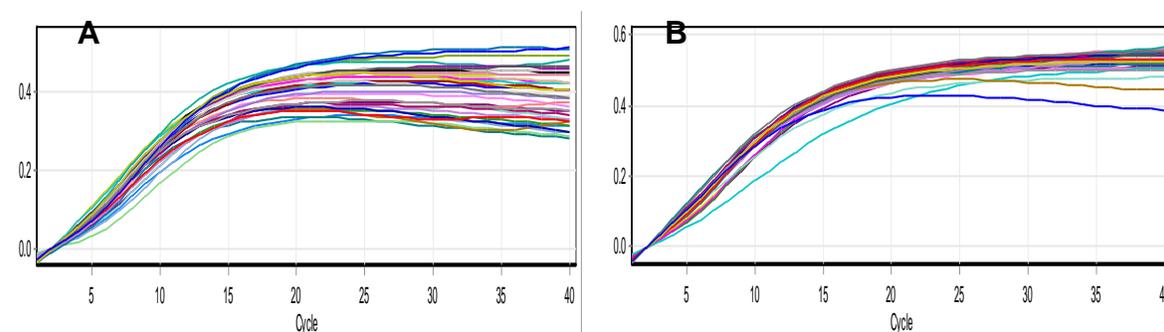
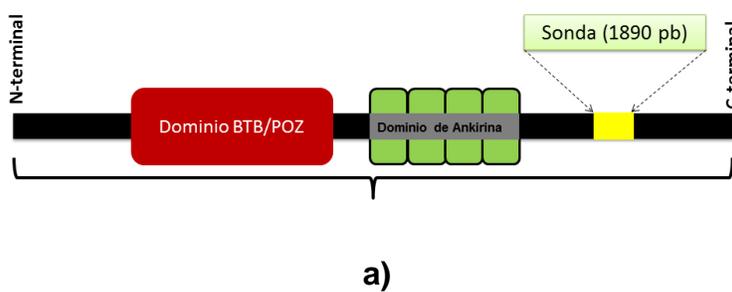


Figura 4.6. Imagen representativa de los productos de cDNA amplificados con la sonda 18S, junto. A). cDNA de hoja; B) cDNA de tallo

4.3.3 UBICACIÓN DE LAS SONDAS TAQMAN CnNPR1 Y CnNPR3

La sonda TaqMan-*CnNPR3* fue sintetizada por la compañía Applied Biosystem™. La sonda_ *CnNPR3* se ubicó en la región C-terminal del cDNA de *CnNPR3*, en el número de base 1890 pb, este sitio corresponde al lugar donde hubo mayor divergencia, de acuerdo al alineamiento realizado con secuencias homólogas de *NPR1* (figura 4.7).



```

>CnNPR3_2,184 pb (596 aa)
TCCTTAAGGGAAGAACCTATGGCCGATCGGGATCATAAGCAGTTCTTGCCTAGGTTCTTCC
TCTTGTGGGCGGTGTCTGGTTGCATGGGCCAACTAGCGGGAGCCCTCTCTTCTGTAA
GCGTCCACCTCTCTTCTAACCTCTCCAATGGCACAAGCGTCTATGCCCGCTCCCCCTC
CCGTTCTTCGCCCGGCCACCCGCCCTGCCCGTCGGCGCCCGGCCAACGAGGCCGGGGGC
AACCTCGAGGTGGTGAGCCTTGGCAAGCTGAGCTCCAACCTCGAGCGCCTCTCTCCACT
CCGAATTCGACTGCAGCGATGCCGAGATCGTCTCGAGGGCGCCCGGTCCGGCGTCCACCG
CTGCATCCTGGCGGCGAGGAGCCGTTCTTTCACGACCTTCTCCTCCGGCGCCGGCGCCGC
GCCGGTGGTGGATGTCGGCAGGAGGGAGGGAAGCCGAGGTACGAGATGAGTGAATGGTGC
CGCACGGCCGGGTCCGGCGGAGGCCCTTCAATGAAATTTTGGAGCTATTTGTACTGGGAA
GCTGAAGCCGCTCCGCCGAGGTGTCGGTGTGTGGATCCGATGTGCGCTCATGATGCT
TGCCCGCCTGCGATCACTTTCGTGGTGGAGTTGTTGTATGCGTCTGTGTTTCAGATTC
CAGAGTTGGTCTCTCTTTTGCAGCGTCGCCCTTCTCAACTTTGTGAGAAGGCTCTGTGGA
AGATGTAATCCCTATCCTTCTGGTTGCGGTACACTCACAACCTAATCAGTTACTTAGTCAC
TGATCAAAAAGGGTAGCAAGATCTGATCTGGACAATATCTCTTGGAGAAGGAGCTGCCGC
ATGAAGTTGCTGAGGAGATTAATCGATCCGCCTCAAAGCCCAGCCGATGAACCAAAATTC
CTTGATTTGAGACCCTGTACATGAGAAAAGAATTAGAAGAATCCATAGGGCCCTGGATTCT
GATGATGTTGAACCTGTGAAGTTGCTTCTTAGTGAATCAGACATCACTTTAGATGATGCCA
ATGCTACACACTATGCAGCTGCCTACTGTGATTCCAAAGTTGTAGCAGAGTTGTTAGAAT
GGGGTCATCTAATGTGAATCTGAAGAATCATAGAGGATACACACCCCTCCATTTAGCTGCC
ATGAGAAGGGAGCCAGCTATTATTGTTTCTTCTCACCAGGTTGCTTCTGCATCAGAAA
CAACATCTGATGGGCAGAGTGTCTGTTATGATTTGTAGGAGGCTAACAGGGCAAAGATTA
TAATCAAAGACTCAGCAGTGTCAAGAGTCAAATAAAGACCGGATATGCATTGACATTCTA
GAGAGAGAGATGCGGAGGAATCCCATGGCTGTGGAAAGACTCGGTACATCACCGTTATTAG
CTGATGACCTTCAAATGAAGCTTCTGTACCTGGAAAACAGAGTTGCATTTGCGAGATTATT
CTTCCCTGCTGAAGCCAAGGTAGCCATGGAATTCACAAAGCAGAGACAACATCAGAACTC
AGAGGTCTTTTACATCAAGGAGCTCAAGTAACCTGAGGGAGGTTGATCTGAATGAGACAC
CTACAATGCAGAACAAACGGCTACGTTCCGAGGGTTGATGCCCTTGTGAAAACAGTGGAGCT
GGGCAGGCGCTATTTCCACATGTTTCACAGTTTGGATAAGTTTCTCGAAGAAGACTTG
CACGATCTGTCTACCTTCAGAAGGGAACACCCGATGAGCAAAAGATCAAGCGGATGCGTT
TCTGCGAGTTAAAGGAGGATGTTCCGAAGGCCCTCAACCAGGACAAGGCTGATAGCGTCCG
CTCGGGGCTGCTTTCATCATCATCATCTCCTCCTCATTGAAGGGTGATCAGAGATTG
AAGGCTGTAATGAAGTTGTAGAGTTATTGTGGTACATGTATTATAGATAGATGCTACATG
AGGTGATATTAGCTGCCCTGAAATCTAAACCATCAGGAGAGGCTGCACATCAGAGTAGTTGC
TTTTTTTCGTGCTGCAGAACGATGTCATGAGTGTGTTGTTTCTTGCTCTCTCTCTCTCTC
TATTCCCTGGCCTTCCAGCATAACAGAACTGGAGCATGCTCTCAAAAAAAAAAAAAATAAGAAA
AACCCTTGTTCAATGCCGTTACGTAGCGAATCGAATTCGCCGCGACGC

```

b)

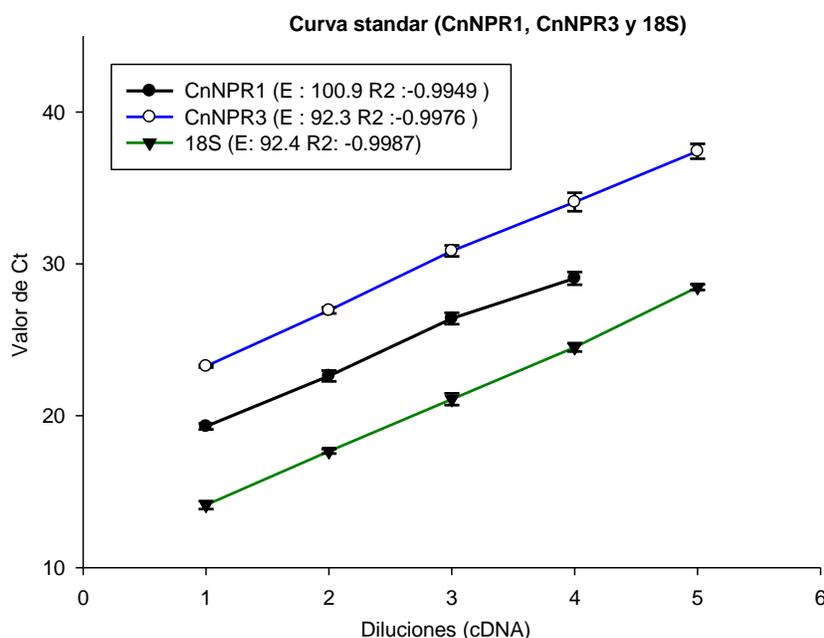
Figura 4.7. Imagen representativa de la ubicación de la sonda. A). Esquema ilustrativo de las regiones conservadas donde se muestra la ubicación de la sonda CnNPR3. B) Muestra la ubicación de la sonda en la secuencia de nucleótidos de *CnNPR3* (en amarillo) y la posición de los cebadores sentido (en verde) y antisentido (en rojo). Se observa el tamaño del amplicón que es de 90 pb.

Posteriormente, las sondas lograron amplificar de acuerdo a las condiciones probadas (mezcla de reacción y temperatura de hibridación), lo que significa que ambas sondas TaqMan se diseñaron correctamente (figura 4.10).

4.3.4 CURVA ESTÁNDAR PARA LAS SONDAS *CnNPR1*, *CnNPR3* y *18S*

La grafica de la curva estándar de las sondas, muestra que ambas poseen una buena eficiencia de amplificación y siguen una buena linealidad (Ver figura 4.9). Para el caso de

la curva estándar de la sonda CnNPR1, se obtuvo una eficiencia de 100.9% y un valor de R^2 de -0.9949. La sonda CnNPR3 obtuvo una eficiencia de amplificación de 92.3% y un valor de R^2 de -0.9976. Por último, la sonda 18S presentó una eficiencia de 92.4% y un valor de R^2 de -0.9986, y de acuerdo al manual de PCR tiempo real (BIO-RAD.



Applications Guide)
estos valores son muy buenos.

Figura 4.8. Imagen de la gráfica de la curva estándar de ambas sondas. Se graficaron los valores de Ct obtenidos de la amplificación de las diluciones del CDNA blanco.

De acuerdo a los datos observados en la figura 4.9, se puede determinar que para la sonda_CnNPR1, CnNPR3 y 18S, los productos amplificados por arriba de un Ct de 29, 37 y 28 serán considerados como negativos.

4.3.5 ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE *CnNPR1* y *CnNPR3*

Los niveles de expresión relativa de los genes *CnNPR1* y *CnNPR3* fueron determinados en plántulas de cocotero tratadas y no tratadas con SA. El qRT-PCR fue usado para conocer la distribución de los transcritos de ambos genes en los tejidos de hoja, tallo y

raíz, usando como control interno el gen *18S*. Los análisis fueron realizados a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h posterior al tratamiento. Los perfiles de expresión de *CnNPR1* y *CnNPR3* en la mayoría de los tejidos controles presentaron una expresión basal durante el periodo de la evaluación (Fig. 5A, 5B, 5C, 5E y 5F), con excepción del tiempo 0 h, en el tejido de tallo donde se observó un pico de expresión de *CnNPR3* (Fig. 5D).

Por otro lado, se observó que los niveles de expresión de *CnNPR1* y *CnNPR3* en los tejidos de las plántulas tratadas con SA presentaron cambios. En el tejido de hoja, se pudo observar un perfil para ambos genes que alcanzó un máximo de expresión a las 48 h para posteriormente disminuir. *CnNPR1* mostró un incremento del doble de expresión y *CnNPR3* mostró un incremento de cuatro veces comparado con el nivel basal. (Fig. 5A y 5B). Un segundo perfil fue observado en el tejido de tallo, donde el nivel de expresión de *CnNPR1* mostró un incremento en la expresión alcanzando un nivel máximo a las 96 h que luego disminuyó hasta alcanzar su nivel basal, mientras que en *CnNPR3* no se observó un cambio significativo (5C y 5D). Por último, un tercer perfil fue observado en el tejido de raíz, donde se observó un marcado nivel de expresión para ambos genes. Se observó que a las 0 h hubo un incremento alcanzando un pico máximo de expresión a las 48 h para luego disminuir hasta un nivel basal a las 96 y 120 h (Fig. 5E y 5F). *CnNPR1* presentó un incremento de aproximadamente ocho veces y *CnNPR3* mostró un incremento del doble. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y se determinó que correspondieron a *CnNPR1* y *CnNPR3*.

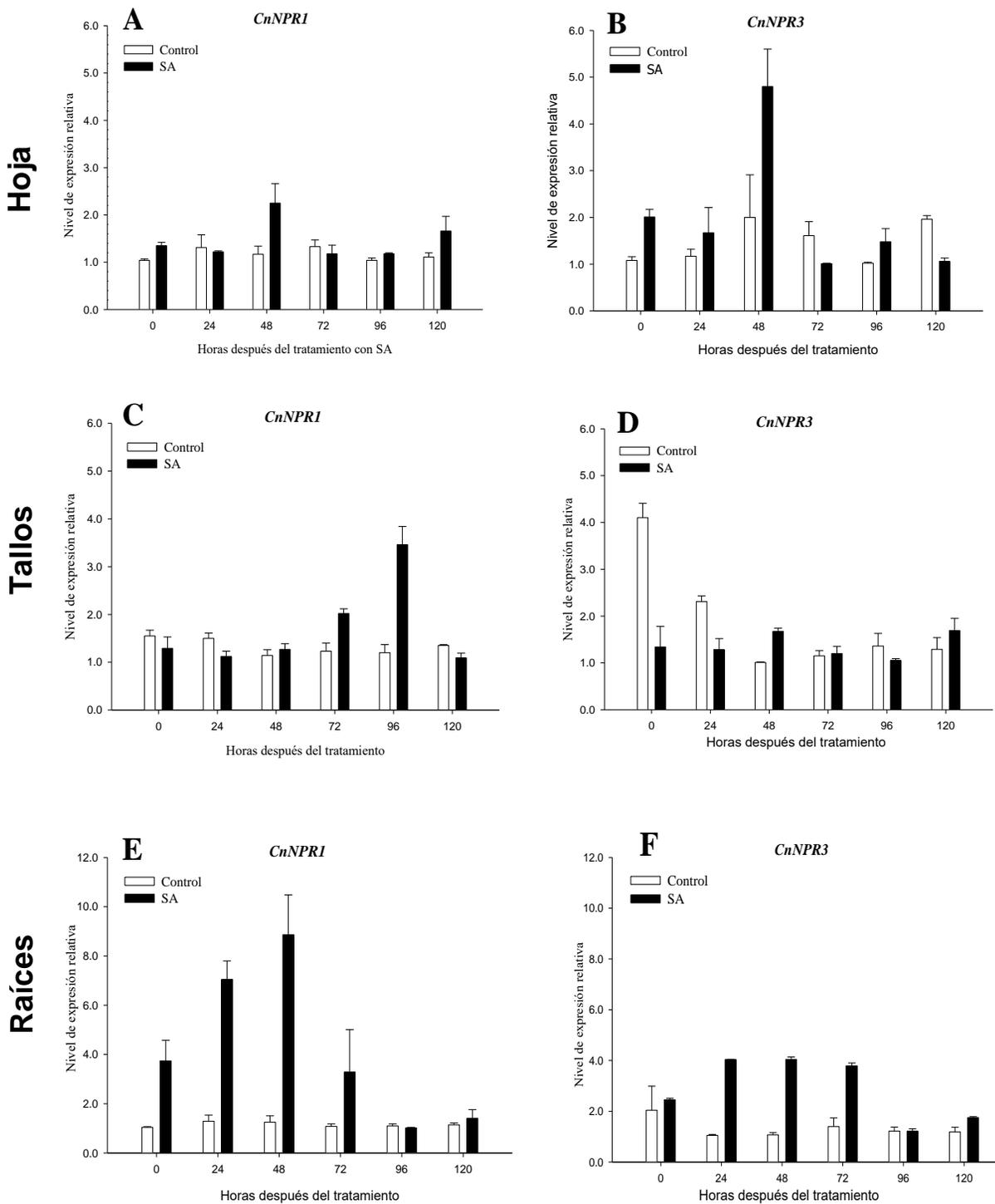


Figura 4.9 Perfiles de expresión del *CnNPR1* y *CnNPR3*. La expresión génica fue determinado por qRT-PCR en diferentes tejidos de plántulas de cultivo *in vitro* tratadas y no tratadas con ácido salicílico en diferentes tiempos. *18S* se utilizó como gen de referencia.

4.4 DISCUSIÓN

Múltiples estudios hechos en monocotiledóneas y dicotiledóneas han mostrado que el ácido salicílico juega un papel principal como molécula señal en SAR (Cao *et al.*, 1994; 1997; 1998; Le Henanff *et al.*, 2009). Después del ataque del patógeno, los niveles de SA incrementan local y sistemáticamente en plantas infectadas. Además, el SA es requerido para inducir la expresión de un conjunto de genes relacionados a patogénesis (*PR*) (Cao *et al.*, 1994). El regulador principal de esta resistencia mediada por SA, es el gen *NPR1*, funcionalmente conservado en diversas especies de plantas (Durrant and Dong, 2004), como: uva (Le Henanff *et al.*, 2009), tomate (Chen *et al.*, 2009), manzana (Malnoy *et al.*, 2007), banano (Endah *et al.*, 2008), algodón (Zhang *et al.*, 2008), tabaco (Liu *et al.*, 2002) y arroz (Yuan *et al.*, 2007).

Estudios previos han demostrado el papel que juega SA como regulador positivo en la ruta de señalización en la respuesta de defensa de las plantas y se ha observado que durante la activación de estas respuestas de defensa ocurre un incremento en los niveles de expresión de *NPR1* y sus homólogos confiriendo así resistencia a patógenos (Endah *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2009, Le Henanff *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2006, Malnoy *et al.*, 2007, Yuan *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2014). Los estudios de expresión relativa de *CnNPR1* y *CnNPR3*, presentados aquí, mostraron que ambos genes se encuentran expresados constitutivamente en los diferentes tejidos de las plántulas de cocotero en nivel basales. Sin embargo, la aplicación exógena de la fitohormona AS, fue capaz de modificar los niveles de transcritos de ambos genes en la palma de cocotero, tal como se ha observado en otros estudios (Endah *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009).

El tratamiento con SA incrementó significativamente los niveles de expresión de *CnNPR1* y *CnNPR3* a partir del tiempo de 0 h en los tejidos de raíz, lo cual indica que la expresión de ambos genes fue inducido positivamente por el tratamiento con SA. En comparación con los tejidos de hojas y tallos, las raíces fueron los tejidos que mostraron un mayor nivel de expresión para ambos genes. Este aumento del nivel de expresión en la raíz, pudo deberse por la manera en la cual fue aplicado el SA en las plántulas de cocotero, donde las raíces fueron los únicos tejidos que estuvieron contacto directo con el SA. Existen estudios que demuestran que la aplicación de SA por medio de las raíces, induce un aumento en la concentración de SA en comparación con los demás tejidos, aumentando

también la expresión de genes relacionados a patogénesis (Mandal et al., 2009, Spletzer & Enyedi, 1999). Por otro lado, estudios previos han demostrado que cuando los niveles de concentración de SA son elevados, se induce también un aumento en los niveles de expresión de *NPR1* y sus homólogos conducen a una rápida respuesta de defensa ante patógenos (Wu et al., 2014, Shao et al., 2013). Por lo que los presentes resultados pueden estar indicando que el SA podría funcionar como un activador de los niveles de expresión de *NPR1* y sus homólogos en la palma de cocotero.

4.5 CONCLUSIONES

En este capítulo, se logró concluir lo siguiente:

1. Se logró el diseño de 2 sondas TaqMan para el estudio de expresión relativa de los genes *CnNPR1* y *CnNPR3* en plántulas de cocotero previamente tratadas con AS.
2. Se logró optimizar la curva estándar de ambas sondas (*CnNPR1* y *CnNPR3*), determinando una buena eficiencia y linealidad.
3. Se logró determinar los niveles de expresión de los genes *CnNPR1* y *CnNPR3* en las plántulas de cocotero tratadas con 2.5 mM de AS.

CAPITULO V**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**

Authors: Germán Nic-Matos ¹, María Narváez ¹, Santy Peraza-Echeverría ¹, Luis Sáenz ¹, Carlos Oropeza ^{1,*}

Affiliation: ¹ Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. (CICY). Mérida, Yucatán, México.

***Corresponding author**

Address: Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Unidad de Biotecnología. Calle 43 No. 130 x 32 y 34. Chuburná de Hidalgo, CP. 97205, Mérida, Yucatán, México.

Tel: + (52) 999-942-8330 (Ext. 191)

E-mail: cos@cicy.mx

5.1 ABSTRACT

NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related gene 1) codes for a transcription cofactor involved in the activation of systemic acquired resistance, a salicylic acid (SA)-dependent defense response. This work reports the cloning and characterization of two new genes, *CnNPR1* and *CnNPR3* from coconut, homologous to *AtNPR1* of *Arabidopsis thaliana*. The cDNA deduced amino acid sequence contains the protein-protein interaction domains the BTB/POZ and ANKYRIN repeat domains, and a nuclear localization site (NLS). Phylogenetic analysis grouped *CnNPR1* in a clade with *AtNPR1* and *CnNPR3* in a clade with *AtNPR3*, both reported genes of *Arabidopsis thaliana*. Exogenous application of SA to coconut plantlets induced changes in the expression of *CnNPR1* and *CnNPR3* in leaf, stem and root tissues, providing evidence of their possible role in the signaling cascade leading to SAR in coconut palm. This is the first report on the cloning of putative key genes in the SAR-type defense mechanism in coconut palm.

KEYWORDS

Coconut Palm, NPR1, Salicylic acid, SAR.

5.2 INTRODUCTION

The coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is one of the most important crops in the tropical zones, where it is a source of food, drink, fuel, medicine and construction material (Harries 1978). Production of the coconut palm, on a worldwide scale, occupies 12,000 million hectares (FAO 2014). However, this production is severely affected by a number of pests and diseases, (Griffith 1987; Hanold and Randles 1991; Howard and Barrant 1989; Joseph and Radha 1975; Parthasarathy and Van Slobbe 1978; Rohde et al. 1990) most importantly the lethal yellowing of the coconut palm (LY), which is caused by phytoplasmas (Harrison et al. 1999). Ecotypes with resistance to the phytoplasmas causing LY, have been identified, but the molecular basis of this resistance remains unknown (Zizumbo-Villarreal et al. 2008).

At present, a number of studies focusing on elucidating the possible defense mechanisms prevailing in the coconut palm are available (Lizama-Uc et al. 2007; Nejat et al. 2015; Puch-Hau et al. 2015). However, the key genes capable of activating these defense mechanisms which could be used for the genetic improvement of this crop are unknown. Among these defense mechanisms, one of the most important is the systemic acquired resistance (SAR), which protects the plant from a wide spectrum of pathogens including viruses, phytoplasmas, bacteria, fungi and nematodes (Durrant and Dong 2004; Sánchez-Rojo et al. 2011). Activation of SAR is widely associated with an increase in the endogenous concentration of the phytohormone salicylic acid (SA), which activates a signaling pathway for the expression of pathogenesis-related genes (*PR*'s) involved in plant defense (Cao 1997; Cao et al. 1998; Durrant and Dong 2004). It has been observed that the exogenous application of synthetic SA analogues, such as 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) and benzothiadiazole-7-carbothionic acid (BTH) are capable of activating the SAR defense response (Durrant and Dong 2004; Makandar et al. 2006).

NPR1, known also as NIM1 (non-inducible immunity) or SA11 (salicylic acid-insensitive), is considered as the master regulator of SAR in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Cao

1997; Cao et al. 1994; Cao et al. 1998). Cao *et al.*, 1994, with the aim of identifying the key genes involved in the activation of SAR, were able to characterize a mutant of *npr1*, which exhibited a significant reduction in the expression of genes associated with defense (*PR1*, *PR2* and *PR5*) and increased the susceptibility to the pathogen *Pseudomonas syringae*; subsequent to this study; it was possible to observe that the over-expression of *NPR1* in the *Arabidopsis* plant led to an increase in resistance to diseases caused by the pathogens *P. syringae* and *Peronospora parasitica*, thus determining the function of the *NPR1* in the defense against pathogens (Cao et al. 1994; Cao et al. 1998). It has been reported that the over-expression of *NPR1* and its orthologs in different crops such as wheat, rice, apple, tomato, grapes and citrus fruits is capable of increasing the resistance to different pathogens (Cao et al. 1998; Chern et al. 2005; Chern et al. 2001; Dutt et al. 2016; Le Henanff et al. 2011; Lin et al. 2004; Makandar et al. 2006; Malnoy et al. 2007; Potlakayala et al. 2007; Zhang et al. 2010). Therefore *NPR1* represents a promising candidate for crop protection against pathogens.

NPR1 codes a protein which possesses a BTB/POZ domain in the N-terminal and an ANKYRIN repeat domain (ANK) in the central region; both regulate protein-protein interactions in animal proteins (Cao 1997; Stogios et al. 2005). The BTB/POZ domain facilitates the dimerization of *NPR1* and the ANKYRIN repeat domain is involved in the interaction with the sub-family of bZIP TGA transcription factors (Boyle et al. 2009). *NPR1*, also possesses several cysteine residues (Cys-82, Cys-216, Cys-521 and Cys-529) which are crucial to its activation (Rochon et al. 2006). It also has a nuclear localization site (NLS), which is necessary for the *NPR1* protein to be imported into the nucleus (Kinkema et al. 2000). Under non-induced conditions, the *NPR1* protein is found in the cytoplasm in an inactive state, forming an oligomeric complex of *NPR1* proteins maintained by disulfide bonds. However, when the cell is induced by the attack of a pathogen, the endogenous levels of SA rise and the cellular redox state is altered, resulting in the reduction of *NPR1* to its active monomeric state allowing this to migrate to the nucleus, where it acts as a transcription cofactor by joining with transcription factors of the TGA type, thus inducing the expression of *PR* defense genes (Mou et al. 2003).

In *Arabidopsis*, *AtNPR1* is part of a small gene family of six members which are grouped into three well-defined phylogenetic clades, *AtNPR1* and *AtNPR2* are grouped in clade I,

AtNPR3 and AtNPR4 in clade II and finally, AtNPR5 and AtNPR6 in clade III. All of these NPR1 type proteins possess a BTB/POZ domain and an ANKYRIN repeat domain, as well as their respective cysteine residues (Cys), directly involved in the redox control mechanism and in the activation of the protein (Rochon et al. 2006).

A number of studies have been carried out with the aim of determining the function of each member of the NPR family of *Arabidopsis* (Cao et al. 1998; Fu et al. 2012; McKim et al. 2008; Zhang et al. 2006). Recently, it was discovered that the proteins AtNPR3 and AtNPR4 function as SA receptors, and displaying differential affinity to this phytohormone, AtNPR3 with lesser affinity and AtNPR4 with greater affinity to SA. At the infection site, the concentration of SA increases, causing AtNPR3 to favor the degradation of AtNPR1 and the activation of a programmed cell death (PCD) at the site of the pathogen attack (Gust and Nürnberger 2012). In the sites more distal to the infection site, SA concentration is lower which is why in this case AtNPR4 shows greater affinity to SA, favoring the integrity of AtNPR1, blockage of the PCD and its function in SAR (Fu et al. 2012). With respect to NPR5 (BOP2) and NPR6 (BOP1), it has been reported that both genes possess functionally redundant roles in the control of organ development and symmetry of leaves and flowers (Hepworth et al. 2005; Jun et al. 2010; McKim et al. 2008; Norberg et al. 2005). However, a recent study determined that both genes (BOP1 and BOP2) are induced by methyl jasmonate and participate in some way in the defense response against pathogens (Canet et al. 2012).

The fact that there is no coconut genome sequence available so far has been a limiting factor for the study of key genes which directly regulate the signaling pathway of the defense mechanisms of this crop. Due to the important role played by *NPR1* and its homologues in the SAR defense response to the attack of pathogens in plants, this work reports the cloning and molecular characterization of the cDNA of two genes homologous to the *NPR* family in the coconut palm, as well as their expression profiles in response to the exogenous application of SA. These findings offer new opportunities for the genetic improvement of this crop.

5.3 MATERIALS AND METHODS

5.3.1 PLANT MATERIAL AND SALICYLIC ACID TREATMENT

In vitro plantlets of the coconut palm Mexican-Pacific Tall ecotype (MXPT), that is resistant to lethal yellowing, were used (Zizumbo-Villarreal et al. 2008). The plantlets were produced through somatic embryogenesis according to the protocol reported by Chan et al., 1998 (Chan et al. 1998). For the study of relative expression patterns, 36 plantlets were selected and classified into two groups (treated and controls). Treatment of the plantlets was performed with the application of SA (Sigma, USA) at a concentration of 2.5 mM to the Y3 culture medium without activated carbon. After the treatment, leaf, stem and root tissues were collected from each plantlet. Harvesting of the tissues was carried out in triplicate at different time periods: 0, 24, 48, 72, 96 and 120 h. The tissues were immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C until their subsequent use.

5.3.2 PCR AMPLIFICATION OF A GENOMIC DNA FRAGMENT OF *CnNPR1* AND *CnNPR3*

Leaf tissue of an *in vitro* coconut palm plant of the variety Mexican Pacific Tall (MXPT) was used for genomic DNA extraction, using a CTAB extraction protocol (Doyle 1990). Two pairs of primers were employed, designed from the conserved region of the nucleotide sequence of the *NPR1* gene from the species of *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum lycopersicum*, *Oryza sativa* and *Zea Mays* (Supplementary Table S1). The PCR was performed using two different amplification programs based on a PCR Touch-Down. For *CnNPR1*, the genomic DNA was denaturalized at 94°C for 5 min, followed by five cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 47°C and 1 min at 72°C, and a further five cycles with the above conditions, with the alignment temperature decreasing 2°C every 5 cycles, followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 55°C and 1 min at 72°C with a final extension at 72°C for 10 min. Subsequently, for *CnNPR3*, the DNA was denaturalized at 94°C for 5 min, followed by two cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 60°C and 1 min at 72°C, and a further two cycles with the aforementioned conditions, but with the alignment temperature decreasing 2°C every two cycles, followed by 25 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 52°C and 1 min at 72°C with a final extension at 72°C for 5 min, both programs were carried out using a Thermocycler Thermo-Hybaid (BIO-RAD). The purified products were cloned in pGEM-T

Easy Vector (Promega) and sequenced by the College of Biological Sciences ^{UC}DNA Sequencing Facility (UC Davis campus, California USA).

5.3.3 MAPPING THE 3' AND 5' ENDS OF *CnNPR1* AND *CnNPR3* cDNA's BY RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS (RACE)

Total RNA was extracted from plantlets leaves of coconut palm, cultured *in vitro*, using the Illustra RNAspin Mini RNA isolation kit (GE Healthcare), in accordance with the instructions of the manufacturer. The RNA was treated with the enzyme *Turbo*-DNase (Ambión) to remove the genomic DNA, according to the manufacturer's instructions. The SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) was used for cDNA synthesis and amplification of the 5' and 3' ends of both genes, in accordance with the manufacturer's instructions. The 5' and 3' ends of the cDNA of *CnNPR1* and *CnNPR3* were amplified using the primers NPR1-F2, NPR1-F3/NPR1-R2, NPR1-R3 and NPR3-F2, NPR3-F3 and NPR3-R2, NPR3-R3, designed from the sequences obtained from the genomic DNA (Supplementary Table S1). The temperatures for the amplification of the 3' end, employed for both genes, were: 94°C for 2 min, followed by five cycles of 94°C for 30 s, 72°C for 3 min, followed by five cycles of 94°C for 30 s, 70°C for 30 s, 72°C for 3 min, followed by 28 cycles of 94°C for 30 s, 68°C for 30 s and 72°C for 3 min and a final extension step at 72°C for 10 min. Subsequent to this, the temperature conditions used for the amplification of the 5' end of both genes were as follows: 94°C for 2 min, followed by five cycles at 94°C for 30 s, 72°C for 3 min, followed by five cycles at 94°C for 30 s, 70°C for 30 s and 72°C for 3 min, followed by 30 cycles at 94°C for 30 s, 62°C for 30 s and 72°C for 3 min with a final extension step of 72°C for 10 min. All amplification reactions of the terminal extremities were carried out using a Thermocycler Thermo-Hyaid (BIO-RAD).

5.3.4 CLONING OF THE COMPLETE cDNA's OF *CnNPR1* AND *CnNPR3*

In accordance with the sequences obtained from the 5' and 3'ends of the cDNA of both genes, two new pairs of primers were designed, CnNPR1-F/CnNPR1-R and CnNPR3-F/CnNPR3-R for the amplification of the complete cDNA of each gene (Supplementary Table S1). The PCR-reaction mixture contained 20 pmol of each primer, 500 ng of cDNA, 10 mM of each dNTP (Invitrogen), 2 mM of MgCl₂, 5x Mango *Taq* Colorless Reaction Buffer and 1.5 U of Mango *Taq* DNA Polymerase (BIOLINE) for a final volume of 25 µL.

Amplification temperatures initiated with a denaturalization at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles at 94°C for 1 min, 62°C for 1 min and 72°C for 3 min , and a final extension step of 72°C for 10 min. The amplified products were purified and cloned into the pGEM-T Easy Vector (Promega) and sequenced by the College of Biological Sciences ^{UC}DNA Sequencing Facility (UC Davis campus, California USA).

5.3.5 IN SILICO ANALYSIS OF THE cDNA's OF *CnNPR1* AND *CnNPR3*

The open reading frames of the coconut palm sequences (ORF) were determined with the ORF Finder program of the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>). The predicted protein sequences were aligned with the ClustalX version 1.81 program using the predetermined configuration (Thompson et al. 1997). Identical aminoacids were shaded in black and the conserved substitutions in grey, using the BOXSHADE program (<http://www.ch.embnet.org>). The conserved domains were determined with the InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) and SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) programs. The molecular weight and isoelectric point were predicted with the COMPUTE pI/Mw program (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html). The percent identity among the sequences was determined with the bioinformatic program Geneious version 9.0, employing homologous sequences of the NPR1 family of *A. thaliana*, *O. sativa*, *P. dactylifera* and *E. guineensis* from the database of the GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). The structural model of CnNPR1 and CnNPR3 was determined with the program SWISS_MODEL Workspace version 8.05 (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) with the automatic mode (Bordoli et al. 2009). The phylogenetic analysis and construction of the tree was performed with the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei 1987) employing the MEGA version 6.06 program (Tamura et al. 2013), using a bootstrap with 2,000 replicas. The phylogenetic analysis was carried out taking into account the amino acid sequences extending from the BTB/POZ domain to the ANKYRIN repeat domain of each sequence.

5.3.6 ANALYSIS OF *CnNPR1* AND *CnNPR3* EXPRESSION BY qRT-PCR IN DIFFERENT TISSUES OF COCONUT PALM PLANTLETS TREATED WITH SA

The extraction of RNA from leaf, stem and root tissue and the elimination of genomic DNA were carried out as described in section 2-3. RNA was quantified with the aid of the Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA). The first chain of cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using hexamers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in conjunction with the reverse transcriptase SuperScript III (Invitrogen), in accordance with the supplier's instructions. Subsequently, the quality of the cDNA was verified by the amplification of a 187 bp fragment, employing a probe designed from the *18S* gene (*Euk 18S rRNA*) (Supplementary Table S2).

Two TaqMan probes were designed, using the sequences of *CnNPR1* and *CnNPR3* nucleotides (Supplementary Table S2). The expression levels of the *CnNPR1* and *CnNPR3* transcripts in leaf, stem and root tissues treated with SA were determined by qRT-PCR. The reaction mixture of the qRT-PCR had a final volume of 20 µL and contained 2 µL of cDNA (1 µg), 10 µL of the PCR Master Mix (Applied Biosystem™) and 0.5 µL of the probe (*qCnNPR1* and *qCnNPR3*). A PCR product of 63 bp amplified by the *qCnNPR1-F* and *qCnNPR1-R* primers was used to test the specificity for *CnNPR1* and a product of 90 bp amplified by *qCnNPR3-F* and *qCnNPR3-R* for *CnNPR3* (Supplementary Table S2). The normalizer *Euk 18S rRNA* (Applied Biosystem™) was employed as internal control to normalize the expression data. The PCR product amplified by the normalizer *Euk 18S rRNA* was 187 bp (Supplementary Table S2). Each reaction was performed in triplicate in the Rotor-Gene Q (QIAGEN) under the following amplification conditions: 2 min at 50°C followed by 10 min at 95°C and 40 cycles of 15 s at 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), with the appropriate validation experiments (Real-Time PCR Applications Guide BIORAD). The results were expressed in relative expression units. The data represents the mean \pm standard deviation (SD) of three independent biological samples each by triplicate. Analysis of variance (ANOVA) with Tukey test as a post-hoc test ($P \leq 0.05$) was applied to relative expresión using PAST software (Hammer et al. 2001). The cDNA's were cloned and sequenced to determine the specificity of the amplified products.

5.4 RESULTS

5.4.1 ESTRUCTURAL ANALYSIS OF THE CnNPR1 AND CnNPR3 cDNA's AND THEIR DEDUCED PROTEINS

The products amplified by PCR with the two pairs of primers designed from consensus sequences of *NPR1* (NPR1-F1/NPR1-R1 and NPR3-F1/NPR3-R1) resulted in two different-sized products, 570 bp and 217 bp. Both fragments encoded open reading frame (ORF). The deduced amino acids of both fragments presented high similarity with proteins of the NPR1 family of *A. thaliana*, *E. guineensis*, *P. dactylifera* and *O. sativa*. Using the RACE technique, it was possible to amplify and clone the 5' and 3' ends of the cDNA of both genes. The first cDNA, denominated *CnNPR1* (GenBank accession no. KU926707) had a length of 2,223 bp and presented an ORF of 1,713 bp with a 5' untranslatable region (5'-UTR) of 148 bp and a 3' untranslatable region (3'-UTR) of 362 bp (Fig. 1A) (Supplementary Fig. S1). The second cDNA, denominated *CnNPR3* (accession number: KT456285), had a length of 2,184 bp and presented an ORF of 1,791 bp, with a 5' untranslatable region (5'-UTR) of 151 bp and 3' untranslatable region (3'-UTR) of 242 bp (Fig. 1B). The sequences were named according to the percentage of identity shown with their corresponding homologous sequences of *Arabidopsis thaliana* (Table 1). Both sequences code putative proteins; *CnNPR1* codes a protein of 570 amino acids and presents a molecular weight of 63.3 kDa with an isoelectric point of 5.29, and *CnNPR3* codes a protein of 596 amino acids with a molecular weight of 66.6 kDa and an isoelectric point of 6.59 (Supplementary Fig. S1).

CnNPR1 and *CnNPR3* sequences possess the characteristic domains of NPR1 family. *CnNPR1* presented a BTB/POZ domain in the N-terminal region (T61 to L186) and four ankyrin repeats in the central part (D290 to H320 and R324 to D353), it also presented an NPR1-like domain (K366 to K556) situated in the C-terminal region. *CnNPR3* also presented the BTB/POZ domain in the N-terminal region (C57 to V188) and the same number of ankyrin repeats in the central part (K264 to 292, D293 to L323 y R327 to E356); an NPR1-like domain was also observed (R369 to S570) situated in the C-terminal region, as with *CnNPR1* (Supplementary Fig. S1).

A comparison of the complete ORFs of *CnNPR1* and *CnNPR3* by means of a BLAST search in the GenBank database (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>) showed that they were highly similar to NPR1 sequences of dicotyledonous species (*A. thaliana*) and monocotyledonous (*E. guineensis*, *P. dactylifera* and *O. sativa*), suggesting that both sequences could be part of an NPR family in coconut palm. The sequence of amino acids of *CnNPR1* presented 95.1%, 90.4%, 65.1%, 47.7%, 43.7%, 43.1%, 42.3%, 41.7 and 41.5% of identity with *EgNPR1*, *PdNPR1*, *OsNPR1*, *AtNPR1*, *PdNPR3*, *CnNPR3*, *EgNPR3*, *OsNPR3* and *AtNPR3* respectively, (Table 1), while *CnNPR3* presented 86.8%, 84.8%, 55.2%, 54.9, 43.6%, 42.8%, 42.4% and 36.2% of identity with *EgNPR3*, *PdNPR3*, *AtNPR3*, *OsNPR3*, *EgNPR1*, *OsNPR1*, *PdNPR1* and *AtNPR1*, respectively, (Table 1).

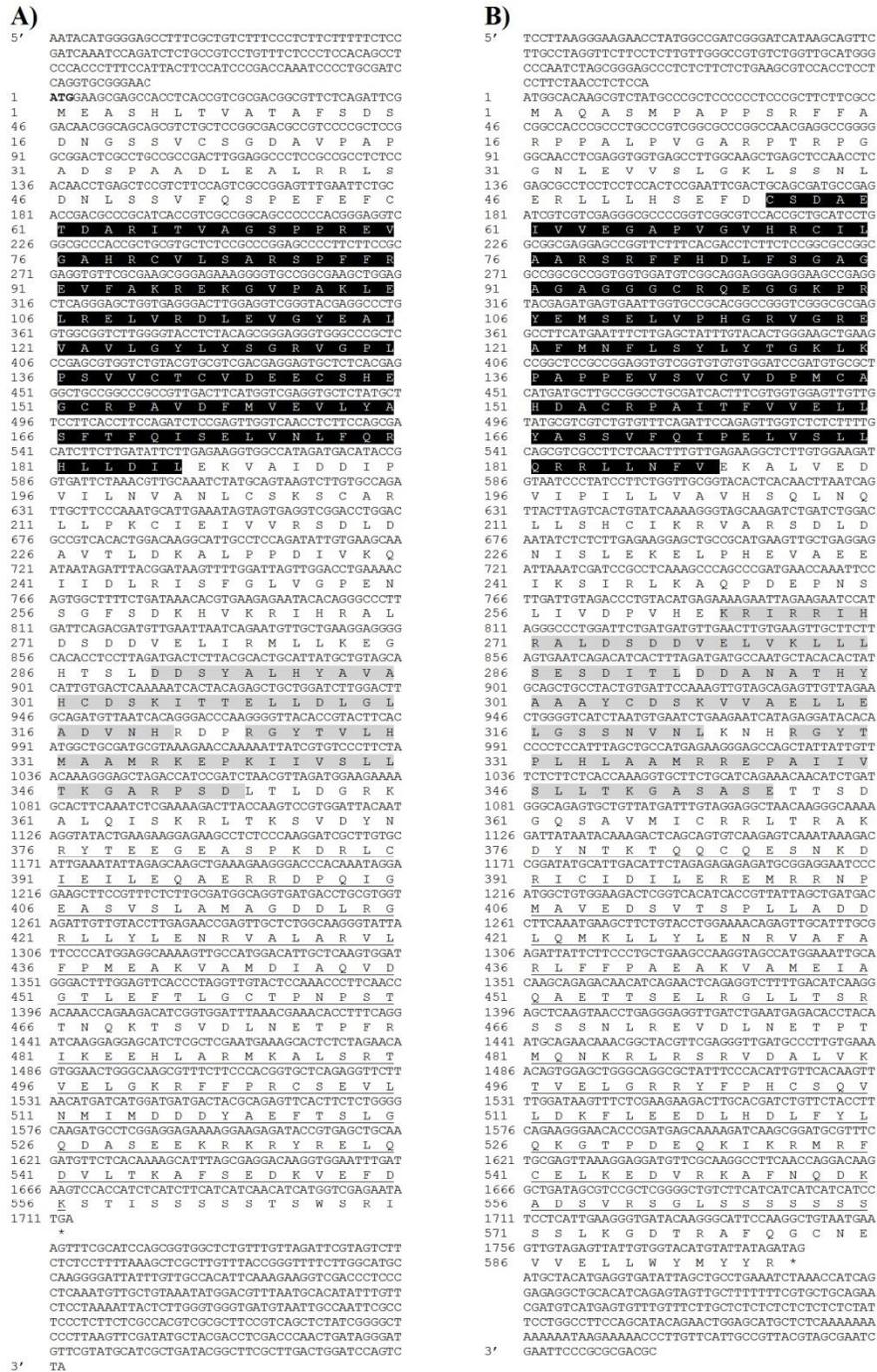


Figure 5.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of CnNPR1 (A) and CnNPR3 (B) of *Cocos nucifera*. Letters shaded in black indicate the BTB/POZ domains and those shaded in gray show the Ankyrin repeats. The NPR1-like domains are underlined. The asterisks represent the stop codons.

Table 5.1 Identity percentage of amino acids among the homologues of the NPR family of *C. nucifera*, *E. guineensis*, *P. dactylifera*, *Arabidopsis thaliana* and *O. sativa*. The boxes in gray indicate the highest identity percentages observed among the NPR1 type sequences of coconut palm and the NPR1 type sequences of *A. thaliana*, already functionally characterized.

SECUENCIAS HOMOLOGAS	CnNPR1	CnNPR3	EgNPR1	EgNPR3	PdNPR1	PdNPR3	AtNPR1	AtNPR2	AtNPR3	AtNPR4	AtNPR5	AtNPR6	OsNPR1	OsNPR2	OsNPR3	OsNPR4	OsNPR5
CnNPR1	100	43.1	95.1	42.3	90.4	43.7	47.7	47.4	41.5	41.7	25.7	25.2	65.1	65.1	41.7	25.3	24.7
CnNPR3		100	43.6	86.8	42.4	84.8	36.2	35.6	55.2	52.4	26.2	26.6	42.8	42.8	54.9	26.5	24.7
EgNPR1			100	42.7	90.9	43.9	47.5	47.1	41.7	41.7	26.1	25.8	65.5	65.5	41.9	25.5	23.7
EgNPR3				100	42.6	83.6	36.7	35.4	53.7	51.4	26.3	26.5	41.6	41.6	53.9	26.5	24.5
PdNPR1					100	43.7	47.9	46.9	41.0	41.2	26.1	25.7	64.5	64.5	40.9	25.3	23.5
PdNPR3						100	36.0	36.6	54.7	52.1	26.6	26.2	41.9	41.9	54.4	26.3	24.9
AtNPR1							100	56.8	34.4	36.2	22.0	23.0	44.6	44.6	36.9	22.3	21.8
AtNPR2								100	35.6	36.4	21.6	21.9	42.8	42.8	37	21.7	20.2
AtNPR3									100	68.1	24.4	24.4	38.6	38.6	44.0	24.4	21.2
AtNPR4										100	24.0	24.1	38.4	38.4	42.8	23.3	21.4
AtNPR5											100	74.1	25.5	25.5	23.5	66.5	55.9
AtNPR6												100	24.9	25.2	23.1	63.5	55.3
OsNPR1													100	99.5	40.1	25.5	23.4
OsNPR2														100	40.1	25.7	23.6
OsNPR3															100	23.0	22.5
OsNPR4																100	58.2
OsNPR5																	100

From the alignment, it was possible to determine that CnNPR1 and share with other NPR1-like sequences the two conserved domains involved in the protein-protein interaction (BTB/POZ and ANKYIRIN). Similarly, eight highly conserved Cys residues were identified in all the sequences. It was also possible to identify a nuclear location site (NLS) rich in basic residues in both sequences, situated in the C-terminal region (Fig. 2).

```

AtNPR1 1 MDTTIDGFADSYEISSTSFVAIDNIDSSIVYLAIFOVLTG-----PFIVS
CnNPR1 1 -----MEASHLTVAFAFSDSDNGISVCSGLAVPAP-----ADSPAADLE
EgNPR1 1 -----MEASHLTVAFAFSDSDNGISVCFGEAVPAP-----ADSPAADLE
PdNPR1 1 -----MEASQITVAFAFSDSDNGISVCFGLAVPAP-----ADSAAADLE
AtNPR3 1 -----MATLTFPSSSLSFITSSHFYSGSIGSNHFS-----SSSASNPEVV
CnNPR3 1 -----MAQASMPAPPSRFFARPPALFVG-----ARPTRPGGNLEVV
EgNPR3 1 -----MANLAEFPSSSLSVTSSSYLSNGISVYAAPPAPSPATALPSAPANEAGGSLFVV
PdNPR3 1 -----MANLAEFPSSSLSVTSSSYLSNGISVYAASPPAPE-----PAPPAGASLEVV
    
```

```

AtNPR1 45 AITQLLSNSFESWFDSPDFVSDAKLVIISIGRE---VSFHRCVLSARSEFFKSALAAAKKE
CnNPR1 40 AIRRLSDNLSSWFQSPDFEFCCTDARITVAGSPPREVGAHRCVLSARSEFFREVFA----
EgNPR1 40 AIR-RSDNLSSWFQSPDFEFCCTDARISVAGSPPREVGAHRCVLSARSEFFREVFA----
PdNPR1 40 AFRRLSDNLGSWFQSPDFEFCADARITVAGSPPREVGAHRCVLSARSEFFREVFA----
AtNPR3 40 SITKLSNLEQLLSNSDCDLS-DAELIVVGVF---VGVHRCVLAARSFFFDLEFKKE---
CnNPR3 37 SITKLSNLERILLHSEFDCS-DAELIVVGVF---VGVHRCVLAARSFFFDLEFCAGAG
EgNPR3 55 SITKLSNLERILLDSEFDCS-DAELIVVGVF---VGVHRCVLAARSFFFDLEFCAGAG
PdNPR3 48 SITKLSNLERILLDSEFDCS-DAELIVVGVF---VGVHRCVLAARSFFFDLEFCGG-
    
```

BTB/POZ DOMAIN

```

AtNPR1 102 ---KDSNNTAVKLELKEIAKDYEVGFVSVTVLAYIYISRVFPPKGVSECADENCCHV
CnNPR1 95 ---KREKGVPAKLELRELVRDLEVGYEALVAVLGYLYGRVGLFSPVVCTCVDEECSHG
EgNPR1 94 ---KREKGVPAKLELRELVRDLEVGYEALVAVLGYLYGRVGLSPVMVCRVCDEECSHG
PdNPR1 95 ---KREKGVPAKLELRELVRDLEVGYEALVAVLGYLYGRVGLPRVVCTCVDEECSHG
AtNPR3 93 ---KRLSKTEKPKYQLREMPYGAVTHEAFLYFLSYIYGRLEKPFPLEVSTCVDPVCSHD
CnNPR3 93 AGGGCRCEGKPRYEISELVPHGRVGREAFMNFLSYLYIGKLRBAPPEVSVCDPVCAGHD
EgNPR3 111 AGGGCRCEGKPRYEISELVPCGRVGREAFMNFLSYLYIGKLRBAPPEVSVCDPVCAGHD
PdNPR3 103 ---RRCEGKPRYEISELVPCGRVGREAFMNFLSYLYIGKLRBAPPEVSVCDPVCAGHD
    
```

```

AtNPR1 159 ACRPAIDFMEVLYLAFIFKIPPELLTLQRIILLDVPKVTEDTIVILKLANICGKACMK
CnNPR1 151 GCRPAIDFVVEVLYASFTFQISELVNLFQRIILLDIEKVAIDDPVILNVANICSKSCAR
EgNPR1 150 GCRPAIDFVVEVLYASFTFQISELVNLFQRIILLDIEKVAIDDPVILNVANICSKSCAR
PdNPR1 151 GCRPAIDFTIEVLYASFTFQISELVNLFQRIILLDIEKVAIDDPAILNVAKICSKSCAK
AtNPR3 150 CCRPAIDFVQVLYASSVLOVPELVSSFQRIILCNFVEKTLVENVDPIILMVAFNC--KLTO
CnNPR3 153 ACRPAIDFVVEVLYASSVFOIPELVSLQRIILNFVEKALVEDVPIILVAVHS--QLNQ
EgNPR3 171 ACRPAIDFVVEVLYASSVFOIPELVSLQRIILNFVEKALVEDVPIILVAVHS--QLNQ
PdNPR3 159 ACRPAIDFVVEVLYASSVFOIPELVSLQRIILNFVEKALVEDVPIIRVALHS--QLNQ
    
```

```

AtNPR1 219 LLDPCKEIIIVSNVDMVSLKSLPEELVKEIIDRRKELGLEVP-----KVKKHSNVH
CnNPR1 211 LLPKCIEIIVRSDDLDAVILKALPPDIVKQIIDRISLGLVGPEN---SGFSPKHVRIH
EgNPR1 210 LLSKCIIEIIVSDDLTVILKALPPDIVKQIIDRISLGLVGPEN---SGFSPKHVRIH
PdNPR1 211 LLPKCIEIIVSDDLTVILKALPPDIVKQIIDRISLGLVGPES---RDFPKHAKRIH
AtNPR3 208 LLDCCIERVARSDLIRFCIEKEVPEVAEKIKQIRLISPDDEETSPKISEKLLERIGIIL
CnNPR3 211 LLSKCIKRVARSDDLNTSLKELPHEVAEIKSRKKAQDFEPNSLIDPVHKKRIIRIH
EgNPR3 229 LLSKCIKRVARSDDLNTSLKELPHEVAEIKSRKKAQDFEPNSLIDPVHKKRIIRIH
PdNPR3 217 LRSKCIKRVARSDDLKISLKELPHEVAEIKSRKKAQDFEPNSLIDPVHKKRIIRIL
    
```

ANKYRIN DOMAIN

```

AtNPR1 272 RALSDDEIVKLLKEDHTNLDLDCALHFAVAYCNVKTATLLKLDLADVNHNRNPRGYT
CnNPR1 268 RALSDDVELIRMLLKEGHTSLDLSYALHYAVAHCDSKITTELLDLGLADVNHNDPRGYT
EgNPR1 267 RALSDDVELIRMLLKEGHTSLDLSYALHYAVAHCDSKITTELLDLGLADVNHNRNPRGYT
PdNPR1 268 RALSDDVELIRMLLKEGHTSLDLSYALHYAVAHCDSKITTELLDLGLADVNHNRNPRGYT
AtNPR3 268 RALSDDVELVKKLLTESDITLDCANLHYSVVYSDPKVVAELLALDVGDVNVRNSRGYT
CnNPR3 271 RALSDDVELVKKLLSES DITLDDANATHYAAAYCDSKVVAELLELGSSNVNDRNHRGYT
EgNPR3 289 RALSDDVELVKKLLSES DITLDDANATHYAAAYCDSKVVAELLELGSAVNLDKDRGYT
PdNPR3 277 RALSDDVELVKKLLSES DITLDDANALHYAAAYCDSKVVAELLELGSANVNDKVRGYT
    
```

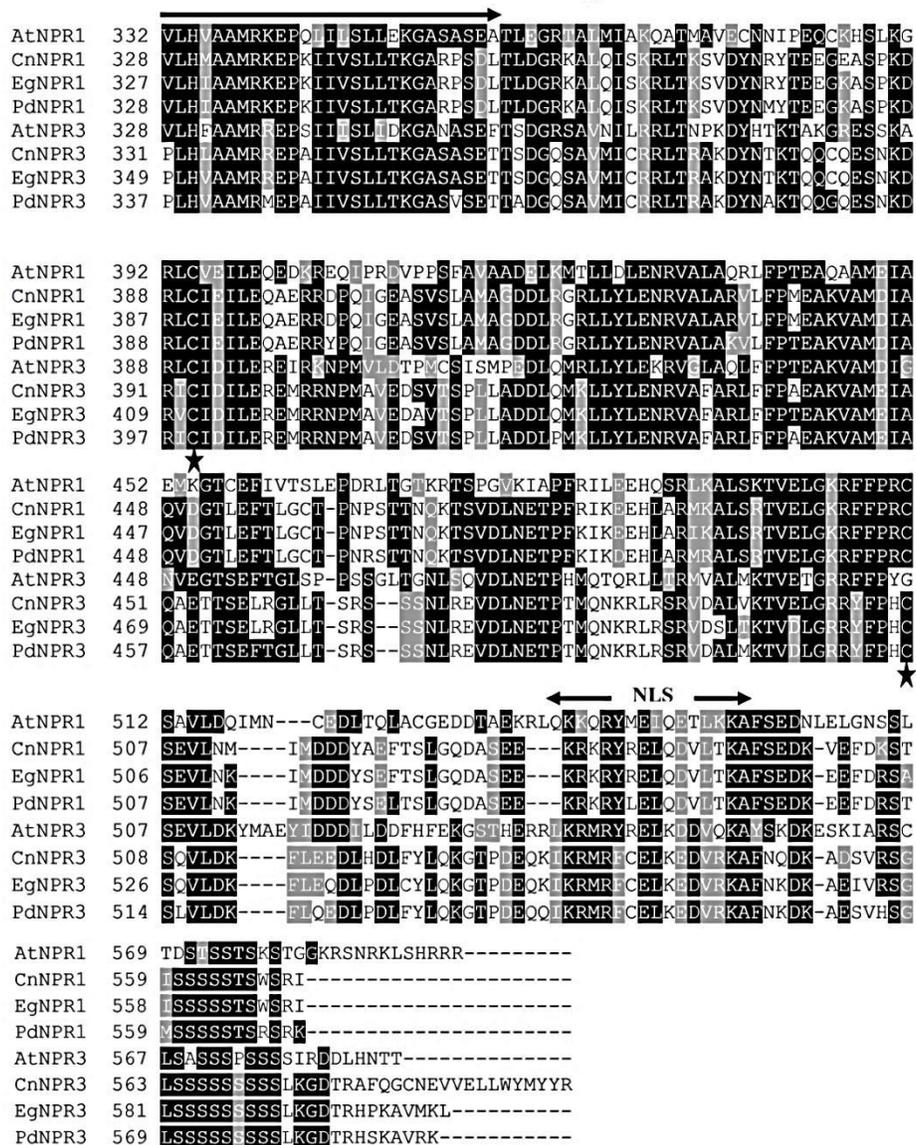


Figure 5.2 Comparison of CnNPR1 and CnNPR3 with other members of the NPR1 family from different plant species. The amino acids shaded in black indicate identical amino acids; the similar amino acids were shaded in gray. The BTB/POZ domain and an Ankyrin repeat domain are indicated with arrows. Various cysteine residues were observed, marked with asterisks (★) which control the oligomerization state (Rochon et al. 2006). A nuclear localization site was found, which is necessary for the nuclear localization of the protein (NLS) (Kinkema et al. 2000). CnNPR1 (KU926707), CnNPR3 (KT456285), AtNPR1 (NM015103), AtNPR3 (NM123879), EgNPR1 (XP_010915286), EgNPR3 (XP_010942675), PdNPR1 (XP_008782513) and PdNPR3 (XP_008787319).

Using crystallographic data of the human BTB/POZ domain of speckle-type (PDB Acc. No.3hqj) as a mold, it was possible to predict that the NPR1 proteins of *C. nucifera* possess the basic elements of the BTB/POZ domain topology and that they belong to the “long-form” class of BTB domains, due to the prediction of an additional α -helix in the N-terminal and two α -helices in the C-terminal regions of the proteins (Stogios et al. 2005).

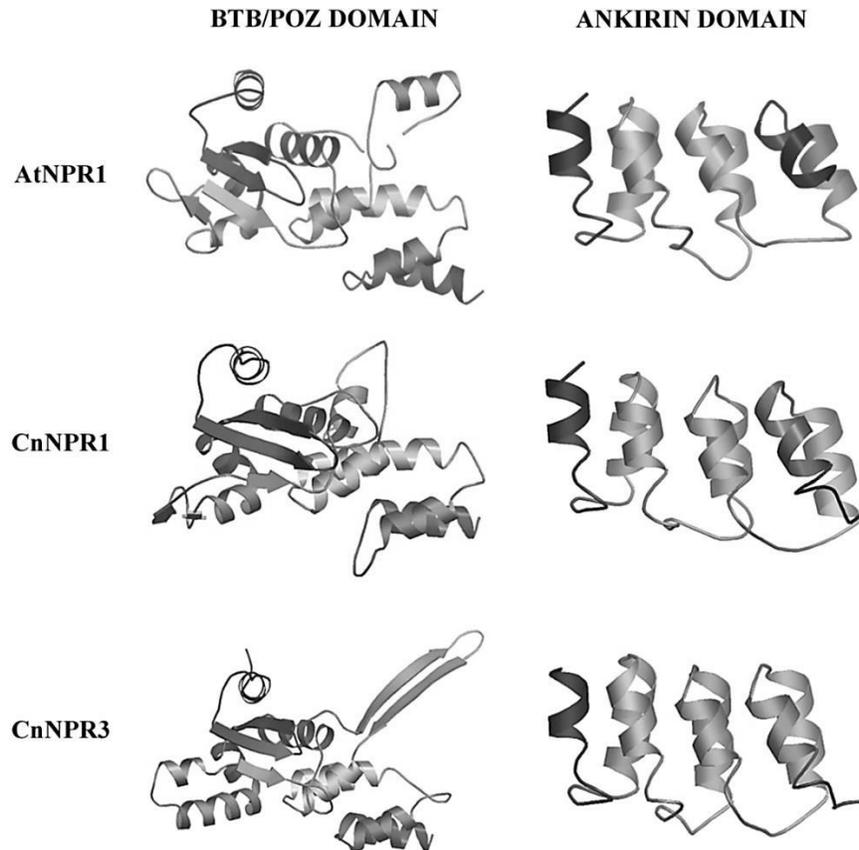


Figure 5.3 Predicted tridimensional structure of the NPR1 proteins of *Arabidopsis thaliana* and *C. nucifera*. The crystallographic data of the human BTB/POZ domain of speckle-type (PDB Acc. No. 3hqj) and the human ankyrin domain (PDB Acc. No. 1n11) were used as template.

The second domain observed in CnNPR1 and CnNPR3 was the Ankyrin repeat domain, where both proteins were seen to present three repetitions of ankyrin and a partial repetition with a α -helix, each one with a helix-turn-helix in their predicted 3D structures using the crystallographic data of the human protein (PDB Acc. No.1n11) as template (Fig. 3).

5.4.2 PHYLOGENETIC ANALYSIS OF CnNPR1 AND CnNPR3

The phylogenetic tree was constructed with the aim of determining the evolutionary relationships between NPR1 sequences isolated from coconut palm and the NPR1 sequences of species such as *A. thaliana*, *O. sativa*, *E. guineensis* and *P. dactylifera* (Fig. 4). The tree was composed of three main clades (I, II, III), grouping in clade I CnNPR1 together with AtNPR1, AtNPR2, OsNPR1, EgNPR1 and PdNPR1. CnNPR3 was grouped in clade II, together with AtNPR3, AtNPR4, OsNPR3, EgNPR3 and PdNPR3; and lastly, in clade III, the sequences of AtNPR5, AtNPR6, OsNPR4 and OsNPR5 were grouped together (Fig. 5.4).

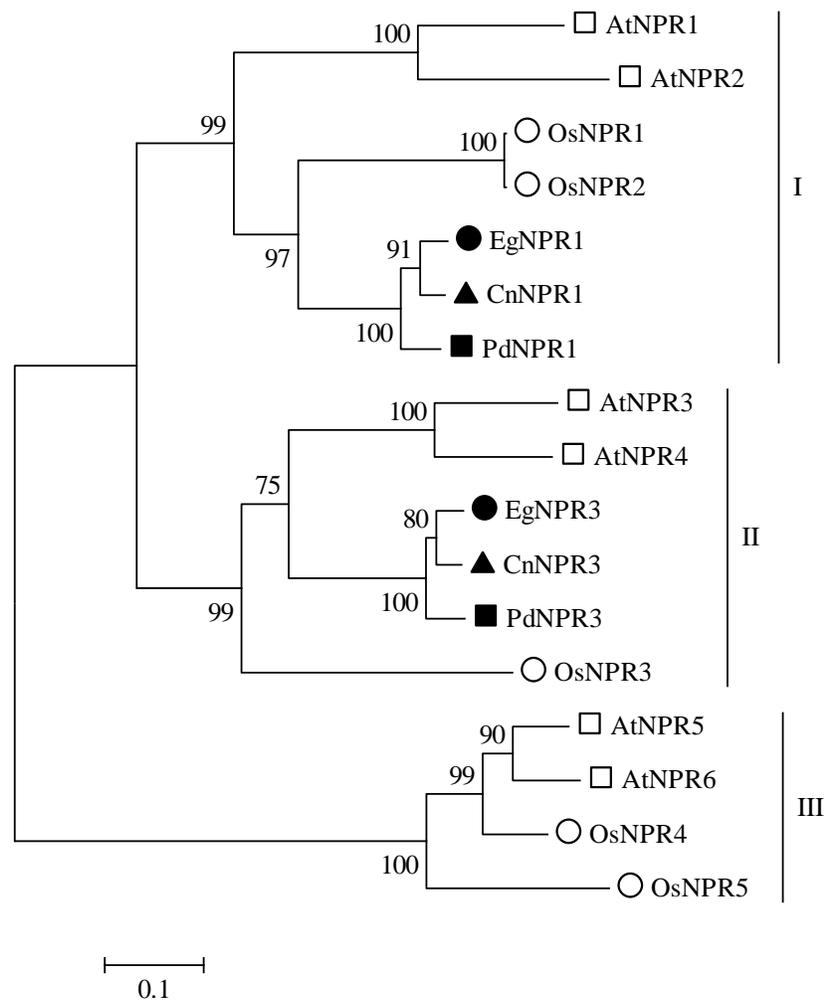


Figure 5.4 Phylogenetic analysis of NPR1 proteins and homologues of monocotyledonous and dicotyledonous plants. The phylogenetic tree was generated with the MEGA software version 6.06 using the method of Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987). The number on the nodes indicates the bootstrap percentage of 2000 replicates. The sequences of amino acids of NPR1 proteins and homologues employed for the construction of the tree are derived from the GenBank database under the following accession numbers: AtNPR1 (NP_176610), AtNPR2 (NP_194342), AtNPR3 (NP_199324), AtNPR4 (NP_193701), AtNPR5 (NP_181668) and AtNPR6 (NP_191272) of *A. thaliana*; CnNPR1 (KU926707) and CnNPR3 (KT456285) of *C. nucifera*; EgNPR1 (XP_010915286) and EgNPR3 (XP_010942675) of *E. guineensis*; PdNPR1 (XP_008782513) and PdNPR3 (XP_008806697) of *P. dactylifera*; OsNPR1 (ABE11614), OsNPR2 (ABE11615), OsNPR3 (ABE11618), OsNPR4 (ABE11620) and OsNPR5 (ABE11622) of *O. sativa*.

5.4.3 EXPRESSION PROFILES OF *CnNPR1* AND *CnNPR3* IN DIFFERENT TISSUES OF PLANTS TREATED WITH SALICYLIC ACID (SA)

The relative expression levels of the *CnNPR1* and *CnNPR3* genes were determined by qRT-PCR in leaf, stems and root tissues of coconut plantlets treatment and not treatment with SA. The *18S* gene was used as internal control. The analyses were performed at 0, 24, 48, 72, 96 and 120 h after the treatment. The expression profiles of *CnNPR1* and *CnNPR3*, in the majority of the control tissues, presented a basal expression during the period of evaluation (Fig. 5A, 5B, 5C, 5E and 5F), with the exception of 0 h time in the stem tissue where an expression peak of *CnNPR3* was observed (Fig. 5D).

In addition, it was observed that the expression levels of *CnNPR1* and *CnNPR3* in the tissues of plantlets treated with SA presented changes. In leaf tissue, a profile for both genes showed a significant difference at expression level at 48 h and subsequently diminished. *CnNPR1* showed an increase of double the expression and *CnNPR3* showed an increase of four times the basal level (Fig. 5A and 5B). A second profile was observed in stem tissue, where the expression level of *CnNPR1* showed a significant difference at 96 h which then diminished until reaching its basal level, whereas in *CnNPR3*, there was no significant difference between treatments (Fig. 5C and 5D). Lastly, a third profile was observed in the root tissue, where a significant expression level for both genes was found. At 0 h, there was an increase which reached a maximum expression peak at 24 h and 48 h and subsequently diminished to basal level at 96 h and 120 h (Fig. 5E and 5F). *CnNPR1* presented an increase of approximately eight times greater and *CnNPR3* showed a significant difference at 24, 48 and 72 h with nearly double the expression of the basal level. The amplified fragments were sequenced and it was determined that they corresponded to *CnNPR1* and *CnNPR3* (Supplementary Table S3).

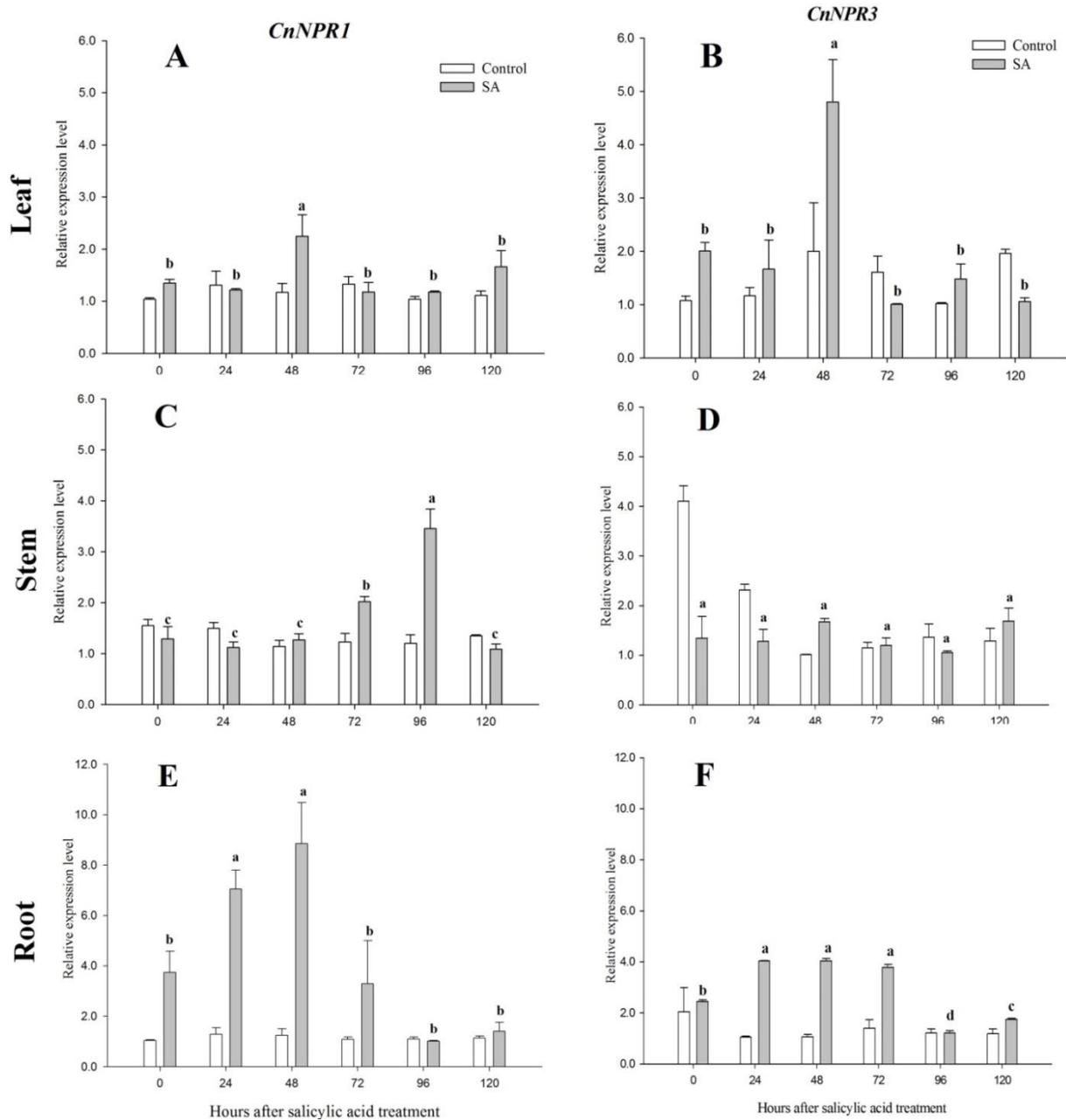


Fig. 5.5 Expression profiles of *CnNPR1* and *CnNPR3* in response to SA treatment. Gene expression was determined by qRT-PCR in different tissues from plantlets cultivated *in vitro* treated and not treated with salicylic acid in different times. *18S* was used as reference gene. Data represent the mean \pm standard deviation (SD) of three independent biological samples each by triplicate by treatment. Different letters denote significant differences at the 0.05 level according to Tukey test.

5.5 DISCUSSION

This study reports the first isolation and molecular characterization of genes *CnNPR1* and *CnNPR3*, homologous to *NPR1* from the coconut palm (LY resistant MXPT ecotype). These genes presented various characteristics which they share with *NPR1* and its homologues. The bioinformatic analysis of these two new sequences showed that both possess the two domains of protein-protein interaction, the BTB/POZ domain and the ANKYRIN repeat domain, highly conserved in the *NPR1*-type proteins of monocotyledon and dicotyledon plants (Cao 1997; Kinkema et al. 2000; Mosavi et al. 2004; Mou et al. 2003; Stogios et al. 2005). Both sequences were found to possess cysteine residues involved in the oligomerization of the *NPR1* protein and in its nuclear localization (Mou et al. 2003; Rochon et al. 2006). The presence of several basic amino acids was also identified in the C-terminal region of both sequences, which is characteristic of the nuclear localization sites (NLS) of *NPR1* and its homologues (Kinkema et al. 2000). The topology of the conserved domains, BTB/POZ and Ankyrin, found in both sequences of coconut palm, were similar to the topology presented by *AtNPR1* of *Arabidopsis thaliana* (Peraza Echeverría et al., 2012) (Fig. 3).

Sequences homologous to *NPR1* have also been reported for the oil palm (*E. guineensis*) and date palm (*P. dactylifera*) genomes sequences (Al-Mssallem et al. 2013; Singh et al. 2013), two monocotyledon species which are found to be phylogenetically related to the coconut palm (*C. nucifera* L). However, in these two cases, the sequences reported their corresponding cDNA's have not been isolated and they have not yet been functionally characterized.

Phylogenetically, both sequences of coconut palm presented homology with members of the *NPR1* family of *Arabidopsis thaliana* whose six members are characterized phylogenetically and functionally. The phylogenetic tree was composed of three main clades (I, II and III). According to the percentage of identity and the close phylogenetic relationship between *CnNPR1* and *AtNPR1*, grouped in clade I, it is possible to infer that *CnNPR1* functions as a positive regulator of the SAR defense response in the coconut palm and acts as a phytohormone SA receptor (Cao et al. 1994, 1997, 1998; Wu et al. 2012; Yuan et al. 2007), while *CnNPR3*, grouped in clade II together with *AtNPR3* and *AtNPR4*, could be involved in the negative regulation of the SAR defense response in

coconut palm, acting as an SA receptor and promoting the degradation of NPR1 in the effector triggered immunity (ETI) as in the case of AtNPR3. Although, the percentage of identity in CnNPR3 vs AtNPR3 was higher than CnNPR3 vs AtNPR4 (Table 1), we cannot rule out a possible role of CnNPR3 in the protection of CnNPR1 during SAR as in the case of AtNPR4 (Fu et al. 2012; Moreau et al. 2012; Zhang et al. 2006). The third clade grouped proteins which participate in the control of organ development and symmetry of leafs and flowers (NPR5/NPR6) (Hepworth et al. 2005; Jun et al. 2010; McKim et al. 2008; Norberg et al. 2005); however, in one study carried out, it was determined that they also participate in defense response induced by methyl jasmonate (Canet et al. 2012).

On the other hand, despite the use of sequences homologous to NPR1 of monocotyledon species (*P. dactylifera*, *E. guineensis* and *O. sativa*) and dicotyledon species (*A. thaliana*), both sequences of coconut palm were grouped exclusively with sequences of monocotyledon species (Fig. 4). Therefore it is not surprising that *CnNPR1* and *CnNPR3* present a high percentage of identity with sequences homologous to *NPR1* of these three monocotyledon species (oil palm, date palm and rice) (Table 1). Taking into account that NPR1 and its homologues have evolved from a common ancestor, we can speculate that CnNPR1 and CnNPR3 form part of a family of homologues of NPR1 in the coconut palm and may have similar functions in the defense response to the attack of pathogens.

Previous studies have demonstrated the role of SA as a positive regulator in the signaling pathway of plant defense responses and it has been observed that, during the activation of these defense responses, an increase in the expression levels of *NPR1* and its homologues occurs, thereby conferring resistance to pathogens (Endah et al. 2008; Le Henanff et al. 2009; Malnoy et al. 2007; Wu et al. 2014; Yuan et al. 2007; Zhang et al. 2006; Zhao et al. 2009). The studies of relative expression of *CnNPR1* and *CnNPR3*, presented herein, showed that both genes are expressed constitutively in different tissues of the coconut palm plantlets and do not present significant changes among them. However, the expression of both genes was modified by the exogenous application of the phytohormone salicylic acid (SA).

The treatment with SA significantly increased the expression levels of *CnNPR1* and *CnNPR3*, starting at 0 h in root tissues, indicating that the expression of both genes was positively induced by the SA treatment. In comparison with the leaf and stem tissues, the

root tissues showed a higher expression level for both genes. This greater increase of the expression level in the root could be due to the way in which SA was applied to coconut plantlets, being the roots the only tissues that were in direct contact with SA during treatment. At the same time these results indicate that SA is readily taken-up by roots and presumably distributed to other parts of the plant, since increased expression of *CnNPR1* and *CnNPR3* was found in all plant parts studied.

Previous studies reported that application of SA through the roots induced an increase in SA concentration in roots and other plant parts and a subsequent increase in the expression of genes associated with pathogenesis (Mandal et al. 2009; Spletzer and Enyedi 1999). In addition, other studies also reported that, when the levels of SA concentration are high, there was an increased expression of *NPR1* and its homologues, leading to a rapid defense response to pathogens (Shao et al. 2013; Wu et al. 2014; Zhang et al. 2010). Thus, the results presented herein could be indicating that the SA may function as an activator of the expression levels of the *NPR1* homologues *CnNPR1* and *CnNPR3* and that SAR defense mechanism is present and operating in the coconut palm.

In conclusion, this work reports for the first time the cloning of the complete cDNAs of *CnNPR1* and *CnNPR3*, two homologues in the coconut palm, and that the amount of transcripts of both genes are regulated positively by the phytohormone SA, which would suggest that *CnNPR1* and *CnNPR3* may be associated with the activation of the SAR defense mechanism against diseases in the coconut palm. However, further research has to be carried out to learn more about the possible role of these genes in SAR in coconut. In this respect, therefore, it would be possible to over-express these genes in the coconut palm, using a tissue specific promoter of coconut palm similar to the promoter of the *Arabidopsis thaliana AtSUC2* gene, which leads to a high, specific expression in the phloem tissue (Dutt et al. 2016). With this novel construct it would be possible to test the function of these genes in the resistance to the causal agent of LY disease, which is causing so much damage in several countries to the coconut palm that is nowadays a very important crop worldwide, both from the social and the economic points of view.

Acknowledgements: The authors would like to thank to C. Puch-Hau and I. Córdova-Lara, for their technical assistance. Partial funding of the research reported here was provided by CONACyT, Mexico (Grant No. CB 129717) and the Common Found for Commodities, Stanhouderskade 55, 1072 (FIG00 22). Germán Nic-Matos also thanks CONACyT for the scholarship awarded (No. 350913).

Compliance with ethical standards

Conflict of interests Germán Nic-Matos, María Narvaéz, Santy Peraza-Echeverría, Luis Sáenz and Carlos Oropeza declares that they have no conflict of interest with the contents of the manuscript.

Research involving human and animal participant This article does not contain any studies with human subjects or animals performed by any of the authors.

5.6 APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

All the supporting data are including as an additional files

Table S1. Sequence of the primers used for amplification of *CnNPR1* and *CnNPR3* cDNA's

Primer	Sequence (5'→3')	Applications
NPR1-F1	GAGCTTTTGGATCTCGCACTTGCAGA	Partial amplifications of <i>CnNPR1</i>
NPR1-R1	CCGAGCTCCACTGTTTTGGAGAGTGCT	
NPR1-F2	GGTATACTGAAGAAGGAGAAGCCTCTCC	3'-RACE- First round of PCR
NPR1-F3	ACAAATAGGAGAAGCTTCCGTTTCTCT	3'-RACE- Second round of PCR
NPR1-R2	AGAGAAACGGAAGCTTCTCCTATTTGT	5'-RACE- First round of PCR
NPR1-R3	GGAGAGGCTTCTCCTTCTTCAGTATACC	5'-RACE- Second round of PCR
CnNPR1-F	ATCCCCTGCGATCCAGGT	Total cDNA of <i>CnNPR1</i>
CnNPR1-R	TAACAAACAGAGCCACCGCT	
NPR3-F1	AGGCAYTGGAYTCDGATGATGTTGA	Degenerate primers
NPR3-R1	TCTYTHCKCATYGCAGCCAKRTGRAG	
NPR3-F2	CACTATGCAGCTGCCTACTGTGATTCC	3'-RACE- First round of PCR
NPR3-F3	TGCAGCTGCCTACTGTGATTCCAA	3'-RACE-Second round of PCR
NPR3-R2	GCTCTTTGGAATCACAGTAGGCAGCTGC	5'-RACE- First round of PCR
NPR3-R3	GGAATCACAGTAGGCAGCTGCATAGTG	5'-RACE-Second round of PCR
CnNPR3-F	CTCCTTCTAACCTCTCCAATGGCA	Total cDNA of <i>CnNPR3</i>
CnNPR3-R	CTGATGGTTTAGATTTTCAGGCAGC	
UPM	Long:ctaatacgactcactatagggc AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3', 5'-Universal Primer Mix
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	3', 5'-RACE-nested universal primer

Table S2. Sequence of primers and probes used for qRT-PCR

Specificity	Primer	Sequence (5'→3')	Amplicon
qCnNPR1	Forward	AGCGGTGGCTCTGTTTGT	63 bp
	Reverse	CCGGTAAACAAGCGAGCTTT	
	Probe	FAM-AAGGAGAGAAGACTACGAATCT-NFQ	
qCnNPR3	Forward	AAGGGCATTCCAAGGCTGTAAT	90 bp
	Reverse	CAGGCAGCTAATATCACCTCATGT	
	Probe	FAM-ACATGTACCACAATAACTCT-NFQ	
18S	Forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA	187 bp
	Reverse	GCTGGAATTACCGCGGCT	
	Probe	Not available	

Table S3. Blast results of qRT-PCR amplicons obtained with primers targeting CnNPR1 (amplicon of 63 bp) or CnNPR3 (amplicon of 90 bp).

Name	Size (bp)	Highest similarity with GenBank accessions	Query cover (%)	E-value	Identity (%)
CnNPR1	63	<i>Cocos nucifera</i> non-expressor of pathogenesis related protein 1 (NPR1) mRNA, partial cds.	100	9e-23	100
		<i>Cocos nucifera</i> non-expressor of PR-1 (NPR3) mRNA, complete cds.	100	4e-37	100
CnNPR3	90	PREDICTED: <i>Elaeis guineensis</i> regulatory protein NPR3-like (LOC105060589)	95	3e-26	93
		PREDICTED: <i>Phoenix dactylifera</i> regulatory protein NPR3-like (LOC103705401) mRNA	62	8e-08	84

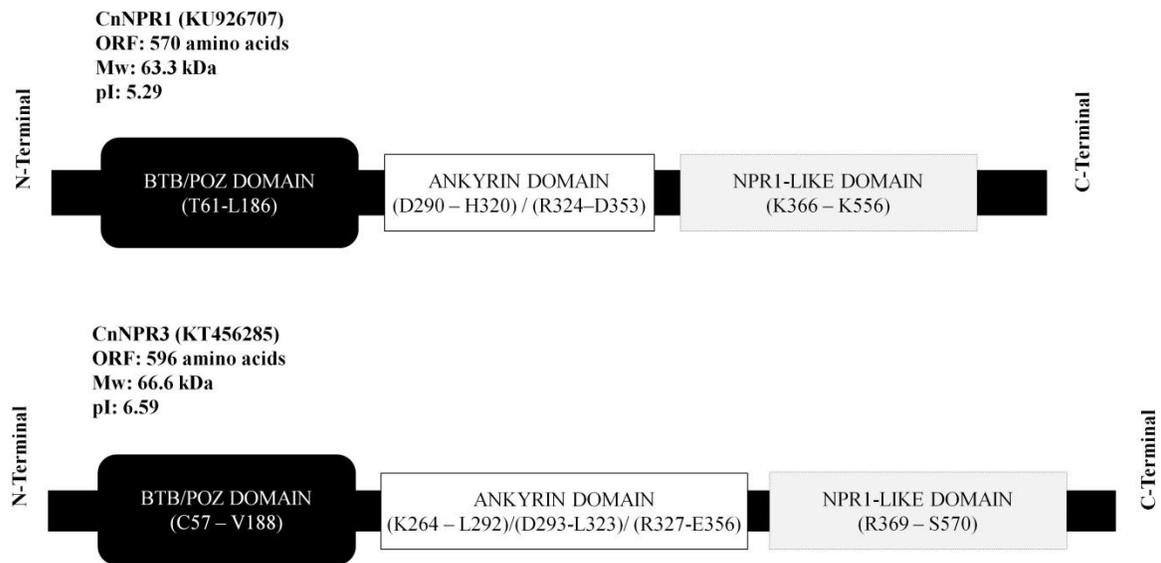


Figure S1 Structure of coconut CnNPR1 and CnNPR3 proteins. Both sequences possess a BTB/POZ domain (black box) and an ankyrin domain (white box). MW: Molecular weight; pI: Isoelectric point. Length of the ORF and GenBank accession number of each sequence are depicted in parentheses.

CAPÍTULO VI

6.1 DISCUSIÓN GENERAL

Desde los inicios de la agricultura, el hombre ha utilizado métodos para el control de las plagas que afectan los cultivos. Sin embargo, las plantas han desarrollado una compleja red de respuestas de defensa, que a menudo están asociadas con una respuesta local en el sitio de infección (Heath *et al.*, 2000; Durrant y Dong, 2004; Mur *et al.*, 2008). Esta respuesta de defensa también es sistemáticamente inducida en otras partes de la planta en un proceso conocido como resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) (Durrant y Dong, 2004; Dong, 2004; Mukhtar *et al.*, 2009). La inducción de SAR requiere la acumulación endógena de SA como molécula señal, el cual activa la expresión de genes *PR* mediado por un regulador maestro *NPR1* (No-expresor de genes *PR-1*), también conocido como NIM1 (Dong, 2004). La proteína *NPR1*, y sus parálogos contienen una secuencia de localización nuclear y dos dominios conservados de interacción proteína-proteína: un dominio BTB/POZ y un dominio repetido de ankirina (Cao *et al.*, 1997; Ryals *et al.*, 1997). *NPR1*, se encuentra localizada tanto en el citoplasma así como en el núcleo (Després *et al.*, 2000). El tratamiento con SA induce la monomerización de los oligómeros de *NPR1* en el citoplasma, permitiendo su translocación en el núcleo (Mou *et al.*, 2003) el cual es requerido para la inducción de genes *PR* (Kinkema *et al.*, 2000). El *NPR1* nuclear interactúa con varios factores de transcripción miembros de la familia de TGA's con dominio básico/cierre de leucinas (bZIP, por sus siglas en inglés) (Despre's *et al.*, 2000; Fan & Dong, 2002; Subramaniam *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000), así como con un grupo de pequeñas proteínas de desconocida función llamado NIMINs (Weigel *et al.*, 2001). El tratamiento de plantas con SA activa la expresión de un gran número de genes (Maleck *et al.*, 2000; Glazebrook *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2003). Entre estos, únicamente algunos son regulados por *NPR1* y además específicos para SAR (Van Loon, 1999). *NPR1* ha sido encontrado constitutivamente expresado en plantas no tratadas y ha sido moderadamente inducido mediante la aplicación de SA exógeno o análogo en otras plantas (Cao *et al.* 1997; Yuan *et al.*, 2007; Meura *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2007; Weigel *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2005).

Estudios previos han documentado que *NPR1* pertenece a una familia multigénica en el genoma de otras especies de plantas. Por ejemplo, en el genoma de *Arabidopsis thaliana*

existen 6 genes homólogos de *NPR1* y 5 en el genoma de arroz (Chern *et al.* 2005; Hepworth *et al.* 2005; Yuan *et al.* 2007). Posteriormente, desde el descubrimiento de este gen se han reportado la presencia de homólogos en varias especies de plantas (Zhao *et al.*, 2009; Endah *et al.*, 2008; Henanff *et al.*, 2008; Malnoy *et al.*, 2007; Yuexing *et al.*, 2007; Chern *et al.*, 2005; Radwan *et al.*, 2005; Ekengren *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002). Análisis funcionales han revelado que los NPR1's de diferentes especies de plantas u homólogos de *NPR1* pueden tener diferentes funciones biológicas. Muchos *NPR1* o genes homólogo de *NPR1* confieren un aumento a la resistencia a enfermedades contra hongos y bacterias patogénicos (Chern *et al.* 2001; Despre's *et al.* 2003; Malnoy *et al.* 2007; Yuan *et al.* 2007), pero algunos de estos están involucrados en otros procesos biológicos. Algunos de estos genes homólogos de *NPR1* actúan como reguladores positivos de respuestas de defensa, sin embargo, otros homólogos tal como NPR3 y NPR4 han sido descritos que actúan como reguladores negativos de respuestas de defensa en *Arabidopsis thaliana*(Endah *et al.*, 2008). A pesar de estos antecedentes, la información acerca de la existencia y expresión de genes homólogos de *NPR1* en monocotiledóneas todavía es limitado.

En base a estos antecedentes, este trabajo reporta la clonación y caracterización molecular del cDNA de 2 genes homólogos a la familia NPR de *Arabidopsis thaliana*. La primera secuencia tuvo un tamaño de 2,183 pb y presentó un marco de lectura abierto de 586 aminoácidos. La segunda secuencia tuvo un tamaño de 2,223 pb y un marco de lectura abierto de 570 aminoácidos. Ambas secuencias presentaron los dominios conservados, característicos de los miembros homólogos de la familia de NPR (BTB/POZ y Dominio repetido de ANKIRINA) (Cao *et al.*, 1997; Rochon *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Hepwort *et al.*, 2005). También presentaron los sitios de localización nuclear (NLS) (Kinkema *et al.*, 2000). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de ambos genes, con homólogos de *NPR1* de especies como, *O. sativa*, *Arabidopsis thaliana* y *C. papaya*, ayudó en la determinación de los dominios característicos de ambas secuencias. Ambas secuencias presentaron los residuos requeridos para la localización nuclear de *NPR1* en *Arabidopsis*, el cual es esencial para su función en la inducción de la expresión de genes relacionados a patogénesis (Kinkema *et al.*, 2000).

El análisis filogenético determinó que las 2 secuencias presentaron una cercana relación filogenética con las proteínas NPR1 y NPR3 de *Arabidopsis*. El árbol estuvo dividido en 3 principales clados (I, II y III). CnNPR1 se agrupó en el clado I, junto con NPR1 y NPR2, los cuales están directamente involucrados en respuesta de defensa ante patógenos (Cao et al., 1998). CnNPR3 se agrupó en el clado II, junto con NPR3 y NPR4, que de acuerdo a la literatura funcionan como reguladores negativos de la respuesta de defensa y además como receptores de la fitohormona SA (Zhang et al., 2006; Fu et al., 2012; Zi shi et al., 2013). Por últimos en el clado III, se agrupó NPR5 y NPR6, que participan directamente en el control del desarrollo de órganos y simetría de hojas y flores (Hepworth et al., 2005; Norberg et al., 2005; McKim et al., 2008; Jun et al., 2010). Sin embargo recientemente un estudio determinó que ambos genes son inducidos por el metil jasmonato y participan de alguna manera en respuesta de defensa contra patógenos (Canet et al., 2012).

En cuanto al nombre de estas dos nuevas secuencias de cocotero, se les nombró como *CnNPR1* y *CnNPR3*, debido a las letras iniciales del nombre científico de la especie en la cual fue aislada (*Cocos nucifera* L.), tal como se ha hecho con otros genes homólogos de *NPR1* aislados de especies como *Arabidopsis thaliana* (*AtNPR3*) y *Nicotiana glutinosa* (*NgNPR3*) (Cao et al. 1997; Zhang et al., 2009).

Continuando con la caracterización de *CnNPR1* y *CnNPR3*, se logró caracterizar la expresión de ambos genes en plántulas *in vitro* de cocoteros tratados con SA. De acuerdo a los datos obtenidos, se pudo observar que ambos genes se encuentran expresados en niveles basales y la aplicación exógena de SA es capaz de modificar los niveles de transcritos de ambos genes en los tejidos de la planta. Existen pocos reportes que hablan sobre el estudio de expresión de los genes homólogos a *NPR1*, y los reportes que existen, se basan en especies dicotiledóneas más que en monocotiledóneas. Por lo que este resultado ayudará a entender la forma en la cual este gen es regulado por SA.

En cuanto a otros miembros de la familia de NPR en cocotero, es difícil saberlo aún, debido a que el genoma de cocotero aún no ha sido secuenciado. Sin embargo, basándonos en especies cercanamente relacionadas a la palma de cocotero como arroz, que es una planta monocotiledónea, donde se ha reportado que posee una pequeña familia de cinco miembros (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002), podríamos deducir que en cocotero cabe la posibilidad de una familia de genes homólogos de *NPR1*. Existen otras

especies de palmas, como es el caso de palma aceitera y palma datilera que presentan algunos genes tipo-NPR1, pero que aún no han sido caracterizados funcionalmente. En plantas dicotiledóneas se han observado varias especies que poseen una familia de NPR, tal es el caso de *Arabidopsis thaliana* con 6 miembros reportados (The *Arabidopsis thaliana* Genome Initiative, 2005), *Populus trichocarpa* con 5 miembros (Tuskan *et al.*, 2006), *Vitis vinifera* con 2 miembros (Moroldo *et al.*, 2008; Jaillon *et al.*, 2007) y *Carica papaya* con 4 miembros (Peraza-Echeverría *et al.*, 2012).

6.2 CONCLUSIONES GENERALES

1. Se logró caracterizar 2 nuevas secuencias de la palma de cocotero denominados como *CnNPR1* y *CnNPR3*, que presentaron homología con miembros de la familia de NPR de *Arabidopsis thaliana*. Ambas secuencias presentaron los dominios característicos de esta familia de genes y estuvieron filogenéticamente relacionados con genes involucrados en respuesta caracterizados en otras especies.
2. Se observaron cambios en los niveles de transcritos de ambas secuencias en plántulas de cocotero al ser expuesta a SA exógeno. Estos resultados, sustentan el posible papel que juegan estos genes en la respuesta de defensa contra patógenos.

6.3 PERSPECTIVAS

Una perspectiva importante, sería la caracterización molecular de los promotores de estos dos genes, con el fin de conocer el papel que juegan en la activación de los mismos. Una manera de estudiar la activación de estos promotores, sería fusionarlos al gen reportero GUS (β -glucoronidasa) y transformar plantas de *Arabidopsis*. Posteriormente, estas plantas transformadas podrían ser retadas con varios agentes patogénicos e inductores y así determinar qué tipos de patógenos son los que activan a estos genes, esto, nos ayudaría a entender de alguna manera, las diferentes rutas de activación de las respuestas de defensa mediada por los genes *NPR1* en la palma de cocotero.

Debido a la falta de un protocolo de transformación eficiente y de un sistema de inoculación adecuado en el cultivo de cocotero, resulta difícil hacer uso del cocotero como un modelo para llevar a cabo la inmediata y completa caracterización funcional de estos dos genes. Sin embargo, posteriormente se pretende usar la planta modelo de *Arabidopsis* como un sustituto para caracterizar la funcionalidad de estos genes. Para esto, se realizaría la sobreexpresión de *CnNPR1* y/o *CnNPR3* en plantas mutantes de *Arabidopsis npr1* y/o *npr3* con la finalidad de determinar si uno o ambos genes podrían restaurar la activación de genes PR y SAR ante la infección por patógenos

- Albertazzi, G., Milc, J., Caffagni, A., Francia, E., Roncaglia, E., Ferrari, F., & Pecchioni, N. (2009). Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. *Plant Science*, 176 (6), 792-804.
- Al-Mssallem, I. S., Hu, S., Zhang, X., Lin, Q., Liu, W., Tan, J., & Yin, Y. (2013). Genome sequence of the date palm *Phoenix dactylifera* L. *Nature communications*, Vol. 4.
- Beakbane, B., Slater, C. H., & Posnette, A. F. (1972). Mycoplasmas in the Phloem of Coconut, *Cocos nucifera* L., with Lethal Yellowing Disease. *Journal of Horticultural Science*, 47 (2), 265-265.
- Bellés, J. M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J., & Conejero, V. (1999). Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Molecular plant-microbe interactions*, 12 (3), 227-235.
- Bent, A. F., & Mackey, D. (2007). Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45, 399-436.
- Bertaccini, A. (2006). Phytoplasmas: diversity, taxonomy, and epidemiology. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12, 673-689.
- Blanco, F., Garretón, V., Frey, N., Dominguez, C., Pérez-Acle, T., Van der Straeten, D., & Holuigue, L. (2005). Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 59 (6), 927-944.
- Bliffeld, M., Mundy, J., Potrykus, I., & Fütterer, J. (1999). Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 98 (6), 1079-1086.
- Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J., & Schwede, T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature protocols*, 4 (1), 1-13.
- Boyle, P., Le Su, E., Rochon, A., Shearer, H. L., Murmu, J., Chu, J. Y., ... & Després, C. (2009). The BTB/POZ domain of the *Arabidopsis* disease resistance protein NPR1

- interacts with the repression domain of TGA2 to negate its function. *The Plant Cell*, 21 (11), 3700-3713.
- Brown, S. E., Been, B. O., & McLaughlin, W. A. (2006). Detection and variability of the lethal yellowing group (16Sr IV) phytoplasmas in the *Cedusa* sp.(Hemiptera: Auchenorrhyncha: Derbidae) in Jamaica. *Annals of Applied Biology*, 149 (1), 53-62.
- Canet, J. V., Dobón, A., Fajmonová, J., & Tornero, P. (2012). The BLADE-ON-PETIOLE genes of *Arabidopsis* are essential for resistance induced by methyl jasmonate. *BMC plant biology*. 12 (1), 199.
- Cao, H., Bowling, S. A., Gordon, A. S., & Dong, X. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 6 (11), 1583-1592.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J. D., Volko, S., & Dong, X. (1997). The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88 (1), 57-63
- Cao, H., Li, X., & Dong, X. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95 (11), 6531-6536.
- Catinot, J., Buchala, A., Abou-Mansour, E., & Métraux, J. P. (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *Febs Letters*, 582(4), 473-478.
- Chan, J., Saenz, L., Talavera C., Hornung R., Robert M., Oropeza, C. (1998). Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 17:515-521
- Guan-Shui, C. H. E. N., Yi-Fei, Z. H. O. U., Sheng, L. I. N., Zhang, Z., & Da-Ren, P. A. N. (2009). Isolation and Characterization of IbNPR1 Gene from Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *Acta Agronómica Sínica*, 35 (12), 2218-2224.

- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., & Fan, B. (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant signaling & behavior*, 4 (6), 493-496.
- Chern, M. S., Fitzgerald, H. A., Yadav, R. C., Canlas, P. E., Dong, X., & Ronald, P. C. (2001). Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1-mediated signaling pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 27 (2), 101-113.
- Chern, M., Fitzgerald, H. A., Canlas, P. E., Navarre, D. A., & Ronald, P. C. (2005). Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (6), 511-520.
- Christensen, N.M, Nicolaisen, M., Hansen, M., Schulz, A. (2004). Distribution of a Phytoplasmas in Infected Plants as Revealed by Real-Time PCR and Bioimaging. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7 (11): 1175–1184.
- Collins T., J.R. Stone y A.M. Williams. (2001). All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN Domains. *Molecular and Cellular Biology*, 21 (11), 3609-3615.
- D'Amelio, R., Marzachi, C., & Bosco, D. (2010). Activity of benzothiadiazole on chrysanthemum yellows phytoplasma ('Candidatus Phytoplasma asteris') infection in daisy plants. *Crop Protection*, 29 (10), 1094-1099.
- Dean, J.V., Mohammed, L.A. & Fitzpatrick, T. (2005). The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta*, 221 (2), 287-296.
- Delaney, T. P., Friedrich, L., & Ryals, J. A. (1995). *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92 (14), 6602-6606.
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., & Fobert, P. R. (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *The Plant Cell*, 12 (2), 279-290.

- Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., & Fobert, P. R. (2003). The *Arabidopsis* NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *The Plant Cell*, 15 (9), 2181-2191.
- Doi Y, Teranaka M, Yora K, Asuyama H. (1967). Mycoplasma- or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows or paulownia witches' broom. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 33:259–66
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current opinion in plant biology*, 7(5), 547-552.
- Doyle, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Durrant, WE & Dong, X. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathology*. 42, 185-209.
- Dutt, M., Barthe, G., Irey, M., & Grosser, J. (2015). Transgenic citrus expressing an *Arabidopsis* NPR1 gene exhibit enhanced resistance against Huanglongbing (HLB; Citrus Greening). *PloS one*, 10 (9), e0137134.
- Ekengren, S. K., Liu, Y., Schiff, M., Dinesh-Kumar, S. P., & Martin, G. B. (2003). Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato. *The Plant Journal*, 36 (6), 905-917.
- Elwan, M. W. M., & El-Hamahmy, M. A. M. (2009). Improved productivity and quality associated with salicylic acid application in greenhouse pepper. *Scientia Horticulturae*, 122 (4), 521-526.
- Endah R, Beyene G, Kiggundu A, van den Berg N, Schlüter U, Kunert K, Chikwamba R (2008). Elicitor and Fusarium-induced expression of NPR1-like genes in banana. *Plant Physiol Biochem* 46:1007–1014. doi:10.1016/j.plaphy.2008.06.007.

- Fan, W., & Dong, X. (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 14 (6), 1377-1389.
- FAO, U. (2014). FAOstat. Retrieved Feb, 2014.
- Fitzgerald, H.A., Chern, M.S., Navarre, R. & Ronald, P.C. (2004). Overexpression of (At) NPR1 in rice leads to a BTH and environment induced lesion mimic cell death phenotype. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 140–151.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M.G. & Métraux, J.P. (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *The Plant Journal*, 10 (1), 61-70.
- Friedrich, L., Lawton, K., Dietrich, R., Willits, M., Cade, R., & Ryals, J. (2001). NIM1 overexpression in *Arabidopsis* potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(9), 1114-1124.
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., ... & Dong, X. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486 (7402), 228-232.
- García, E.P. & Lozoya, E.G. (2004). Genes de resistencia a enfermedades en plantas *Revista, Mexicana de Fitopatología* vol. 22 núm. 003 p 414-422.
- Glazebrook, J., Rogers, E. E., & Ausubel, F. M. (1996). Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics*, 143 (2), 973-982.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H. S., Nawrath, C., Métraux, J. P., ... & Katagiri, F. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal*, 34 (2), 217-228.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–27.

- Göhre, V. & Robatzek, S. (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology* 46,189-215.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K. H. & Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole a novel class of inducers of systemic acquired resistance activates gene expression and disease resistance in wheat. *The Plant Cell*, 8 (4), 629-643.
- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., ... & Hadley, D. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science*, 296 (5565), 92-100.
- Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F. & Ausubel, F.M. (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, 77 (4), 551-563.
- Griffith, R. (1987). Red ring disease of coconut palm. *Plant Dis* 71:192-196.
- Gurr, S. J., & Rushton, P. J. (2005). Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express?. *TRENDS in Biotechnology*, 23 (6), 275-282.
- Gust, A. A., & Nürnberger, T. (2012). Plant immunology: A life or death switch. *Nature*, 486 (7402), 198-199.
- Hammerschmidt, R. (1999b). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:77-84.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST-palaeontological statistics, ver. 1.89. *Palaeontologia electronica*, 4 (9).
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773-91.
- Hanold D, Randles JW (1991). Cadang-cadang disease and its viroid agent. *Plant Dis* 75:330–335.

- Harries, H.C. (1978). The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. Bot Rev 44:265-319.
- Harrison, N., & Oropeza, C. (1995). Recent advances in diagnosis and detection of lethal yellowing in the Americas. In Proceedings of the International Workshop on Lethal Yellowing-like Diseases of Coconut, Elmina, Ghana (pp. 221-234).
- Harrison, N., Cordova, I., Richardson, P., & Dibonito, R. (1999). Detection and diagnosis of lethal yellowing. In Current advances in coconut biotechnology (pp. 183-196). Springer Netherlands.
- Harrison, N.A. & Oropeza, C. (2008). Coconut lethal yellowing. In: NA Harrison, GP Rao y C Marcone (Eds.). Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas. Studium Press LLC. Houston, USA pp 219-248. Howard, 1995.
- Harrison, N.A. & Elliott, M.I. (2009). Lethal yellowing (LY) of palm. Florida, EEUU Universidad de Florida. 9 p. PP-222. Disponible en Internet: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PP/PP14600.pdf>.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., & Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. Environmental and experimental botany, 68 (1), 14-25.
- Heath, M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. Plant Mol Biol, 44 (3):321-334. 2
- Hepworth, S.R., Zhang, Y., McKim, S., Li, X. & Haughn, G.W. (2005). Blade-on-petiole-dependent signalling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. Plant Cell 17, 1434-1448.
- Hogenhout, S.A., Oshima, K., Ammar, E.D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., and Namba, S. (2008). Phytoplasmas: Bacteria that manipulate plants and insects. Mol. Plant Pathol. 9:403-423.

- Howard F.W., Mc Coy R.E. (1980). Reduction in spread in mycoplasma-like organism associated lethal decline of the palm *Veichia merrillii* by use of insecticides. *J. Econ Entomol* 73:268-270.
- Howard, F.W., Norris, R., Thomas, D. (1983). Evidence of transmission of palm yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus*. *Tropical Agric. (Trinidad)* 60:168-171.
- Howard, F, Barrant, C. (1989). Questions and answers about lethal yellowing disease. *Principes* 33:163-171
- Howard, F. & Gallo, S. (2006). El Cixíido Americano de las palmas, *Myndus crudus* Van Duzee (Insecta: Hemiptera: Auchenorrhyncha: Fulgoroidea: Cixiidae). Disponible en Internet: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN70700.pdf> Vol. 0. Pp. 1-8
- Jaillon, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., ... & Vezzi, A. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449 (7161), 463-467.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., & Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in plant science*, 7 (3), 106-111.
- Jones, J.D.G., Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444:323–29.
- Joseph, T, Radha, K. (1975) Role of *Phytophthora palmivora* in bud rot of coconut. *Plant Disease Reporter* 59:1014-1017
- Jun, J.H., Ha, C.M., Fletcher, J.C. (2010) Blade-on-Petiole 1 Coordinates Organ Determinacy and Axial Polarity in *Arabidopsis* by Directly Activating Asymmetric leaves 2. *Plant Cell* 22:62-76
- Kesarwani, M., Yoo, J., & Dong, X. (2007). Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 144(1), 336-346.

-
- Kinkema, M., Fan, W. and Dong, X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell*, 12, 2339–2350.
- Kogel, K. H., Beckhove, U., Dreschers, J., Munch, S., & Romme, Y. (1994). Acquired resistance in barley (the resistance mechanism induced by 2, 6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance). *Plant Physiology*, 106 (4), 1269-1277.
- Kombrink, E., Schmelzer, E. (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of plant Pathology* 107:69-78.
- Larkin, M.A.G., Blackshields, N.P., Brown, R., Chenna, P.A., McGettigan, H., McWilliam, F., Valentin, I.M., Wallace, A., Wilm, R., Lopez, J.D., Thompson, T.J., Gibson, D.G. & Higgins, (2008). Clustal X Version 2.0.10. Disponible en: <http://www.clustal.org/1599>.
- Lawton, K. A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., & Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *The Plant Journal*, 10 (1), 71-82.
- Le Henanff G.L., T. Heitz, P. Mestre, J. Mutterer, B. Walter y J. Chong. (2009). Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. *BMC Plant Biology* 9: 54.
- Le Henanff, G., Farine, S., Kieffer-Mazet, F., Miclot, A.S., Heitz, T., Mestre, P., Bertsch, C., Chong, J. (2011). *Vitis vinifera* VvNPR1.1 is the functional ortholog of AtNPR1 and its overexpression in grapevine triggers constitutive activation of PR genes and enhanced resistance to powdery mildew. *Planta* 234:405-417
- Lin, W.C., Lu, C.F., Wu, J.W., Cheng, M.L., Lin, Y.M., Yang, N.S., Black, L., Green, S.K., Wang, J.F. & Cheng, C.P. (2004). Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Res.* 13: 567-581.

- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., Dinesh-Kumar, S.P. (2002). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, 30 (4):415-429.
- Liu, G., Holub, E. B., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Fobert, P. R. (2005). An *Arabidopsis* NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. *The Plant Journal*, 41 (2), 304-318.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ ΔΔCT method. *Methods* 25:402-408
- Lizama-Uc, G., Estrada-Mota, I. A., Caamal-Chan, M. G., Souza-Perera, R., Oropeza-Salín, C., Islas-Flores, I., & Zúñiga-Aguilar, J. J. (2007). Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70 (4), 130-141.
- Makandar, R, Essig, J.S., Schapaug, M.A., Trick, H.N. & Shah, J. (2006). Genetically engineered resistance to *Fusarium* head blight in wheat by expression of *Arabidopsis* NPR1. *Mol Plant Microbe Interact.* 19: 123-129
- Malamy, J., Klessig, D.F., (1992). Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant J.* 2, 643–654.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., ... & Dietrich, R. A. (2000). The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature genetics*, 26 (4), 403-410.
- Malnoy, M, Jin, Q, Borejsza-Wysocka, EE, He, S.Y. & Aldwinckle, H.S. (2007) Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20: 1568-1580.
- Mandal, S., Mallick, N., Mitra, A. (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *Plant Physiol Biochem* 47:642-649

- Maust, B. E., Espadas, F., Talavera, C., Aguilar, M., Santamaría, J. M., & Oropeza, C. (2003). Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology*, 93 (8), 976-981.
- McCoy, R.E. (1972). Remission of lethal yellowing in coconut palms treated with tetracycline antibiotics. *Plant Dis Report* 56:1019-1021
- McCoy, R., Norris, R., Vieyra, G., & Delgado, S. (1982). México: lethal yellowing disease of coconut palm. *FAO Plant Protection Bulletin* 30: 79-80.
- McCoy, R.E., Howard, F.W., Tsai, M., Donselman, H.M., Thomas, D.L., Basham, H.G., Atilano, R.A., Eskafi, F.M., Britt, L., Collins, M.E. (1983). Lethal yellowing of palms. *Univ. Florida Agric. Exp. Sta. Tech Bull* No 834.
- Mc Kim, S.M., Stenvik, G.E., Butenko, M.A., Kristiansen, W., Cho, S.K., Hepworth, S.R., Aalen, R.B., Haughn, G.W. (2008). The Bladeon-Petiole genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. *Development* 135:1537-1546
- Medzhitov, R., Janeway, C.A. Jr (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295–298.
- Métraux, J. P., AhlGoy, P., Staub, T. H., Speich, J., Steinemann, A., Ryals, J., & Ward, E. (1991). Induced systemic resistance in cucumber in response to 2, 6-dichloroisonicotinic acid and pathogens. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* Vol. 1 (pp. 432-439). Springer Netherlands.
- Métraux, J.P., Nawrath, C. & Genoud, T. (2002). Systemic acquired resistance. *Euphytica*, 124 (2), 237-243.
- Meura, G., Budathab, M., Guptab, A.D., Prakashc, S., Kirti, P.B. (2006). Differential induction of NPR1 during defense responses in *Brassica juncea*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 68, 128–137.
- Moreau, M., Tian, M., Klessig, D.F. (2012). Salicylic acid binds NPR3 and NPR4 to regulate NPR1-dependent defense responses. *Cell Res* 22, 1631-1633

- Morel, J.B., & Dangl, J.L. (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell death and differentiation*, 4 (8), 671-683.
- Moroldo, M., Paillard, S., Marconi, R., Fabrice, L., Canaguier, A., Cruaud, C., ... & Scalabrin, S. (2008). A physical map of the heterozygous grapevine 'Cabernet Sauvignon' allows mapping candidate genes for disease resistance. *BMC Plant Biology*, 8 (1), 66.
- Morris, S.W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C.C., Frederiksen, R.A., Bhandhufalck, A., Hulbert, S., Uknes, S., (1998). Induced resistance responses in maize. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11, 643–658
- Mosavi, L.K., Cammett, T.J., Desrosiers, D.C., Peng, Z. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci* 13:1435-1448
- Moscoso, P.A., Ortiz, C.F., Palma, D.J., Ruiz, B.P. & Sánchez S.S. (2002). Incidencia de enfermedades letales en progenitores e híbridos de cocotero en Tabasco, Méx. *Fitotecnía Mexicana* 25: 327-332.
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X. (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113:935-944
- Mukhtar, M.S., Nishimura, M.T. & Dangl J. (2009). NPR1 in plant defense: It's not over 'til it's turned over. *Cell*, 137(5):804-806.
- Mur, L.A., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot*, 59(3):501-520.
- Narváez, M. (2010). Tesis de maestría: Inducción de SAR en plantas de cocotero infectadas con *Phytophthora capsici*. Instituto Tecnológico de Mérida. México. Pp. 41.
- Nejat, N., Cahill, D.M., Vadamalai, G., Ziemann, M., Rookes, J., Naderali, N. (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

Nicaise, V., Roux, M., & Zipfel, C. (2009). Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiology*, 150 (4), 1638-1647.

Nic Matos José Germán (2012). Tesis de Maestría. Estudio de la expresión de un gen homólogo de NPR1 en plantas de cocotero tratadas con ácido salicílico. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mexico. Pp. 69

Nishizawa, Y., Nishio, Z., Nakazono, K., Soma, M., Nakajima, E., Ugaki, M., & Hibi, T. (1999). Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 99 (3), 383-390.

Nkansah-Poku, J., Philippe, R., Quaicoe, R. N., Dery, S. K., & Ransford, A. (2009). Cape Saint Paul Wilt Disease of coconut in Ghana: surveillance and management of disease spread. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 16 (2), 111-115.

Norberg, M., Holmlund, M., Nilsson, O. (2005). The Blade on Petiole genes act redundantly to control the growth and development of lateral organs. *Development* 132:2203-2213

Oropeza, C, Mora, G., Harrison, N.A., Roca, M.M., Myrie, W., Sáenz, L., Narváez, M., Córdova, L. (2009). Epidemiological Studies of Floema Lethal Yellowing in the Americas. In: Jean Claude Legoupil (Ed.), *Proceedings of the International workshop on Lethal Yellowing Diseases on coco in Ghana, Accra 3-6 June 2008*. FARA, Accra, Ghana Pp. 183-193.

Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S. & Klessig, D.F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*, 318(5847), 113-116.

Parkhi, V., Kumar, V., Campbell, L. A. M., Bell, A. A., & Rathore, K. S. (2010). Expression of *Arabidopsis* NPR1 in Transgenic Cotton Confers Resistance to Non-defoliating

Isolates of *Verticillium dahliae* but not the Defoliating Isolates. *Journal of Phytopathology*, 158 (11-12), 822-825.

Parthasarathy, M., Van Slobbe, W. (1978). Hartrot or fatal wilt of palms I. Coconuts (*Cocos nucifera*). *Principes* 22:3-14

Pasquer, F., Isidore, E., Zarn, J., Keller, B., (2005). Specific patterns of changes in wheat gene expression after treatment with three antifungal compounds. *Plant Mol. Biol.* 57, 693–707.

Peraza-Echeverría S., Santamaría Fernández J., Fuentes Ortiz G., Menéndez Cerón M.A., Vallejo Reyna M.A., Herrera-Valencia VA (2012). The NPR1 family of transcription cofactors in papaya: insights into its structure, phylogeny and expression. *Genes & Genomics*, DOI 10.1007/s13258-011-0218-7.

Pérez-Núñez M.T., Chan J.L., Sáenz L., Gonzalez T., Verdeil J.L., Oropeza C. (2006). Improved somatic embryogenesis from coconut (*Cocos nucifera* L.) plumule explant cultivated in vitro. *In vitro Cell Dev Biol Plant.* 42:37-43.

Pieterse, C.M.J. & Van Loon, L.C. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (4), 456–464

Pieterse, C. M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*, 5 (5), 308-316.

Plavsic-Banjac, G., Hunt, P., Maramorosch, K. (1972). Mycoplasma-like bodies associated with lethal yellowing disease of coconut palms *Phytopathology* 62: 298-299.

Potlakayala, S.D., DeLong, C., Sharpe, A., Fobert, P.R. (2007). Conservation of non-expressor of pathogenesis-related genes 1 functions between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol 71. Pp. 174-183.

- Puch-Hau CA (2012). Tesis de Maestría. Aislamiento y Caracterización de Secuencias Candidatas a Genes de Resistencia en Cocotero. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. Pp. 78-80
- Puch-Hau, C., Oropeza-Salín, C., Peraza-Echeverría, S., Gongora-Paredes, M., Córdova-Lara, I., Narvaez-Cab, M., ... & Sáenz-Carbonell, L. (2015). Molecular cloning and characterization of disease-resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from *Cocos nucifera* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 89, 87-96.
- Radwan, O.S., Mouzeyar, J.S., Venisse, P., Nicolas & M.F. Bouzidi. (2005). Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. *Journal of Experimental Botany*, 56 (420), 2683-2693.
- Raff, M. (1998). Cell suicide for beginners. *Nature*, 396 (6707), 119-119.
- Rangel, G., Castro, E., Beltrán, E., Reyes, H., y García, E. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*, 12 (2), 90-95.
- Reinert, J.A. (1977). Field biology and control of *Haplaxius crudus* on St. Augustine grass and Christmas palm. *Journal of Economic Entomology*, 70 (1), 54-56.
- Rochon, A., Boyle, P., Wignes, T., Fobert, P. R., & Després, C. (2006). The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *The Plant Cell*, 18 (12), 3670-3685.
- Rohde, W., Randles, J.W., Langridge, P., Hanold, D. (1990). Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. *Virology* 176:648-651
- Romanazzi, G., D'Ascenzo, D. & Murolo, S. (2009). Field treatment with resistance inducers for the control of grapevine bois noir. *Journal of Plant Pathology*, 91 (3), 677-682

-
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *The plant cell*, 8 (10), 1809.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H. Y., ... & Uknes, S. (1997). The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *The Plant Cell*, 9 (3), 425-439.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425
- Sánchez-Rojo, S., López-Delgado, H.A., Mora-Herrera, M.E., Almeyda-León, H.I., Zavaleta-Mancera, H.A., Espinosa-Victoria, D. (2011). Salicylic Acid Protects Potato Plants from Phytoplasma-associated Stress and Improves Tuber Photosynthate Assimilation. *Am J Potato Res* 88:175-183
- Shah, J., Klessig, D.F., (1999). Salicylic acid: signal perception and transduction. In: Hooykaas, P.P.J., Hall, M.A., Libbenga, K.R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 513–541.
- Shah, J., Tsui, F., & Klessig, D. F. (1997). Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10 (1), 69-78.
- Shao, Y., Zhang, H., He, H., Cheng, B., Xiang, Y. (2013). Molecular Cloning and Characterization of Orthologues of NPR1 Gene from Poplar. *J. Phytopathol.* 161:35-42
- Shi, Z., Maximova, S. N., Liu, Y., Verica, J., & Guiltinan, M. J. (2010). Functional analysis of the *Theobroma cacao* NPR1 gene in *Arabidopsis*. *BMC plant biology*, 10 (1), 248.
- Shulaev, V., Silverman, P. y I. Raskin. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*. 385: 718–721.

-
- Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Mettraux, J.P., Raskin, I., (1995). Salicylic acid in rice, biosynthesis, conjugation and possible role. *Plant Physiol.* 108, 633–639.
- Singh, R., Ong-Abdullah, M., Low, E-TL, Manaf, M.A.A., Rosli, R., Nookiah, R., Ooi LC-L, Ooi SE, Chan, K-L, Halim, M.A. (2013). Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. *Nature* 500:335-339
- Spletzer, M.E., Enyedi, A.J. (1999). Salicylic acid induces resistance to *Alternaria solani* in hydroponically grown tomato. *Phytopathol* 89, 722-727
- Spoel S.H., Z. Mou, Y. Tada, N.W. Spivey, P. Genschik & X. Dong. (2009). Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell*, 137 (5), 860-872.
- Stakman, E.C. (1915). Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J Agric Res*, 4, 193-200.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux J.P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annu Rev. Phytopathology.* 35, 235-70.
- Stogios, P.J., Downs, G.S., Jauhal, J.J.S., Nandra, S.K., Privé, G.G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.* 6 : R82.1-R82.18
- Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S.W. and Brisson, N. (2001). Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 769–772.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., Dong, X. (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 321, 952–956.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski A., Kumar S. (2013). MEGA molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* mst197.

- Tang, Y. M., Zhang, Z. Y., & Xin, Z. Y. (2007). Isolation and Characterization of NPR1 Homolog Gene TiNH1 in *Thinopyrum intermedium* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 6, 002.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H. S., Han, B., ... & Katagiri, F. (2003). Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell*, 15 (2), 317-330.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25, 4876-4882.
- Torto-Alalibo, T., Collmer, C. W., Lindeberg, M., Bird, D., Collmer, A., & Tyler, B. M. (2009). Common and contrasting themes in host cell-targeted effectors from bacterial, fungal, oomycete and nematode plant symbionts described using the Gene Ontology. *BMC microbiology*, 9 (1), S3.
- Tuskan, G.A., DiFazio, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putman, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., et al. (2006). The genome of black cottonwood *Populus trichocarpa* (Torr. And Gray). *Science* 313, 1596-1604.
- Van Loon, L. C., & 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 (2), 199-211.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual review of phytopathology*, 36 (1), 453-483.
- Van Loon, L. C., & Van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and molecular plant pathology*, 55 (2), 85-97.

- Verberne, M.C. Verpoorte, R., Bol, J.F. Mercado-Blanco, J. & Linthorst, H.J.M. (2000). Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nature Biotechnology*. 18: 779–783.
- Villanueva Barradas, J. (1991). Informe de la visita del Dr. Juan Villanueva Barradas, Consultor de OIRSA, a los países de Centro América en relación con el amarillamiento letal del cocotero. Junio, 30.
- Vivanco, J.M., Cosio E., Loyola-Vargas, V.M. & Flores H.E. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*. Pp. 68-75.
- Vlot, A.C., Dempsey, D`A, Klessing, D.F. (2009). Salicylic acid a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathology*. Vol 47. Pp. 177-206.
- Uppalapati, S.R. Ishiga, Y. Wangdi, T. Kunkel, B.N. Anand, A. Mysore, K.S. and C. L. Bender. (2007). The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20: 955–965.
- Wally, O, Jayaraj, J. and Punja, Z.K. (2009). Broad-spectrum disease resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens in transgenic carrots (*Daucus carota* L) expressing an *Arabidopsis NPR1* gene. *Planta* 231: 131-141.
- Wasternack, C., Atzorn, R., Jarosch, B., Kogel, K.H. (1994). Induction of a thionin, the jasmonate-induced 6 kDa protein of barley by 2, 6-dichloroisonicotinic acid. *Phytopath*. 140, 280–284.
- Weigel, R.F., Bauscher, C., Pfitzner, A.J.P. & Pfitzner, U.M. (2001). NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. *Plant Mol. Biol.* 46, 143–160.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414, 562–565.

-
- Wu, Q., Wang, X.Z., Tang, Y.Y., Yu, H.T., Ding, Y.F., De Yang, C., Cui FG, Zhang JC, Wang, C.T. (2014). Molecular cloning and characterization of NPR1 gene from *Arachis hypogaea*. Mol. Biol. Rep. 41:5247-5256
- Wu, W., Ding, Y., Wei, W., Davis, R. E., Lee, I. M., Hammond, R. W., & Zhao, Y. (2012). Salicylic acid-mediated elicitation of tomato defence against infection by potato purple top phytoplasma. Annals of Applied Biology, 161 (1), 36-45.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I.D., De Luca, V., Després, C. (2012). The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. Cell Rep 1, 639-647.
- Yuan, Y., Zhong, S., Li, Q., Zhu, Z., Lou, Y., Wang, L., Wang, J., Wang, M., Li, Q., Yang, D. & He, Z. (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. Plant Biotechnol. J. 5: 313-324.
- Yuxing, Y., S. Zhong, Q. Li, Y. Lou, L. Wang, J. Wang, M. Wang, Q. Li, D. Yang y Z. He. (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. Plant Biotechnology Journal, 5 (2), 313-324, 2007.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G. K. S., Li, S., Liu, B., ... & Cao, M. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). science, 296 (5565), 79-92.
- Zhang, X., Francis, M. I., Dawson, W. O., Graham, J. H., Orbović, V., Triplett, E. W., & Mou, Z. (2010). Over-expression of the *Arabidopsis* NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. European journal of plant pathology, 128(1), 91-100.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X. & Dong, X. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 96 (11). 6523-6528.

- Zhang, Y., Cheng, Y.T., Qu, N., Zhao, Q., Bi, D. & Li, X. (2006). Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two NPR1 paralogs. *Plant J.* 48:647-656.
- Zhang, Y., Wang, X., Cheng, C., Gao, Q., Liu, J. & Guo, X. (2008). Molecular cloning and characterization of GhNPR1, a gene implicated in pathogen responses from cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Biosci Rep*, 28 (1):7-14.
- Zhang, Y., Shi, J., Liu, J.Y., Zhang, J.D., Guo, X.Q. (2010). Identification of a novel NPR1-like gene from *Nicotiana glutinosa* and its role in resistance to fungal, bacterial and viral pathogens. *Plant Biol* 12, 23-34.
- Zhao, J.T., Huang, X., Chen, Y.P., Chen, Y.F., Huang, X.L. (2009). Molecular cloning and characterization of an ortholog of NPR1 gene from Dongguan Dajiao (*Musa* spp. ABB). *Plant Mol Biol Rep* 27, 243-249.
- Zhou, J.M., et al. (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 191-202.
- Zizumbo-Villarreal, D., Colunga-García, P., Fernández-Barrera, M., Torres-Hernández, N., Oropeza, C. (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Plant Gen Res Newslett, FAO-Biovers* 156, 23-33.