

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGIA DE
PLANTAS**

**INDUCCIÓN POR QUITOSANO DE GENES
RELACIONADOS CON LA DEFENSA CONTRA
PATÓGENOS, EN CALLOS DE *Cocos nucifera* L.**

**Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias
presenta:**

Gabriel Lizama Uc

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2008



AGRADECIMIENTOS

A Dr. José María López Aguilar, "Jefe" por muchos años que me enseñó a ser un científico y a ser un hombre. También por haberme dado el primer empleo.

A Dr. Víctor Manuel, Dr. José María López Aguilar, Dr. Alejandro González Ríos, Dr. Fernando C. Valverde, Dr. Carlos de la Cruz, Dr. Roberto Martínez, Dr. Oscar Alvarado, Dr. Ricardo José Pérez y Dr. Carlos Ojeda por sus sugerencias y revisión crítica de este manuscrito.

A la Dra. María Dolores por sus consejos y paciencia durante este trabajo.

A Dr. T. Fernando por su amistad y el apoyo técnico en la parte experimental de este trabajo y al Dr. Ricardo por sus consejos.

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación Científica y Tecnológica por invitación especial de la Dra. María Dolores. La dirección del Centro de Investigación Científica y Tecnológica es de la Facultad de Biología de la Universidad de Chile.

DEDICATORIAS.

A mis hijas Nadya y Gabriela por ser la alegría de mi vida y ser el motor para mejorar día a día.

A ti Fátima por darle sentido a mi vida y compartir conmigo esta locura de la investigación.

A mis padres Arturo y Teresita por el apoyo que siempre me han brindado.

A mis hermanas Nelly y Raquel por el cariño y apoyo que siempre me han brindado.

A mis amigos. Fito, Juan, Ramón, Hernán, Alberto y Elizabeth por su amistad y tiempo compartido.

A mis compañeros del laboratorio 26. Gabriel, Goretty, Iván, Eunice, Elide y Yumi.

A todas las personas de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

Reconocimientos	i
Agradecimientos	ii
Dedicatorias	iii
Resumen	vii
Abstract	viii
Lista de abreviaturas	ix
Lista de figuras	x
Lista de tablas	xi
CAPÍTULO I. Introducción	1
1.1 ¿Qué se ha hecho para estudiar las enfermedades del cocotero?	1
1.2 El uso del cultivo de tejidos para el estudio de la interacción planta-patógeno.	1
1.3 Bibliografía	4
CAPÍTULO II. Antecedentes	5
2.1 El cultivo del cocotero	5
2.2 Enfermedades del cocotero	5
2.2.1 Enfermedades virales y viroidales	6
2.2.2 Enfermedades bacterianas	6
2.2.3 Enfermedades fúngicas y por oomicetos	6
2.2.4 Otras enfermedades	7
2.3 Interacciones entre las plantas y los patógenos	7
2.4 Descripción de los sistemas de defensa de las plantas	9
2.4.1 Sistemas de defensa constitutivos	9
2.4.1.1 Barreras físicas	10
2.4.1.2 Barreras químicas	10
2.4.2 Sistemas de defensa inducibles	11
2.5 Clasificación de acuerdo con su localización en la planta	12

2.5.1	Respuestas locales	12
2.5.1.1	La respuesta de hipersensibilidad (HR)	12
2.5.1.2	Cambios celulares asociados con la HR	13
2.5.2	Respuestas sistémicas	14
2.5.2.1	La resistencia sistémica adquirida	14
2.5.2.2	La respuesta sistémica inducida	15
2.6	Las señalizaciones químicas	16
2.6.1	El ácido salicílico (SA)	16
2.6.2	El ácido jasmónico y el jasmonato de metilo (MeJA)	17
2.6.3	El etileno (Et)	18
2.7	Patrones moleculares asociados con el patógeno (PAMP)	18
2.7.1	Clasificación de los inductores	20
2.8	Tipos de interacciones durante la interacción planta patógeno	25
2.8.1	Interacciones compatibles	25
2.8.2	Interacciones incompatibles	25
2.8.3	El modelo gen a gen	26
2.9	Justificación	29
2.10	Hipótesis	30
2.11	Objetivo general	30
2.12	Objetivos particulares	30
2.13	Bibliografía	31
	CAPÍTULO III. Resultados	46
3.1	Introduction	46
3.2	Materials and methods	47
3.3	Results and discussion	50
3.3.1	Chitosan application to coconut calli promotes the increment of a β -1,3-glucanase activity	50
3.3.2	Chitosan addition differentially modifies the abundance of transcripts in <i>Cocos nucifera</i> calli	54

3.3.3 Abundance of chitosan modified transcripts are modified differentially by salicylic and jasmónico acid	58
3.4 References	64
CAPITULO IV. Discusión general	68
4.1 La adición de quitosano a callos de <i>Cocos nucifera</i> promueve la síntesis de proteínas de defensa.	68
4.2 La adición de quitosano modifica de manera diferencial, transcritos de genes de defensa en callos de <i>Cocos nucifera</i> L.	70
4.3 El ácido salicílico y el jasmonato de metilo modifican diferencialmente la abundancia de transcritos identificados tras el tratamiento con quitosano de callos de <i>Cocos nucifera</i> .	73
4.4 Bibliografía	76
CAPÍTULO V. Conclusiones	78
CAPÍTULO VI. Perspectivas	79
APENDICES	81

RESUMEN

Cocos nucifera L. es una de las palmas más importantes en el trópico. Esta palma es atacada por varios agentes que ocasionan enfermedades. En la actualidad no existe información de las interacciones moleculares entre los agentes causales de enfermedades y las variedades resistentes o tolerantes, específicamente las bases fisiológicas de la interacción patógeno-cocotero son escasamente comprendidas. Factores como el ciclo de vida largo así como dificultades en desarrollar estudios en toda la planta han retrasado la investigación en esta área. En este sentido se propuso tratar cultivos *in vitro* con un inductor general. Esta puede ser una alternativa viable para identificar y caracterizar tanto en el nivel bioquímico como molecular intermediarios de las señales de transducción, así como productos génicos involucrados en la defensa contra patógenos. Los resultados muestran que el tratamiento con 10 mg mL^{-1} de quitosano resulta en un incremento en la actividad de β -1,3 glucanasas así como la acumulación de peróxido de hidrógeno. Mediante la aplicación del despliegue diferencial, varios fragmentos de cADN fueron identificados; la secuencia de nucleótidos demostró cierto nivel de identidad con productos génicos relacionados a receptores de señalización extracelulares (RLK (G1) y a proteína tipo *Verticillium* (G2)), regulación de estrés oxidativo (oxidasa alterna mitocondrial 1b(G1-C)), transducción de señales extracelulares (cinasa), refortalecimiento de la pared celular (proteína de pared celular gp-1) y alfa tubulina. La confirmación de los niveles de expresión mediante Northern reverse se realizó para seis genes. G1, G2 y G1-C fueron modificados por el quitosano y el ácido salicílico pero no por jasmonato de metilo. Estos resultados refuerzan la idea que la elicitación de tejidos de cocotero cultivado *in vitro* constituye una alternativa viable para una caracterización entre este cultivo tropical y sus patógenos asociados.

ABSTRACT

Cocos nucifera L. (coconut) is one of the most important palms in the tropics. This palm undergoes attack by several disease-producing agents. Nowadays, there is practically no information of the molecular interactions between the causing agents and either susceptible or tolerant varieties; specially, the basic physiology of the coconut-pathogen interaction is negligible understood. Among other factors, the long life cycle and the difficultness to perform studies in the whole palm have delayed the research in this area. In this sense, we propose to treat *in vitro* cultures with general elicitors; this could be a suitable alternative to identify and characterize both signal transduction intermediates and gene products involved in the biochemical and molecular defense against pathogens.

Our results showed that imbibition with 10 mg mL⁻¹ chitosan resulted in the positive increment of a β -1,3-glucanase activity and accumulation of peroxide hydrogen. By using RNA differential display, several cDNA fragments were identified; their nucleotide sequences showed some level of identity with gene products related to receptors that bind extracellular signals (RLK (G1) and Verticillium-like protein (G2)), regulation of the oxidative burst (mitochondrial alternate oxidase 1b (G1-C)), or transduction of extracellular signals (protein kinase), reinforcement cell wall (cell wall protein gp-1) and alpha tubulin. Confirmation of the expression levels by reverse Northern blotting was done for six genes. G1, G2 and G1-C, were modified by chitosan and salicylic acid but not by Methyl Jasmonate. These results support the notion that elicitation of coconut tissues cultivated *in vitro* constitutes a suitable alternative to characterize further the interaction between this tropical crop and its associated pathogens.

LISTA DE ABREVIATURAS

- avr*. Genes de avirulencia
- BTH. Acido benzo(1,2,3) triazol-7-carbationico s-metil éster
- CCCVd. Viroide cadang-cadang
- CDPKs. Proteínas cinasas dependientes de calcio
- CFDV. Virus del decaimiento foliar del cocotero
- CTiVd. Viroide tinangaja
- DD. Despliegue diferencial
- Et. Etileno
- HR. Respuesta de hipersensibilidad
- INA. Acido 2,6-dicloro isonicotínico
- ISR. Resistencia sistémica inducida
- LRR. Regiones ricas en leucina
- LY. Amarillamiento letal
- MAPk. Proteínas cinasas activadas por mitógenos
- Me JA. Jasmonato de metilo
- NBS. Sitio de unión a nucleótidos
- PAMPs. Patrones moleculares asociados con el patógeno
- PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.
- PR. Proteínas relacionadas con la patogénesis
- PR*. Genes de resistencia
- RLK. Receptores tipo cinasas
- ROS. Especies reactivas de oxígeno
- SA. Acido salicílico
- SAR. Resistencia sistémica adquirida
- SAGE. Análisis serial de la expresión génica
- SH. Hibridación sustractiva
- TVM. Virus del mosaico del tabaco

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
3.1	Effect of the chitosan concentration in the induction of β -1,3-glucanase activities in <i>Cocos nucifera</i> calli	52
3.2	Effect of the chitosan incubation period in the induction of β -1,3-glucanase activities in <i>Cocos nucifera</i> calli	53
3.3	Chitosan induces differentially abundance of mRNAs in <i>C. nucifera</i> calli	55
3.4	Expression levels of chitosan-modified transcripts in tissues of adult plant	57
3.5	Effect of SA and MeJA in the expression of the cDNAs isolated from <i>Cocos nucifera</i>	60
3.6	Chitosan induces the production of hydrogen peroxide in <i>Cocos nucifera</i> calli	62
4.1	Modelo propuesto para la inducción de los eventos moleculares en callos de <i>C. nucifera</i> L cultivados <i>in vitro</i> ante el quitosano el SA y el JA.	75

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
2.1	Familia de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR)	15
2.2	Clasificación general de los inductores	21
2.3	Clasificación de inductores de acuerdo a su naturaleza química	24
2.4	Genes de resistencia aislados de diferentes plantas	21
3.1	Analysis of differentially expressed mRNA sequences isolated by differential display from elicitor-treated coconut calli	58

CAPÍTULO I. INTRODUCCION

1.1 ¿Qué se ha hecho para estudiar las enfermedades del cocotero?

Una de las estrategias empleadas para el estudio de las enfermedades en cocotero es la detección del patógeno causante de la enfermedad, mediante el uso de herramientas moleculares con las que se ha evaluado la distribución de los agentes patogénicos. Para el caso de la enfermedad del amarillamiento letal del cocotero, la detección molecular basada en pruebas de hibridación y PCR ha incrementado notablemente la detección de fitoplasmas en palmas, donde este patógeno se encuentra en bajas concentraciones (Thomas and Donselman, 1979; Ashburner *et al.*, 1996). Se han logrado avances recientes en la detección de fitoplasmas mediante el uso de PCR anidado (Lee *et al.*, 1994). La detección temprana de fitoplasmas en el cocotero permite aplicar medidas de prevención que pueden evitar la propagación de la enfermedad del amarillamiento letal. Para el caso del virus del decaimiento foliar en cocotero (CFDV), se han desarrollado sistemas de detección basados en el uso de PCR, utilizando cebadores específicos correspondientes al genoma del virus (Doyle and Dolyte, 1990). De forma similar, se han establecidos métodos de detección para el viroide cadang-cadang (CCCVd), agente causal de la enfermedad de tinangaja (Randles *et al.*, 1980).

1.2 El uso del cultivo de tejidos para el estudio de la interacción planta-patógeno.

Desde la domesticación de las plantas por el hombre, las enfermedades ocasionadas por microorganismos han causado enormes pérdidas en la producción de diversos cultivos. El uso intensivo de monocultivos con baja diversidad genética en la agricultura moderna ha repercutido en una elevada susceptibilidad a algunas enfermedades y en un incremento de la agresividad de algunos patógenos. Con excepción de las enfermedades epidémicas que llegan a destruir cultivos completos, se estima que las pérdidas ocasionadas por patógenos en el plano mundial representan un 12% del potencial de producción, teniendo mayor incidencia en hortalizas, frutales y arroz. Existen varias formas de controlar las enfermedades, entre las que podemos mencionar: a) las prácticas culturales, como la rotación, la sanidad del material inicial, el control de restos vegetales, etc.; b) la aplicación de agroquímicos y; c) la resistencia genética. Aunque las tres alternativas son utilizadas, la última, por su mejor implementación y menor impacto ambiental, es una alternativa viable. Sin embargo, existen ciertos inconvenientes para su aplicación, tales como la falta de genes de resistencia, la rápida evolución de nuevas razas virulentas del patógeno, etc.

Tradicionalmente, la mejora de cultivos se ha llevado a cabo a través de métodos convencionales de mejoramiento que involucran selección y evaluación de grandes poblaciones derivadas de cruzamientos entre materiales susceptibles y resistentes. y la posterior selección bajo condiciones propicias para la enfermedad. Si bien estos métodos convencionales han sido exitosos en muchos casos son lentos y laboriosos, ya que involucran cruza, retrocruza y selección, además de que ha sido difícil seguir

la evolución de nuevas razas virulentas de los patógenos y en algunos casos, al realizar cruza entre variedades resistentes y susceptibles no necesariamente se obtienen híbridos resistentes; éste último ha sido el caso para el cocotero. Por ejemplo, en cocoteros híbridos como el PB 121, Renard (1994) reportó pérdidas de 14 a 31% por pudrición de cogollo causado por *Phytophthora palmivora*, en Indonesia. En el estado de Campeche (México), Orona (1996) detectó la presencia de *Ceratocystis* y *Phytophthora* en los híbridos Nexpa. En Jamaica, Steer y Coates-Beckford (1990) descubrieron la presencia de *P. palmivora* y *P. katsurae* como los agentes causales de pudrición de cogollo en el cocotero híbrido Mayapan. Lo anterior ha llevado a un uso masivo de agroquímicos a pesar de su alto costo y su alto impacto ambiental.

La biotecnología y la biología molecular ofrecen nuevas herramientas para el mejoramiento de cultivos, aumentando las posibilidades y la eficiencia en la obtención de variabilidad genética y en la selección de caracteres deseables, brindando además alternativas viables para la identificación, la selección y la transferencia de genes de resistencia.

El cultivo *in vitro* fue una de las primeras herramientas de la biotecnología utilizadas en la búsqueda de resistencia contra enfermedades. Desde sus distintas alternativas, brinda soluciones para sortear barreras en los cruzamientos, colaborando además en la selección de genotipos resistentes. Es posible encontrar genes de resistencia en muchas de las especies cultivadas o en especies muy cercanas filogenéticamente y transferirlos por cruzamientos convencionales a especies susceptibles. Sin embargo, a veces es necesario recurrir a especies no tan cercanas filogenéticamente, pudiendo existir barreras de incompatibilidad. En estos casos es posible obtener híbridos viables con la utilización de técnicas tales como el rescate de embriones, la hibridación somática, la fusión de protoplastos, la polinización *in vitro*, etc. Una técnica promisoría es la selección *in vitro* de materiales resistentes utilizando al patógeno vivo o algún metabolito purificado o no del mismo u otras sustancias químicas como agentes de selección.

Los ensayos para la selección de resistencia contra patógenos y el estudio de la interacción hospedero-patógeno bajo condiciones de campo se encuentran sujetos a una gran variación entre experimentos. Esto se debe principalmente a la distribución no uniforme de los patógenos y a la falta de control sobre las variables ambientales. Por esta razón, queda claro que los ensayos de selección por resistencia a enfermedades deben realizarse, en lo posible, bajo condiciones controladas. Estas condiciones raramente pueden encontrarse en el campo. Se ha planteado alternativas utilizando invernáculos o ambientes controlados, lo cual soluciona algunos de los problemas mencionados anteriormente. En estas situaciones, la selección de genotipos resistentes se basa en la observación de la respuesta de genotipos individuales en la población de plantas ante la presencia del patógeno. Otras metodologías plantean el uso de metabolitos producidos por el patógeno para inducir los sistemas de defensa y en algunos casos han demostrado tener el mismo efecto que el microorganismo mismo. La selección *in vitro* se basa en la exposición de plantas, de órganos, de tejidos o de células vegetales a patógenos o sus metabolitos simulando la interacción hospedero-patógeno que tiene lugar en la naturaleza. Esta técnica permite estandarizar la evaluación, haciéndola reproducible y confiable, con la ventaja adicional de que en un espacio reducido y en un período corto se puede

verificar la resistencia o tolerancia de gran cantidad de individuos. Esto brinda además la posibilidad de poder ensayar callos y plántulas, sin necesidad de trabajar con plantas adultas. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes, tales como la falta de correlación *in vitro-in vivo* y la posible aparición de modificaciones genéticas no deseables, originadas por el pasaje por el cultivo *in vitro*. No obstante, en algunos casos, la respuesta obtenida *in vitro* ha demostrado tener una estrecha correlación con la resistencia- tolerancia obtenida *in vivo* (Yoder, 1980). El uso del cultivo de tejidos con el fin de repoblar poblaciones afectadas por enfermedades ha sido una estrategia empleada en el cultivo de cocotero. Estudios sobre la embriogénesis somática en cocotero han sido reportados durante las últimas tres décadas, principalmente usando explantes de inflorescencia como material de partida (Eeuwens, 1976; Verdeil *et al.*, 1994); sin embargo, estos estudios han mostrado baja reproducibilidad y eficiencia. Por otra parte, se han reportado avances recientes en este aspecto usando explantes de plúmula (Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998; Sáenz *et al.*, 1999). A partir de explantes de plúmula se han obtenido líneas celulares de callos en cocotero (Chan *et al.*, 1998). La obtención de callos de cocotero brinda una oportunidad para su empleo como sistema modelo para el estudio de las interacciones de los patógenos con este cultivo.

1.3 BIBLIOGRAFIA

- Ashburner GR, Cordoba II, Oropeza CM, Illingworth R and Harrison NA** (1996) First report of coconut lethal yellowing disease in Honduras. *Plant Dis.* **80**:960.
- Chan J L, Sáenz 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.
- Daub M** (1986) Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**:159-86.
- Doyle JF and Doyle JL** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Euwens C J** (1976) Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* **36**:23–28.
- Hornung R** (1995) Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. *Plant. Rech. Dev.* **2**:38–41.
- Lee I-M, Gundersen DE, Hammmmond RW and Davis RE** (1994) Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single plant host. *Phytopathology* **84**: 559-566.
- Sáenz L, Chan J L, Souza R, Hornung R, Rillo E, Verdeil J-L, Oropeza C** (1999) Somatic embryogenesis and regeneration in coconut from plumular explants. In: Oropeza, C.; Verdeil, J.-L.; Ashburner, G. R.; Cardeña, R.; Santamaria, J., eds. *Current advances in coconut biotechnology*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 309–318.
- Thomas DL and Donselman HM** (1979) Mycoplasma-like bodies and phloem degeneration associated with declining pandanus in Florida. *Plant. Dis. Rep.* **63**: 911-916.
- Randles J W, Boccardo G and Imperial J S** (1980) Detection of the cadang-cadang associated RNA in African oil palm and buri palm. *Phytopathology.* **70**:185-189.
- Verdeil J-L, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J** (1994) Plant regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant. Cell. Rep.* **13**:218–221.
- Yoder O** (1980) Toxins in pathogenesis. *Annu. Rev. Plant Pathol.* **18**:103-29.
- Zizumbo D, Hernandez F and Harries HC** (1993) Coconut varieties in México. *Economic Botany* **47**: 65-78.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1 El cultivo del cocotero.

El cocotero (*Cocos nucifera* L) pertenece a la familia *Arecaceae* y se encuentra clasificado dentro de la tribu *Cocoeae*, la cual comprende 27 géneros y 600 especies. El cultivo de esta monocotiledónea es de gran importancia económica.

De acuerdo a su distribución, el cocotero es una especie pantropical (Robles, 1983; Persley, 1992). El crecimiento de esta planta se acentúa en las regiones de las áreas costeras del mundo, caracterizadas por poseer suelos con alta salinidad, en donde otras especies son incapaces de sobrevivir.

México es el principal productor de coco del continente americano, con 153,000 hectáreas que representan el 1.4% de la superficie mundial cultivada (FAO, 1999). A nivel nacional, Guerrero es el principal estado productor, seguido de los estados de Colima y Tabasco con superficies cultivadas de 80,001, 33,831 y 27,701 hectáreas, respectivamente; de ellas dependen cerca de 70,000 familias (Domínguez *et al.*, 1998).

Desde el punto de vista de aprovechamiento de este cultivo, la explotación del cocotero es integral, ya que cada una de sus partes es utilizada para distintos fines. Los principales productos derivan de la copra a partir de la cual se extraen aceites de importancia industrial y los cuales poseen una gran demanda (Harries, 1978; Howard *et al.*, 1983; Persley, 1992). La cosecha mundial anual de copra se estimó en 4.9 millones de toneladas en 1982. En ese mismo año el comercio del aceite de coco fue de 1.27 millones de toneladas con un valor de \$657 millones de dólares (Haas *et al.*, 1985). Aproximadamente, el 75% de la producción comercial anual de coco se derivó de plantaciones en el Lejano Oriente (Corner, 1966; Opeke, 1982). Para el 2005 la producción mundial de coco fue de aproximadamente 60 millones de toneladas, obteniéndose una ganancia de 450 millones de dólares (Carlson, 2007).

En México destacan las variedades de cocotero Alto del Pacífico y Alto del Atlántico (Harries, 1978). El cocotero Alto del Pacífico es una variedad económicamente importante debido a su precocidad en el inicio de la producción y a su alto contenido de copra por nuez, que sobrepasa los 250 gramos. El germoplasma del cocotero Alto del Pacífico es útil en trabajos de selección o de formación de híbridos para la búsqueda de precocidad, rendimiento, resistencia a plagas y enfermedades. La importancia del cocotero Alto del Atlántico radica en su tolerancia al estrés abiótico, debido a que se desarrolla en los suelos arenosos y salinos de las costas, tolera períodos de sequía hasta de cuatro meses y períodos de inundación hasta de un mes.

2.2 Enfermedades del Cocotero.

Varios tipos de organismos como: hongos, bacterias, protozoarios, fitoplasmas, virus y viroides son responsables del ataque a las plantas cultivadas. Estos embates pueden causar enfermedades e incluso la muerte en las plantaciones afectadas. Las condiciones para que se dé una interacción entre una planta y algún patógeno varían de acuerdo a factores como el tipo de microorganismo, su tipo de multiplicación (local o sistémica), el tipo de planta (monocotiledónea o dicotiledónea) y las condiciones climáticas, entre otros factores.

En el caso del cocotero, los cultivos de esta especie son atacados por diferentes microorganismos, lo que origina el desarrollo de diversas enfermedades, lo cual ha sido especialmente preocupante en América Latina y el Caribe. El cocotero presenta una serie de características que dificultan su estudio, entre estas se encuentran lo prolongado de su tiempo de germinación, su largo período de crecimiento, el que posee hojas fibrosas, o bien, el que las palmas que presentan alguna enfermedad no puedan ser transferidas al laboratorio para su estudio. Por ello, los estudios en este cultivo se han enfocado principalmente a la detección de enfermedades y a la identificación y caracterización de los organismos que las ocasionan.

2.2.1 Enfermedades virales y viroidales.

En cocotero, se ha reportado una enfermedad viral hasta la fecha, la cual involucra el decaimiento de las palmas. Esta enfermedad es causada por el virus del decaimiento foliar del cocotero (CFDV) (Randles and Hanold, 1989; Randles *et al.*, 1996). En el caso de enfermedades ocasionadas por viroides se han reportado las enfermedades del Cadang-Cadang en Filipinas (Zelazny *et al.*, 1982), causada por el viroide cadang-cadang (CCCVd) y la enfermedad de tinangaja en las islas de Guaján, ocasionada por el viroide tinangaja (CTiVd). Esta última enfermedad fue descrita en 1917 (Weston 1918; Bocardo, 1981). Los síntomas ocasionados por estos viroides son similares, observándose zonas amarillas en las hojas y necrosamiento en las inflorescencias.

2.2.2 Enfermedades bacterianas.

Las bacterias pertenecientes al género *Erwinia* han sido asociadas con la enfermedad denominada pudrición de brotes ("*bud rot*") en el cocotero. Esta enfermedad se presenta cuando las palmas están expuestas a bajas temperaturas. Aún cuando estas bacterias son patógenas del cocotero, la pudrición del brote se ha adjudicado principalmente a las bajas temperaturas, las cuales favorecen la invasión de este patógeno. En Florida incluso, se ha descrito que la enfermedad del *bud rot* es un resultado secundario al daño por frío. Aunque los síntomas de esta enfermedad son similares a los observados en la pudrición del brote ocasionada por hongos, la principal diferencia es que en el *bud rot* ocasionado por bacterias, éstas se establecen en el brote (Elliott, 2004). En Puerto Rico y en otras partes del Caribe se ha reportado el marchitamiento de palmas ocasionado por la bacteria *Micrococcus roseus* (Griffith, 1980).

2.2.3. Enfermedades fúngicas y por oomicetos.

Entre los oomicetos que causan enfermedades a los cultivos de cocotero se encuentra el daño causado por *Phytophthora palmivora*, que ocasiona la enfermedad de la pudrición de las yemas. Dicha enfermedad se ha presentado en cultivos localizados en la zona intertropical (Rodríguez, 1982). La enfermedad causada por el género *Phytophthora* presenta dos síntomas diferentes, la pudrición de brotes, la cual se caracteriza por un marchitamiento y posterior muerte de las palmas, y otro síntoma es la caída de hojas, la cual puede ocasionar el 30% de pérdida del cultivo. Aunque estos

dos síntomas son independientes uno del otro, pueden presentarse simultáneamente en la misma planta (Quillec *et al.*, 1984).

También se ha reportado la enfermedad de las hojas causada por *Endoconidiophora paradoxa* y/o la mancha gris de las hojas ocasionada por *Pestalotia palmarum* Cke (Griffith, 1980). Noriega y colaboradores (1992), reportaron la presencia de enfermedades como el sangrado del tallo ocasionado por *Ceratostomella paradoxa* y el decaimiento de hojas ocasionado por *Botryodiplodia theobromae*. Osorio (1984) reportó la presencia del mal hemorrágico causado por *Thielaviopsis paradoxa*. Las enfermedades Lixa y Queima que afectan a las hojas son ocasionadas por el hongo *Phyllacora torrendiella* y principalmente, se han esparcido por Brasil. Aunque estas enfermedades hasta ahora han sido controlables, se considera que pueden ser una vía para el ataque de otro hongo, *Botryosphaeria cocogena* (Subileau *et al.*, 1990).

2.2.4 Otras enfermedades

Dos enfermedades letales causadas por microorganismos cuyos crecimientos están restringidos al floema son el amarillamiento letal (LY por sus siglas en inglés) y el Hartrot.

El primer brote de LY fue observado inicialmente en las Islas Caimán a finales del siglo XIX y a partir de ahí se ha distribuido en diversas direcciones (McCoy 1983) Haití, Jamaica, Cuba, Florida, Texas, Península de Yucatán y Honduras (Ashburner *et al.*, 1996). Hasta la fecha, no existe un método eficaz para controlar esta enfermedad causada por fitoplasmas. Una alternativa ha sido la generación de híbridos de plantas resistentes (Been, 1981); sin embargo esta estrategia ha sido poco exitosa.

La enfermedad de Hartrot, la cual es causada por un tripanosoma del género *Phytomonas* spp. (Muller *et al.*, 1994), fue observada por primera vez en Surinam a finales del siglo XIX. En un periodo de tiempo comprendido entre las décadas de los 70 y 90s, esta enfermedad se reportó en diversos países: Perú, Salvador, Honduras, Trinidad y Costa Rica. No se conocen híbridos de cocotero que presenten resistencia ante esta enfermedad; el único método de control es el de erradicar el insecto vector mediante el tratamiento con insecticidas; sin embargo, el uso de insecticidas no se considera una estrategia muy apropiada no sólo por los altos costos que representa, sino también por el impacto ambiental que produce y la inevitable resistencia al insecticida que se genera en el vector, entre otros (Mollet, 1999).

Se han reportado otras enfermedades como la denominada Anillo Rojo ocasionada por el nematodo *Rhadinaphelenecus cocophilus* y la causada por el escarabajo *Strategus aloeus* L. que afecta a plantas jóvenes durante los primeros años de la plantación (García, 1981).

2.3 Interacciones entre las plantas y los patógenos

Las plantas y sus patógenos asociados han evolucionado de manera conjunta durante millones de años, por esta razón las primeras desarrollaron sistemas para contender el ataque de éstos; debido a ello cada célula puede poseer sistemas de defensa establecidos y/o inducidos (Walbot, 1983).

Los estudios de las bases bioquímicas y genéticas de la resistencia a las enfermedades han generado una considerable cantidad de conocimiento (Hammond, 1996), el cual ha sido aplicado al mejoramiento de los cultivos con el fin de hacerlos resistentes ante el ataque de ciertos patógenos. Esto ha constituido una herramienta valiosa para el control de enfermedades (Crute, 1996).

Para que un patógeno cause una enfermedad, necesita interferir con una o más funciones esenciales de la planta. Un prerrequisito para la patogenicidad de un microorganismo es el de ser capaz de acceder al interior de la planta, esto lo puede realizar por diferentes medios. Algunos microorganismos toman ventaja de las aperturas naturales, como los estomas y las lenticelas (Melotto *et al.*, 2006), o se introducen a través de heridas; mientras otros simplemente penetran la superficie de las plantas. Los hongos, pueden crecer formando finas hifas directamente dentro de las células epidérmicas de la planta. Los oomicetos y nematodos penetran la planta generándose camino por o entre las células, mientras que las bacterias penetran a través de heridas y aperturas naturales de la planta. En la mayoría de las enfermedades ocasionadas por hongos, éstos no penetran solamente la cutícula sino también la pared celular (Kritzman *et al.*, 1981; Kunoh 1984). Los microorganismos también cuentan con proteínas que son empleadas para penetrar a través de la pared celular. Por ejemplo, ciertos hongos, como *Monilinia fructicola*, secretan cutinasas (Guang *et al.*, 2000), mientras que otros organismos producen un arsenal de enzimas extracelulares, incluyendo pectinasas, celulasas y poligalacturonasas, que degradan la pared celular (Toth *et al.*, 2003).

Los mecanismos de virulencia que los microorganismos emplean para sobrepasar las barreras físicas de la planta con el fin de acceder a los nutrientes, incluyen la secreción de toxinas, reguladores del crecimiento y otros compuestos que alteran el metabolismo de la planta o que interfieren con las defensas de ésta (Agrios 2005). Las plantas son atacadas por una amplia variedad de microorganismos patógenos; sin embargo, la capacidad de los microorganismos de causar enfermedades es la excepción más que la regla. Debido a que las plantas poseen pared celular, así como mecanismos celulares que reconocen la invasión de los patógenos y activan los mecanismos de defensa, éstas son generalmente resistentes a la mayoría de los patógenos (Heath, 2000; Nurberger *et al.*, 2004). Ante estas barreras, los patógenos requieren evadir o suprimir las defensas de las plantas. La percepción de los patógenos se lleva a cabo por medio de receptores celulares capaces de reconocer moléculas conservadas en los microorganismos o proteínas efectoras específicas (Montesado *et al.*, 2003). Las plantas evitan la infección de patógenos mediante dos vías: mediante las barreras estructurales que evitan el acceso y el posterior esparcimiento a través de la planta y mediante barreras naturales o por reacciones bioquímicas que tiene lugar en el sitio de la infección. La combinación de estos dos tipos de defensa varía entre las diferentes interacciones planta-patógeno (Glazebrook, 2005).

Por último, si la planta no es capaz de reconocer al patógeno o a las moléculas inductoras derivadas de su interacción con éste, los sistemas de defensa no se establecen, lo que resulta en la enfermedad. Alternativamente, si la planta responde mediante la inducción de los mecanismos de defensa, es posible detener la infección o reducirla.

2.4 Descripción de los sistemas de defensa de las plantas

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa tanto preformados como inducibles que les permiten confrontar la presión de microorganismos patógenos. La resistencia de una especie vegetal a todas las cepas de un patógeno es llamada resistencia no específica, éste es el tipo de resistencia más generalizado en las plantas (da Cunha *et al.*, 2006); por ejemplo, a través de este tipo de resistencia *Solanum lycopersicum* puede contender ante el ataque de ciertos patógenos de manera específica, los cuales no infectan otras especies, como podría ser *Picea sp.*, y viceversa. Los mecanismos a través de los cuales se da la resistencia no específica se valen de sistemas de defensas preformados o constitutivos que normalmente están asociados con la estructura de la planta, así como compuestos químicos que siempre están presentes en la planta. Los sistemas preformados incluyen barreras estructurales, como la pared celular, así como compuestos con actividades inhibitorias como los compuestos fenólicos y los taninos (Heath, 2000). Una vez transcurrida esta fase de la respuesta, la planta ejecuta las llamadas defensas inducibles que se desencadenan ante el reconocimiento del patógeno. La defensa basal está constituida por los procesos implicados en la resistencia no específica del hospedante (non-host resistance) y en la resistencia específica del hospedante (host resistance). Ambos procesos proveen una resistencia basal (también llamada inmunidad innata o resistencia local inducida) que previene la infección por un amplio rango de microorganismos (Thordal-Christensen, 2003; Oh and Collmer, 2005). A través de la evolución, algunos patógenos han adquirido la capacidad de evadir o suprimir las defensas basales de las plantas e incrementar su virulencia mediante la liberación de proteínas efectoras que interfieren con las defensas de las plantas. El tipo de resistencia específica gen a gen o raza-cultivar específica, se presenta cuando miembros específicos de una especie han adquirido resistencia sobre una raza específica de un patógeno. Este tipo de resistencia está usualmente restringida a una especie de patógenos en particular; es decir sólo se expresa sobre un genotipo específico (Dangl and Jones, 2001; Chisholm *et al.*, 2006).

2.4.1 Sistemas de defensa constitutivos

Aparte de la imposibilidad para desplazarse en busca de ambientes más favorables, las plantas difieren de los animales en dos aspectos que determinan profundamente las estrategias a seguir para defenderse de los patógenos: 1) las plantas carecen de un sistema inmunológico, de forma que no existen células especializadas para defender el organismo, por lo que cada célula individual debe poseer la capacidad de responder al ataque del patógeno y; 2) las plantas pueden perder porciones considerables de su estructura sin que ello traiga consigo problemas de supervivencia, pudiendo auto inducir la muerte de órganos invadidos por el patógeno, lo cual evita la propagación de éste al resto de la planta.

El proceso de interacción entre el hospedero y el patógeno es un proceso dinámico en el que ambos intervienen (Kniskern and Rausher, 2001). Cada patógeno ha evolucionado de una forma distinta en cuanto al modo en que invade a su planta huésped.

La existencia de distintas barreras de defensa en la planta, junto con las condiciones ambientales presentes en un determinado momento, condiciona el éxito del patógeno en cuanto a su colonización y proliferación en el hospedero. En general, las plantas se defienden contra estos organismos mediante una combinación de características estructurales y bioquímicas, que varía con el estado de desarrollo de la planta, el tipo de órgano y el tejido afectado.

Las condiciones nutricionales y ambientales en que se encuentran las plantas pueden fluctuar y estos cambios pueden afectar la capacidad de invasión del patógeno. Además de las barreras de defensa presentes antes de la infección del patógeno en la planta, el reconocimiento del patógeno induce la activación de nuevas respuestas de defensa que permiten restringir el sitio de infección y el refuerzo de otras barreras previas ya existentes, lo que constituye las defensas inducibles.

2.4.1.1 Barreras físicas

La primera línea de defensa de las plantas frente a los organismos patógenos la constituye su propia superficie, que el patógeno debe penetrar para producir la infección. Las defensas estructurales que se encuentran presentes en la planta antes de que se produzca el reconocimiento del patógeno están constituidas por la cantidad y tipo de ceras que cubren las células epidérmicas, la estructura de la pared celular, el tamaño, la localización y la forma de los estomas y las lenticelas, etc.. (Underwood *et al.*, 2007). Las ceras presentes en la superficie de hojas y frutos actúan como repelentes del agua previniendo la formación de una película de humedad en la que los patógenos podrían depositarse, desarrollarse (hongos) y multiplicarse (bacterias). También la existencia de una zona muy densa de vellosidades en la superficie de la planta puede ejercer este mismo efecto repelente del agua y por lo tanto, reducir la posibilidad de colonización de la superficie por parte de los patógenos.

Por otra parte, una cutícula gruesa podría incrementar la resistencia a la infección en aquellos casos en los que el patógeno sólo sea capaz de producir infección cuando penetra en el interior del huésped.

El grosor y la composición de la pared celular son factores importantes en la generación de resistencia a la entrada de los patógenos. La presencia de paredes gruesas dificulta la penetración de los hongos, aún cuando éstos pueden alcanzar el interior a través de heridas presentes en la superficie de la planta.

2.4.1.2 Barreras químicas

Antes de que se produzca el reconocimiento del patógeno, las barreras químicas presentes en la planta resultan mucho más efectivas que las defensas estructurales. Normalmente, las plantas exudan una amplia variedad de sustancias a través de su superficie, especialmente por las raíces. Algunos de los compuestos secretados son producidos exclusivamente por determinadas especies de plantas y parecen tener una función inhibitoria frente a determinado tipo de patógenos (Van Etten *et al.*, 1994). Algunos exudados producidos en la superficie de las hojas son tóxicos para los hongos, como los producidos por las plantas de *Solanum lycopersicum* y *Saccharum officinarum*, que se producen en cantidades suficientes para inhibir la germinación de las esporas de los hongos *Botrytis* y *Cercospora*, respectivamente. Así mismo, en el

caso de determinadas variedades de *Allium cepa* L., resistentes al hongo *Colletotricum circinans*, se ha comprobado la secreción de compuestos fenólicos que no son producidos por las variedades susceptibles de cebolla. Se ha propuesto que la presencia de fenoles y taninos y de algunos compuestos derivados de ácidos grasos, como algunos dienos, presentes en elevadas concentraciones en frutos jóvenes, hojas o en semillas, son las responsables de la resistencia de tejidos jóvenes a organismos fitopatógenos. Muchos de estos compuestos actúan como inhibidores de enzimas hidrolíticas fúngicas. Otros compuestos con actividad inhibitoria son: las saponinas (compuestos esteroides y triterpenoides glucosilados) (Osbourn, 1996; Morrissey and Osbourn, 1999), la tomatina en *Lycopersicon esculentum* y la avenacina en *Orizya sativa*: de éstos últimos se sabe que presentan actividad lítica sobre membranas. Además, se han descrito determinadas proteínas vegetales que actúan como inhibidoras de proteinasas del patógeno o de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de la planta, que inactivan ribosomas no reconocidos como propios de la planta, o que incrementan la permeabilidad de la membrana fúngica. De forma similar, las lectinas, proteínas que unen de forma específica cierto tipo de azúcares y que se presentan en alta concentración en muchos tipos de semillas, producen lisis e inhibición del crecimiento de muchos tipos de hongos. Así mismo, las glucanasas y las quitinasas presentes en las secreciones y en la superficie de las células vegetales actúan degradando la pared celular del patógeno, contribuyendo a contrarrestar la infección (Valueva and Mosolov, 2004).

2.4.2 Sistemas de defensa inducibles

La resistencia inducida es un estado fisiológico en el cual se incrementa la capacidad defensiva de la planta. Este estado es inducido por estímulos ambientales específicos, en donde las defensas innatas de la planta son potenciadas después de un cambio biótico (van Loon *et al.*, 1994). Se ha demostrado que el incremento sobre este estado de resistencia es efectivo sobre un amplio rango de patógenos y parásitos, incluyendo hongos, bacterias, virus, nemátodos, plantas parásitas, así como insectos herbívoros (Benhamou and Nicole, 1999; McDowell and Dangl, 2000; Walling, 2000). Las dos formas de resistencia inducida mejor estudiadas son la resistencia sistémica adquirida (SAR por sus siglas en inglés) y la resistencia sistémica inducida (ISR por sus siglas en inglés).

Estos sistemas inducidos de resistencia pueden ser diferenciados con base en la naturaleza del inductor, así como de acuerdo con las rutas metabólicas involucradas, tal como se ha demostrado en plantas modelo (Maleck *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 2000; Van wees *et al.*, 2000)

2.5 Clasificación de los sistemas de defensa con base en su localización en la planta

2.5.1 Respuestas locales

Las respuestas locales que se desencadenan como consecuencia de la invasión por patógenos o mediadas por ciertos inductores, involucran la regulación de una gran diversidad de genes, cuyos productos contribuyen a generar condiciones fisiológicas especiales durante la invasión del patógeno. Las respuestas que se desencadenan en el sitio de la infección incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species) (Wojstaszek, 1997), la síntesis de proteínas involucradas en la producción de moléculas señalizadoras como el ácido salicílico (SA, por sus siglas en inglés), el jasmonato de metilo (MeJA) y el etileno (ET) (Malamy *et al.*, 1990; Enyedi *et al.*, 1992; Creelman and Mullet, 1995), y de enzimas relacionadas con el metabolismo de los fenilpropanoides (Hahlbrock and Scheel, 1989; Dixon and Paiva, 1995) y la biosíntesis de fitoalexinas (Smith, 1996).

2.5.1.1 La respuesta de hipersensibilidad (HR)

Como se mencionó anteriormente, las ROS son moléculas involucradas en la protección contra patógenos durante los eventos primarios de protección. Dentro de las ROS se encuentra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el oxígeno molecular (O_2). La producción de este tipo de moléculas ocurre normalmente en el metabolismo celular de las plantas, tanto en el transporte de electrones que ocurre en cloroplastos y en mitocondrias, como por enzimas que se encuentran en otros compartimentos celulares y en el apoplasto, las cuales se encuentran involucradas en procesos de oxido-reducción (Mehdy, 1994; Foyer, 1994). Se plantea que el OH^\cdot es la especie más reactiva debido a dos aspectos fundamentales: su habilidad para iniciar reacciones involucradas en la modificación irreversible de macromoléculas y al daño que provoca sobre organelos. Aun cuando estas especies ocasionan daños tanto en la planta como en el patógeno, también tienen un papel benéfico; por ejemplo, en la síntesis de lignina en la pared celular (Lewis and Yamamoto 1990; Foyer *et al.*, 1994)

Para evitar el daño ocasionado por la acumulación de ROS, las células vegetales contienen sistemas enzimáticos y no enzimáticos que se encuentran en los compartimentos subcelulares y en los espacios apoplásticos. Entre los sistemas enzimáticos podemos mencionar a las catalasas, las superóxido dismutasas, las peroxidasas y a enzimas involucradas en el ciclo del glutamato. Entre los sistemas no enzimáticos se encuentran metabolitos antioxidantes como el ascorbato, el glutatión, los flavonoides, los carotenoides y el α -tocoferol (Polle, 1997).

Durante las interacciones planta-patógeno se han observado dos tipos de explosión oxidativa. Una que ocurre en las primeras dos a cuatro horas después de la infección, y la segunda fase después de dicho período de tiempo (Lamb and Dixon, 1997). Las fuentes de ROS más estudiadas durante las interacciones planta-patógeno son las generadas a través del complejo de NADPH-oxidasa localizado en la membrana plasmática, (Grant and Loake, 2000). Durante la generación de ROS, se activan mecanismos de desintoxicación, entre los que se encuentran las oxidasas resistentes

a cianidina (oxidasas alternas), las cuales se encuentran localizadas en las membranas de las mitocondrias y aceptan electrones de las pozas de ubiquinona, la captación de electrones es empleada durante la reducción de oxígeno a agua, sin conservación de energía, a través de la formación de un gradiente de protones. A la fecha, se han reportado diferentes evidencias que demuestran la participación de este tipo de enzimas involucradas en la reducción de ROS en la respuesta de defensa de las plantas contra patógenos. Entre 1995 y 1996 se demostró un incremento de la actividad enzimática de oxidasa alterna por peróxido de hidrógeno (Vanlerberghe and McIntosh, 1992; Wagner, 1995). Por otra parte, durante la acumulación de peróxido de hidrógeno inducida por salicilato, se detectó la inducción de oxidasas alternas (Raski, 1992). Estos estudios sugieren que las oxidasas alternas participan como parte de los sistemas de defensa antioxidante cuando se incrementan los niveles de ROS (Skulachev, 1996). Por su parte, Popov y colaboradores (1997) demostraron que la inhibición de oxidasas alternas estimula la producción de peróxido de hidrógeno.

2.5.1.2 Cambios celulares asociados con la HR

Después de la percepción del patógeno o del inductor, en las células vegetales ocurre una serie de cambios citológicos y de eventos bioquímicos, entre los que se incluyen la formación de papila, la modificación del flujo citoplásmico, así como la migración de moléculas al núcleo. También se ha reportado que estos cambios están asociados con la despolimerización de microtúbulos y microfilamentos (Kombink and Schmelzer, 2001). Entre los cambios bioquímicos se puede mencionar el flujo de iones a través de la membrana plasmática (H^+ , Cl^- , K^+ y Ca^{2+}) y la generación de ROS, entre otros.

La generación de ROS en plantas tiene similitud con la "explosión oxidativa" descrita en mamíferos (Dwyer *et al.*, 1996); en ambos organismos, el incremento en los niveles de ROS como H_2O_2 y radicales superóxido (O_2^-), ocasiona un daño celular tanto para el hospedero como para el patógeno (Nürnbergger, 1994; Dixon *et al.*, 1994; Mehdy, 1994; Low and Merida, 1996); aunado a esto, el H_2O_2 contribuye al re-fortalecimiento de la pared celular, fenómeno conocido como lignificación de la pared celular (Bowles, 1998). Por otra parte, se ha visto que las ROS inducen la expresión de una amplia variedad de genes de defensa en plantas, además de contribuir al incremento en la resistencia contra *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* en plantas transgénicas de tabaco (Lamb *et al.*, 1997; Bowles, 1998).

Algunas de las respuestas bioquímicas se han asociado con mecanismos de transducción de señales en la defensa contra patógenos. Como ejemplo se puede mencionar el flujo de iones Ca^{2+} que a su vez ha sido asociado con la inducción de la síntesis de fitoalexinas (Dixon *et al.*, 1994). Los eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas son otros eventos primarios asociados con el reconocimiento del patógeno y están asociados al desencadenamiento de cascadas de transducción de señales involucradas en las respuestas de defensa (Dixon *et al.*, 1995). La identificación de varias MAP cinasas (MAPK), así como de receptores tipo cinasa, durante la activación de respuestas de defensa denota la relevancia que tienen los procesos de fosforilación-desfosforilación durante los procesos de señalización del proceso de defensa (Asai *et al.*, 2002).

2.5.2 Respuestas sistémicas

2.5.2.1 La resistencia sistémica adquirida

La resistencia sistémica adquirida (SAR) se desencadena por exposición de la planta a microorganismos virulentos o avirulentos, así como por microorganismos no patogénicos; este proceso también es desencadenado mediante la aplicación de compuestos químicos artificiales tales como el ácido salicílico, el ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) y el éster del ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazol-7-carbotiólico S-metil éster (BTH) (Sticher *et al.*, 1997), entre otros.

Dependiendo de la planta así como del inductor, es necesario un periodo de tiempo para el establecimiento de este tipo de resistencia. Este tiempo es el necesario para una acumulación coordinada de proteínas relacionadas con la patogénesis y del ácido salicílico (SA) producido por la planta (Ward *et al.*, 1991). Durante el establecimiento de esta resistencia se ha evidenciado la inducción de fitoalexinas, de ROS (Alvarez, 1998; Kuć, 2001), así como también de diferentes proteínas de defensa, incluyendo algunas proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, por sus siglas en inglés) (Tabla 2.1). Aunque la función de algunas de estas proteínas aún no es clara, a través de experimentos realizados *in vitro* se ha demostrado que tienen un efecto letal sobre los patógenos. Las proteínas PR incluyen, entre otras, a las glucanasas y a las quitinasas, las cuales causan daño en la pared celular del patógeno (Broglie *et al.*, 1991; Fritig *et al.*, 1998). Por otra parte, existen evidencias que sugieren que la inducción de la resistencia en plantas resulta de una red compleja de transducción de señales, lo cual implica el entrecruzamiento de diferentes vías de transducción de señales (Feys and Parker, 2000).

Tabla 2.1 Familia de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) (Van loon *et al.*, 2006).

Familia	Miembro	Actividad enzimática	Gen
PR-1	Tabaco PR-1a	Desconocida	Ypr1
PR-2	Tabaco PR-2	β -1,3-glucanasa	Ypr2, [Gns2 ('Glb')]
PR-3	Tabaco P,Q	Quitinasa tipo I, II, IV, V, VI, VII	Ypr3, Chia
PR-4	Tabaco R	Quitinasa tipo I, II	Ypr4, Chid
PR-5	Tabaco S	Tipo taumatina	Ypr5
PR-6	Inhibidor jitomate I	Inhibidor de Proteinasa	Ypr6, Pis ('Pin')
PR-7	Jitomate P ₆₉	Endoproteinasa	Ypr7
PR-8	Pepino	Quitinasa tipo III	Ypr8, Chib
PR-9	Tabaco	peroxidasa	Ypr9, Prx
PR-10	Perejil	Tipo ribonucleasa	Ypr10
PR-11	Tabaco clase V	Quitinasa tipo I	Ypr11, Chic
PR-12	Rabano	Defensina	Ypr12
PR-13	Arabidopsis THI 2.1	tionina	Ypr13, Thi
PR-14	Cebada LTP4	Proteína transportadora de lípidos	Ypr14, Ltp
PR-15	Cebada OxOa	Oxalato oxidasa	Ypr15
PR-16	Cebada OxOLP	Tipo oxalato oxidasa	Ypr16
PR-17	Tabaco PRp27	Desconocida	Ypr17

2.5.2.2 La respuesta sistémica inducida

La resistencia sistémica inducida (ISR) es potenciada por bacterias (promotoras del crecimiento vegetal) (PGPR por sus siglas en inglés) entre las que se han caracterizado las del género *Pseudomonas*, que no causan daño visible al sistema radicular de la planta (Van Loon *et al.*, 1998). A diferencia del SAR, el ISR no involucra la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), ni al SA; sin embargo, se ha observado una estimulación en las vías reguladas por el jasmonato de

metilo (MeJA) y el etileno (Et) (Knoester *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2000). Tanto el SAR como el ISR requieren de la presencia de una proteína funcional denominada NPR1.

2.6 Las señalizaciones químicas

El reconocimiento del patógeno por parte de la planta desencadena diversos eventos celulares donde suceden varias respuestas inmediatas y locales en la célula, dentro de las cuales se encuentran el cambio en el flujo de iones y la alcalinización del citoplasma (Wojstaszek, 1997). Algunos de estos eventos se activan segundos o minutos después que ocurre la percepción del patógeno. Al activarse la cascada de señalización mediada por cinasas, que involucra a las MAPK y a las proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPKs), se amplifican las primeras respuestas de defensa (Peck, 2003; Ludwig *et al.*, 2005). A su vez, el evento de reconocimiento del patógeno así como las respuestas tempranas de defensa desencadenan la producción de moléculas señalizadoras como el SA, el MeJA y el Et. Estas moléculas actúan a través de dos rutas de defensa en las plantas, una dependiente de SA y la otra dependiente de MeJA y ET, lo cual da como resultado la adquisición de resistencia contra diferentes patógenos (Thomma *et al.*, 1998).

2.6.1 El ácido salicílico

El SA es un compuesto fenólico que participa en diversos procesos fisiológicos, incluyendo la defensa contra patógenos. La biosíntesis de SA se inicia en la ruta del shikimato. Un gran número de estudios realizados en diferentes modelos, incluyendo tabaco, papa y *Arabidopsis* indican que la síntesis de SA inicia a partir de la fenilalanina vía el ácido cinámico (Lee *et al.*, 1995; Silverman *et al.*, 1995; Mauch-Mani and Slusarenko, 1996; Shulaev *et al.*, 1997; Coquoz *et al.*, 1998). Sin embargo, estudios recientes en *Arabidopsis* indican que el SA también se sintetiza a partir del corismato, vía isocorismato. El SA sintetizado a partir de esta ruta se requiere en las respuestas de defensa contra patógenos tanto local como sistémica (Wildermuth *et al.*, 2001). El hecho de que la síntesis de SA inicia a diferentes niveles dentro de la compleja ruta de los fenilpropanoides, probablemente refleja el hecho de que el SA puede estar generándose a partir de rutas alternativas.

Son varias las evidencias que indican que el SA participa en los eventos de defensa contra patógenos en plantas. Se ha observado que durante la interacción planta-patógeno, los niveles de SA se incrementan tanto a nivel local como sistémico: por ejemplo, en plantas de tabaco infectadas con el virus del mosaico del tabaco (TVM por sus siglas en inglés), el SA se incrementa 20 veces en las hojas infectadas y de 5 a 10 veces en tejidos no infectados (Malamy *et al.*, 1990; Yalpani *et al.*, 1991). Este incremento está relacionado con la inducción de proteínas de resistencia contra patógenos (e.g., PR) (White 1979; Ward *et al.*, 1991). La evidencia experimental sugiere fuertemente que el SA está involucrado en respuestas de defensa. Este compuesto se propuso originalmente como una molécula de señalización difusible en la respuesta sistémica adquirida (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). Por otra parte, el SA puede ser transportado en hojas de tabaco y pepino no infectadas (Shulaev *et al.*, 1995; Mölders *et al.*, 1996).

En tabaco se ha demostrado la existencia de dos grupos de genes que se inducen diferencialmente por SA, aquéllos que se expresan de manera inmediata y aquellos que se expresan después de varias horas de tratamiento. Entre los genes que se expresan de manera tardía por el tratamiento con SA se encuentran los que codifican proteínas PR-1. Esta expresión requiere de la síntesis *de novo* de proteínas (Uknes *et al.*, 1993; Qin *et al.*, 1994). Entre los genes que se expresan de manera inmediata, después de 30 min de inducción con SA, se encuentra el gen que codifica la proteína GST1 (glutathione S transferase 1) (Xiang *et al.*, 1996) y el que codifica la proteína IETG (glucosil transferasa de inducción temprana) (Horvath and Chua, 1996). A diferencia de los genes expresados de manera tardía, la activación de los genes de expresión temprana no requieren la síntesis *de novo* de proteínas (Horvath *et al.*, 1998). A pesar de la diferencia en la cinética de activación en los promotores de los genes *PR-1a* (Strompen *et al.*, 1998) y *GST1* (Droog *et al.*, 1995) de tabaco, se ha evidenciado la presencia de un elemento de respuesta a SA denominado secuencia de activación-1 (*as-1*). La participación de *as-1* en la inducción por SA de genes tempranos y tardíos también se ha reportado en otras especies diferentes a *Nicotiana tabacum*, tal es el caso de *PR-1* y *GST6* en *Arabidopsis*.

La secuencia *as-1* se caracteriza por poseer dos secuencias palindrómicas imperfectas (TGACGTCA), las cuales se unen a la familia de factores transcripcionales TGA presentes en plantas (Krawczyk *et al.*, 2002; Lam and Lam, 1995; Xiang *et al.*, 1997). La interacción entre elementos tipo *as-1* y el factor TGA (factor transcripcional con motivo de cierre de leucina) es crucial para la regulación de los genes *PR* y *GST* en tabaco (Johnson *et al.*, 2001; Pontier *et al.*, 2001; Fan and Dong, 2002). La interacción entre los elementos tipo *as-1* y el factor TGA en la activación de los genes tardíos involucra a una proteína denominada NPR1. Se ha demostrado que mutantes de *Arabidopsis* que carecen de la proteína NPR1 no expresan genes *PR*, ni desarrollan resistencia contra patógenos al ser tratadas con SA o análogos de SA (Cao *et al.*, 1994). Evidencias recientes respaldan la idea de que la interacción de NPR1 con el factor TGA2 de *Arabidopsis* es promovido vía SA, lo cual es esencial para la activación de genes *PR-1* (Deprés *et al.*, 2000; Fan and Dong, 2002; Kinkema *et al.*, 2000; Subramaniam *et al.*, 2001).

2.6.2 El ácido jasmónico y el jasmonato de metilo

El ácido jasmónico (JA), así como otros derivados estructurales (jasmonatos) incluyendo al MeJA, actúan como señales involucradas en sistemas de defensa de las plantas, así como también en procesos de desarrollo en la biogénesis del polen (Sembdner and Parthier, 1993; Creelman and Mullet, 1997). Los diferentes jasmonatos son sintetizados a partir del ácido linolénico, el cual es oxidado por lipoxigenasas (LOX) para formar ácido 13-hidroxilinoilolénico.

El análisis genético de mutantes de *Arabidopsis* afectadas en la biosíntesis o percepción de esta fitohormona demostró el papel del MeJA en los sistemas de defensa en plantas (Feys *et al.*, 2000).

Se han detectado incrementos en los niveles de jasmonatos en diferentes plantas después de ser heridas y posterior al ataque por patógenos, así como por el tratamiento con inductores (Creelman and Mullet, 1995). Por otra parte, el tratamiento

de plantas con JA o con MeJA incrementa su resistencia contra el ataque por patógenos (Cohen *et al.*, 1993). El JA y el MeJA regulan la expresión de varios genes incluyendo los que codifican inhibidores de proteinasas PR, así como también genes involucrados en la síntesis de fitoalexinas (Farmer *et al.*, 1992; Reinbothe *et al.*, 1994; Wasternack and Parthier, 1997). Precursores de la ruta de los octadecanóicos, los cuales son precursores de JA y del MeJA, activan la síntesis de inhibidores de proteinasas (Farmer and Ryan, 1992).

2.6.3 El etileno

El Et es una molécula gaseosa que regula diversos procesos en las plantas, tanto del desarrollo, como en las respuestas de defensa contra factores de estrés biótico y abiótico (Bleecker and Kende, 2000). Se ha observado que los niveles de Et se incrementan ante una herida, un tratamiento con inductores y ante una infección por patógenos (Enyedi *et al.*, 1992; O'Donnell *et al.*, 1996). El Et regula la expresión de varios genes, incluyendo los que participan en las repuestas de defensa contra estrés biótico por ejemplo, los genes que codifican proteínas PR, tales como glucanasas y quitinasas (Deikman, 1997). Aún cuando la evidencia experimental indica que esta fitohormona tiene una función en el establecimiento de la resistencia en determinados sistemas, también se ha reportado evidencia contradictoria que sugiere que el Et juega un papel promotor en la enfermedad, tal es el caso de los mutantes insensibles a etileno 2 (*ein2*) de *A. thaliana*, en los cuales se exhibe un incremento a la susceptibilidad a *Botritis cinerea* (Thomma *et al.*, 1999) y a *E. carotovora* (Norman *et al.*, 2000); sin embargo, en estos mismos mutantes se detectó un descenso en los síntomas cuando fueron infectados con cepas virulentas de *P. syringae* o de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Bent *et al.*, 1992). Estos efectos de tolerancia, así como en el aumento de la enfermedad, también han sido reportados en soya (Hoffman *et al.*, 1999). Experimentos realizados por Thomma y colaboradores (2001) y los reportados por Ton y colaboradores (2001) en donde prueban la interacción entre varios hongos y bacterias patogénicas de diferentes accesiones y varios mutantes de *Arabidopsis*, concluyeron de manera general que el Et contribuye a la resistencia sobre patógenos necrótróficos, pero no sobre patógenos biotróficos

2.7 Patrones moleculares asociados con el patógeno

Unos de los retos más importantes para la planta es el de ser capaz de discriminar entre un elevado número de patógenos potenciales de aquellos que no lo son. Ahora sabemos que ésto lo lleva a cabo mediante el uso de receptores capaces de reconocer moléculas foráneas pertenecientes al patógeno. Para ello, durante el proceso evolutivo, en las plantas se han seleccionado receptores que reconocen motivos altamente conservados en moléculas que están presentes en los patógenos (Parker, 2003). Estos motivos, denominados PAMPs (patrones moleculares asociados al patógeno), forman parte de moléculas que generalmente son imprescindibles para la supervivencia del patógeno, por lo que no están sujetos a rápidas tasas de cambio por mutaciones, que les permitirían evadir el reconocimiento por parte del receptor vegetal. Además, estas moléculas son compartidas por un elevado número de

patógenos, lo que permite a la planta restringir el número de receptores necesarios para el reconocimiento de los mismos. Durante los últimos años se han aislado y caracterizado numerosos inductores inespecíficos en virus, hongos y bacterias. Estos inductores actúan como señales que, en muy bajas concentraciones, ponen en evidencia la presencia del patógeno y algunos de ellos se han considerado dentro de la categoría de PAMPs (Gómez-Gómez, 2004). La percepción selectiva de PAMPs por las plantas implica la existencia de receptores específicos. Al menos para los inductores de tipo hidrofílico, se espera que se encuentren situados a nivel de la membrana plasmática y de hecho, se han identificado posibles sitios de unión de algunos de estos inductores asociados a membranas vegetales (Nurnberger *et al.*, 1997; Parker and Coleman 1997). Este modelo de percepción en plantas es similar a la inmunidad innata de animales (Guttman, 2004), donde el reconocimiento de PAMPs es responsable de mediar las respuestas pre-inflamatorias. En plantas, el sistema de percepción de PAMPs está ejemplificado por el sistema de reconocimiento del elicitador bacteriano flagelina (Gómez-Gómez *et al.*, 1999; Gómez and Boller, 2000), que también es reconocida por animales e insectos como señal de la presencia de bacterias patógenas (Smith and Ozinsky, 2002). La proteína flagelina es el componente principal del flagelo bacteriano, órgano locomotor de la bacteria. La flagelina de las bacterias patógenas presenta actividad inductora en distintas especies vegetales, siendo un elicitador inespecífico (Felix *et al.*, 1999). La actividad inductora de la molécula está localizada en el dominio amino terminal de la proteína, y más concretamente, en una región de 25 aminoácidos que se encuentra altamente conservada entre las moléculas de flagelina de distintas especies de bacterias patógenas, pero que, sin embargo, difiere en el caso de las flagelinas de los flagelos de bacterias no patógenas, como es el caso de la bacteria *Rhizobium*, que establece simbiosis con distintas especies de plantas. Un péptido sintético, la flg22, diseñado con la secuencia de aminoácidos de esta región conservada, tiene la misma actividad inductora que la molécula completa de flagelina, demostrando con ello que esta región es la que ligan específicamente las células vegetales para detectar la presencia de bacterias patógenas. Este péptido sintético fue empleado para aislar e identificar el receptor responsable de su percepción en las células vegetales. La unión de la flagelina al receptor FLS2 permite la activación de las respuestas de defensa en la planta frente a la bacteria patógena, a través de una cascada de señalizaciones (Gómez *et al.*, 2001). Así, se desencadenan dos tipos de respuestas; una respuesta rápida que consiste en la alcalinización del medio extracelular, la generación de especies reactivas de oxígeno, la producción de etileno que, a su vez, actúa de activador de otras respuestas de defensa y la deposición de callosa; la segunda respuesta implica la activación de la transcripción de genes cuyos productos están implicados en la respuesta de defensa de la planta, bien de forma directa como es el caso de muchas proteínas PR, péptidos antimicrobianos y defensinas (Castro and Fontes, 2005), o bien, participando en la amplificación de la señal de alarma en la planta.

2.7.1 Clasificación de los Inductores

Las plantas exhiben un amplio rango de estrategias de defensa ante el ataque de organismos patógenos. Esta resistencia es llevada a cabo por sistemas preexistentes (defensas constitutivas) y por defensas inducibles. Las respuestas de defensa inducibles son desencadenadas tras el reconocimiento de un amplio rango de factores químicos denominados inductores (Hammond and Jones, 2000). En un principio, el término inductor fue empleado para definir moléculas capaces de inducir la producción de fitoalexinas; sin embargo, actualmente el término inductor es aplicado a compuestos que estimulan algún tipo de defensa del tipo biótico o abiótico en plantas (Ebel and Cosio, 1994; Hahn, 1996; Nuernberger, 1999). Los primeros inductores bióticos fueron descritos a principios de los años 70 (Kenn, 1975). Los inductores encienden varios mecanismos de defensa en plantas, incluyendo las especies reactivas de oxígeno, las respuestas de hipersensibilidad y la producción de fitoalexinas (Montesano *et al.*, 2003). De acuerdo con Radman y colaboradores (2003), los inductores son clasificados como físicos o químicos, bióticos, abióticos y complejos o definidos dependiendo tanto de su origen como de su estructura molecular (Tabla 2.2).

Los inductores bióticos son moléculas que se originan tanto del patógeno como del hospedero y que pueden inducir respuestas de defensa, como la acumulación de fitoalexinas o respuestas de hipersensibilidad en plantas. Preparaciones biológicas complejas donde la estructura molecular del compuesto activo es desconocida han sido empleadas como inductores.. Ejemplos de tales inductores son los extractos de levaduras, así como extractos preparados a partir de la pared celular de hongos. En años recientes, se ha dilucidado la estructura molecular de algunos de los componentes de estos extractos, los cuales contienen polisacáridos, oligosacáridos, proteínas, glicoproteínas o ácidos grasos (Anderson, 1989; Hahn, 1996).

Tabla 2.2 Clasificación general de los inductores de respuestas de defensa en plantas.

Inductores						Efecto Reportado en
Inductores físicos	Herida					P
Inductores químicos	Abióticos	Iones metálicos (lantanos, calcio, plata, cadmio)				Pc
	Bióticos	Composición compleja	Pared celular de levaduras, micelio, esporas			Pc, F
		Composición definida	Carbohidratos	Polisacáridos	Alginato	Pc, F, B
					Pectina	Pc, F
			Oligosacáridos	Quitano	Pc	
				Mannuronato	F	
		Proteicos	Péptidos	Guluronato	F	
				Mannanos	F	
			Proteínas	Galacturanos	Pc	
	Glutación			Pc		
Lípidos		Lipopolisacáridos	Pc			
Glicoproteínas		No caracterizado	Pc			
Volátiles		C ₆ -C ₁₀				

Abreviaturas: **P**: plantas; **Pc**: cultivo celulares de plantas; **B**: cultivo celulares de bacterias; **F**: cultivo celulares de hongos.

Los inductores proteicos son otra clase que desencadena reacciones de defensa. Se ha demostrado en cultivos celulares de *N. tabacum* que las celulasas ocasionan una rápida acumulación de fitolaexinas, un incremento en la producción de capsidiol y debneiol, así como la producción de dos fitoalexinas que no se habían reportado (Threlfall and Whithead, 1988). El oomiceto patógeno *Phytophthora drechleri* secreta al menos tres isoformas de elicinas que inducen la necrosis en hojas de tabaco (Huet *et al.*, 1992).

Los inductores de origen proteico han sido usados para elucidar el papel de canales iónicos en membranas celulares de plantas, involucrados en la transducción de señales por estímulos externos. Las pectoliasas, enzimas que degradan la pared celular, son potentes inductores de la despolarización de la membrana en membranas

celulares de *N. tabacum* (Zimmermann *et al.*, 1998). Por su parte, la criptogenina secretada por *Phytophthora cryptogena* induce la despolarización de membranas. Ambas proteínas generan una despolarización en la membrana celular de plantas; sin embargo, el flujo de iones Cl⁻ es de diferente intensidad. Recientemente, la oligandrina se ha integrado a la familia de elicinas. Esta molécula es un péptido de bajo peso molecular secretado por el hongo *Pythium oligandrum* e induce resistencia sobre *Phytophthora parasitica* en plantas de jitomate (Picard *et al.*, 2000), pero no induce respuestas de hipersensibilidad. Las oligandrinas inducen una resistencia sistémica sobre *Fusarium* en plantas de jitomate (Behamou *et al.*, 2001). Se ha demostrado que inductores del tipo de glicoproteínas inducen la acumulación de fitoalexinas en cultivos celulares de plantas. Tal es el caso de una glicoproteína excretada por el hongo *Ceratosystis fimbriata*. Esta glicoproteína induce un incremento de cumarina en cultivo celulares de *Plantanus acerifolia* (Alami *et al.*, 1998).

Por su parte, en los primeros estudios realizados con inductores oligosacáridos, los implicaban en la sobreproducción de metabolitos secundarios en cultivos celulares de plantas. Albersheim y colaboradores (1977) fueron los primeros en aislar oligosacáridos que activaban una gran variedad de genes relacionados con la defensa en plantas. Por su parte, el grupo de Sharp y colaboradores (1984) se enfocó a investigar el papel de carbohidratos específicos en la producción de fitoalexinas en cultivos celulares de soya. De este estudio se identificaron ocho distintos oligosacáridos obtenidos a partir de la pared celular del micelio de *Phytophthora gasperma* y se demostraron pequeñas diferencias en la estructura y composición química de carbohidratos inductores y no inductores, lo cual sugirió una alta especificidad en el reconocimiento de la estructura de los carbohidratos por los receptores. Por otra parte, los oligogalacturónidos derivados de la pared celular de las plantas también han sido usados para inducir respuestas de defensa en plantas de tabaco. Los oligogalacturónidos inducen un incremento en el flujo de Ca²⁺, el cual es importante para regular los niveles de peróxido de hidrógeno (Angelova *et al.*, 2006).

El quitosano es un polímero principalmente acetilado con enlaces β-1-4 en los residuos de D-glucosamina. Este compuesto es un componente estructural de la pared celular de hongos patógenos. El efecto del quitosano en la permeabilidad de la membrana y en la producción de metabolitos secundarios ha sido investigado en *Nicotiana tabacum* y *Eschscholzia californica* (Brodelius *et al.*, 1989). Así mismo, se ha demostrado que el quitosano incrementa el rendimiento en la producción de cultivos, induce sistemas de defensa en plantas e incrementa la capacidad de las plantas a tolerar situaciones de estrés (Chang *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1999; Orozco-Cárdenas and Ryan, 1999; Roller and Covill, 1999).

Existen evidencias que sugieren que el reconocimiento de los inductores por parte de la planta es mediado por receptores celulares, los cuales pueden estar localizados ya sea en la superficie de la célula para algunos inductores de origen fúngico (Seigrist *et al.*, 1998), o dentro de la célula para ciertos inductores de origen bacteriano (Yang and Gabriel, 1995; Van den Ackerveken *et al.*, 1996; Ebel and Scheel, 1997). Al ser percibidos los inductores se inician los procesos de señalización que activan los sistemas de defensa.

La especificidad en la resistencia de las plantas contra los patógenos se da a nivel de cultivar o a nivel de especie, principalmente, debido al reconocimiento de inductores

no específicos o no de raza (inductores generales) (Seigrist *et al.*, 1998). Mientras que los inductores generales son capaces de desencadenar respuestas de defensa en plantas hospederas y no hospederas de patógenos, los inductores raza específicos inducen respuestas de defensa solamente en cultivares específicos (Montesano and Tapio, 2003). En la tabla 2.3 se presenta algunos inductores generales y específicos.

Inductor	Origen	Mecanismo de acción	Efectos
Chitin	Fungos	Activa la síntesis de quitina y otros polisacáridos	Induce la síntesis de quitina y otros polisacáridos
β-glucano	Fungos	Activa la síntesis de β-glucano y otros polisacáridos	Induce la síntesis de β-glucano y otros polisacáridos
Proteína de la pared celular	Fungos	Activa la síntesis de proteínas de la pared celular	Induce la síntesis de proteínas de la pared celular
Ácido salicílico	Planta	Activa la síntesis de ácido salicílico y otros compuestos fenólicos	Induce la síntesis de ácido salicílico y otros compuestos fenólicos
Chitosano	Fungos	Activa la síntesis de chitosano y otros polisacáridos	Induce la síntesis de chitosano y otros polisacáridos
β-1,3-glucano	Fungos	Activa la síntesis de β-1,3-glucano y otros polisacáridos	Induce la síntesis de β-1,3-glucano y otros polisacáridos
Proteína de la pared celular	Fungos	Activa la síntesis de proteínas de la pared celular	Induce la síntesis de proteínas de la pared celular
Ácido salicílico	Planta	Activa la síntesis de ácido salicílico y otros compuestos fenólicos	Induce la síntesis de ácido salicílico y otros compuestos fenólicos
Chitosano	Fungos	Activa la síntesis de chitosano y otros polisacáridos	Induce la síntesis de chitosano y otros polisacáridos
β-1,3-glucano	Fungos	Activa la síntesis de β-1,3-glucano y otros polisacáridos	Induce la síntesis de β-1,3-glucano y otros polisacáridos
Proteína de la pared celular	Fungos	Activa la síntesis de proteínas de la pared celular	Induce la síntesis de proteínas de la pared celular

Tabla 2.3 Clasificación de inductores de acuerdo a su naturaleza química.

Grupo	Inductor	Fuente	Tipo de inductor	Ejemplos de sus efectos en plantas
I	β -glucanos activos con un DP > 5, dependiendo del hospedero	<i>Phytophthora, Pythium</i>	General	Fitoalexina en arroz
	Quitina activos con un DP > 4-6 dependiendo del hospedero	Hongos	General	Fitoalexinas en arroz. Lignificación en hojas de trigo
I + II	Enzimas pectinolíticas, degradadoras de pared celular y liberación de inductores endógenos	Varios hongos y bacterias	General	Inhibidores de proteínas. Inducción de genes de defensa en <i>Arabidopsis</i> y en jitomate
II	Endoxilanasas	<i>Trichoderma</i>	Raza específico	HR y genes de defensa en tabaco
	Elicinas (10 kDa)	<i>Phytophthora pythium</i>	General	HR en tabaco
	PaNie 25 kDa	<i>Pythium aphanidermatum</i>	General	Muerte celular y formación de callosa en zanahoria y <i>Arabidopsis</i>
	Productos de genes avr	<i>Cladosporium fulvum</i> , así como de otros hongos y bacterias	Raza específico	HR en jitomate
	Proteínas virales	Virus del mosaico del tabaco	Raza específico	HR en jitomate, tabaco
	Harpina (33 kDa); flagelina	Bacterias gram negativas	General	Formación de callosa. ROS. Genes de defensa en <i>Arabidopsis</i>
	Proteínas o toxinas peptídicas	<i>Helminthosporium victoriae</i>	Raza específico	Muerte celular en avena

Continuación tabla 2.3

Grupo	Inductor	Fuente	Tipo de inductor	Ejemplos de sus efectos en plantas
III	Glicoproteínas	<i>Phytophthora sojae</i>	General	Fitoalexinas. Genes de defensa en perejil
	Fragmentos de glicopéptidos	Levaduras	General	Genes de defensa. Producción de etileno en jitomate
IV	Siringólidos	<i>Pseudomonas syringae</i> pv.	Raza específico	HR en plantas de soya conteniendo el gen de resistencia <i>Rpg 4</i>
	Factor Nod	<i>Rhizobium</i>	General	Formación del factor Nod en leguminosas
V	FACs (aminoácidos conjugados con ácidos grasos)	Lepidóptera	General	Defensa indirecta por la producción de monoterpenos en jitomate
	Ergosterol	Varios hongos	General	Alcalinización en cultivos celulares de jitomate
	Toxinas bacterianas	<i>Pseudomonas syringae</i>	General	Genes de defensa. Compuestos de defensa en <i>Arabidopsis</i> y <i>Brassica</i> sp.

DP = grado de polimerización; I = oligosacáridos; II = péptidos y proteínas; III = glicopéptidos y proteínas; IV = glicolipidos; V = inductores lipofílicos.

2.8 Tipos de interacciones durante la interacción planta-patógeno

2.8.1 Interacciones compatibles

Cuando un patógeno interactúa con un hospedero potencial y es capaz de colonizar al hospedero y causar enfermedad, se le denomina patógeno virulento, en este caso el hospedero es susceptible a la colonización y el tipo de interacción es denominada compatible. Durante este tipo de interacción las defensas naturales del hospedero no son suficientes para evitar la colonización del patógeno.

2.8.2 Interacciones no compatibles

Durante este tipo de interacción, el patógeno falla en colonizar al hospedero, lo cual se puede deber a varios factores como son: 1) la planta es incapaz de proveerle los requerimientos nutricionales; 2) la planta posee barreras estructurales o compuestos tóxicos que impiden la infección; 3) si el patógeno es reconocido como específico, se establecen diversos mecanismos de defensa y la invasión no se desarrolla (Heath, 2000). Este último punto se da cuando los correspondientes genes *R* y *avr* están

presentes tanto en el hospedero como en el patógeno. Este tipo de interacción ha sido referida como el modelo gen a gen (Flor, 1971).

2.8.3 El modelo gen a gen

Al establecerse las interacciones no compatibles, en donde el patógeno es reconocido por el hospedero, se pueden establecer interacciones específicas o no específicas. El reconocimiento de patógenos no específicos por el hospedero se lleva a cabo mediante la detección de moléculas presentes en el patógeno, como los PAMPS. En contraste, durante la interacción específica, el patógeno es reconocido por la planta de manera específica, como en el modelo de interacción gen-a-gen, propuesto por Flor (1947), el cual involucra el reconocimiento de patógenos invasores desencadenando respuestas de defensa. Tales interacciones incompatibles son dependientes de la presencia de genes de resistencia (*R*) en el hospedero y de genes de avirulencia (*avr*) en el patógeno (Flor, 1971; Keen, 1992; Staskawicz *et al.*, 1995). De forma general, puede decirse que las respuestas de defensa de las plantas se inician por el reconocimiento del patógeno, lo cual puede estar mediado por una interacción gen-a-gen entre un gen de resistencia y un gen de avirulencia. Existen situaciones en las que el gen *avr* o su complementario gen *R* no se expresan o sus productos no son funcionales, por lo que el reconocimiento por parte de la planta no se lleva a cabo. Esto lleva a que la interacción planta-patógeno se desarrolle como compatible, lo que resulta en la manifestación de la enfermedad en la planta.

Nuevas evidencias moleculares y bioquímicas demuestran que en una relación planta-patógeno compatible, las proteínas R-Avr no necesariamente interactúan de manera directa, sino que puede haber una interacción indirecta, por lo que se han propuesto varios modelos. Uno de estos modelos es el del co-receptor, en el cual la proteína Avr se une en primera instancia a un sitio de alta afinidad en el co-receptor, el cual a su vez interactúa con la proteína R lo que desencadena las respuestas de defensa (Ren and Morris 2000). En otro modelo conocido como el modelo del guardián, la proteína Avr interactúa con una proteína blanco relacionada con la patogénesis, que se encuentra unida a la proteína R (Van der Biezen and Jones, 1998; Grant, 1999; Dangl and Jones, 2001). Evidencias moleculares han demostrado que ciertos genes *Avr* de bacterias, de hongos y de virus codifican proteasas, y por otro lado, consistente con ello, se ha propuesto que el procesamiento proteolítico de ciertas proteínas en el hospedero desencadena las defensas de la planta (Ulla y Thomas 2002; Mestre *et al.*, 2000).

Se han identificado varios genes *R* de las plantas y sus correspondientes genes *avr* en organismos patógenos a partir de algunas interacciones planta-patógeno (Tabla 2.4). Con base en la estructura de los dominios presentes en las diferentes proteínas R, los genes *R* que han sido identificados se pueden agrupar en los siguientes 5 grupos:

- (i) Proteínas intracelulares con sitios de unión a nucleótidos (NBS) y con dominios ricos en leucina (LRR);
- (ii) Proteínas intracelulares NBS-LRR con una región similar al dominio del receptor citoplásmico de mamíferos IL-1 (IL-1R);
- (iii) Proteínas cinasas intracelulares (Pks);

- (iv) Proteínas con un dominio LRR y dominos extracelulares unidas a membrana;
 (v) Proteínas tipo receptor con actividad de cinasas de serina/treonina (RLKs) y con dominios extracelulares ricos en leucinas (LRR).

Tabla 2.4 Genes de resistencia identificados en diferentes plantas.

Clase	Gen R	Planta	Patógeno	Estructura
1	<i>RPS2</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i> pv. tomato	LZ-NBS-LRR
	<i>RPM1</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i> pv. Maculicola	LZ-NBS-LRR
	<i>Prf</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>P. syringae</i> pv. tomato	LZ-NBS-LRR
	<i>N</i>	<i>N. tabacum</i>	Virus del mosaico	TIR-NBS-LRR
	<i>L^s</i>	Lino	<i>Melampsora lini</i>	TIR-NBS-LRR
	<i>M</i>	Lino	<i>M. lini</i>	TIR-NBS-LRR
	<i>RPP5</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	TIR-NBS-LRR
	<i>I₂</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	NBS-LRR
	<i>Ve</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	LZ-LRR
	2	<i>Pto</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>P. syringae</i> pv. Jitomate
3	<i>Cf-9</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>	LRR-TM
	<i>Cf-2</i>	<i>L. esculentum</i>	<i>C. Fulvum</i>	LRR-TM
	<i>HS1^{pro}</i>	<i>S. officinarum</i>	<i>Heterodera schachtii</i>	LRR-TM
4	<i>Xa21</i>	<i>O. sativa</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv.	RLK-LRR
5	<i>Hm1</i>	<i>Z. mays</i>	<i>Cochliobolus carbonum</i>	Toxina reductasa

Existen algunos genes *R* dentro de la clase LRR que participan en varios procesos del desarrollo, tales como la percepción de fitohormonas y en las respuestas de defensa (Torii, 2000), además de participar en procesos de reconocimiento molecular, de adhesión y movimiento celular, de reparación del ADN y en el procesamiento del ARN (Kobe *et al.*, 1994). En esta clase se incluyen a los genes *Xa21* del arroz, que le confieren resistencia al ataque de la bacteria *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Song *et al.*, 1995), al gen *Cf* del jitomate que le confiere resistencia al ataque del hongo *Cladosporium fulvum* (Jones *et al.*, 1994), al gen *ERECTA* de *A. thaliana*, cuya mutación ocasiona deformación en órganos específicos (Torii, 1996), al gen *CLAVATA*, el cual controla el destino de células meristemáticas (Clark, 1997) y al gen *HAESA*, el cual juega un papel en la abscisión floral (Jinn, 2000). Se sugiere que las proteínas con regiones LRR en algunos casos están relacionados también con sitios de unión específicos para hormonas peptídicas en animales (Kobe *et al.*, 1994), con inductores patogénicos (Baker *et al.*, 1997) y con el desarrollo de señales en las plantas (Clark *et al.*, 1997). Aunque todos los ligandos conocidos para los LRR son péptidos pequeños o glucoproteínas, es posible que los LRR puedan también unirse a moléculas pequeñas como los brasinólidos (Hoffman *et al.*, 1991; Friedrichsen *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000)

En contraste con las proteínas R, la mayoría de las proteínas Avr muestran un pequeño o nulo nivel de identidad en sus secuencias (Nimchuck, 2001; Bonas, 2002). Sin embargo, en ocasiones presentan regiones conservadas, como son el caso de los sitios de miristoilación en varias secuencias Avr, los cuales se requieren para la localización y función de la proteína (Nimchuk *et al.*, 2000; Shan *et al.*, 2000).

Se ha evidenciado que las proteínas Avr juegan un papel importante en la virulencia del patógeno (Laugé and De Wit, 1998, Kjemtrup *et al.*, 2000; White *et al.*, 2000). Por ejemplo, la proteína AvrPto incrementa la capacidad de *P. syringae* pv. *tomato* de inducir necrosis en plantas de jitomate que carecen del gene R *Pto*, tal evento está correlacionado con un incremento en el crecimiento de la bacteria (Chang *et al.*, 2000).

2.9 Justificación

El cocotero (*Cocos nucifera* L.), una planta oleaginosa de distribución pantropical (Robles, 1983; Persley, 1992) representa una fuente económica para los pobladores de la zona intertropical húmeda, como se ha mencionado con anterioridad. Este cultivo se ha visto afectado por enfermedades ocasionadas por diferentes agentes como el del amarillamiento letal, el decaimiento de la raíz y la pudrición del cogollo, entre otros (Howard *et al.*, 1983). Entre las estrategias que se han implementado para repoblar las plantaciones afectadas se ha empleado el control genético, replantando con materiales resistentes las zonas afectadas (Zizumbo, 1998); sin embargo, en la actualidad esta estrategia no ha sido completamente eficiente. Una alternativa para hacer frente a los patógenos que afectan a este cultivo es generar conocimiento de los sistemas de defensa en este cultivo que se establecen durante la interacción del cocotero con sus patógenos asociados mediante el uso de moléculas inductoras, promotoras de los mecanismos de defensa asociados con la interacción planta-patógeno, que se han empleado en diversos sistemas biológicos con el fin de simular estos eventos. El uso de quitosano, una molécula inductora de los mecanismos de defensa en diversas especies vegetales, adicionada a callos de cocotero nos permitiría estudiar a nivel bioquímico y transcripcional las modificaciones en la expresión génica como resultado de la exposición a este inductor, permitiendo establecer un sistema para estudiar este tipo de interacción. La identificación de genes expresados específicamente por efectos del quitosano, así como la identificación bioquímica de moléculas asociadas a los mecanismos de defensa, nos permitirá deducir cuáles mecanismos de defensa, bioquímicos y moleculares, podrían estar llevándose a cabo tras la adición de una molécula señalizadora que puede ser agrupada dentro de los PAMP y que, por lo tanto, podría en principio encender sistemas de defensa no específicos de hospedero. El establecimiento de un sistema *in vitro* que permita la generación de conocimiento de estos eventos permitiría establecer en un futuro otras alternativas de control.

2.10 Hipótesis

Se ha demostrado que la adición de quitosano en diversas especies vegetales induce modificaciones, tanto en el nivel transcripcional como traduccional, de moléculas relacionadas con los sistemas de defensa, por lo que la adición de quitosano a callos de *Cocos nucifera* L. será capaz de modificar la expresión de genes involucrados en las respuestas de defensa contra patógenos en esta especie vegetal.

2.11 Objetivo general

Identificar y caracterizar genes de *Cocos nucifera* L. para los que la abundancia de sus transcritos se modifica durante la inducción artificial de las respuestas de defensa contra patógenos.

2.12 Objetivos particulares

1. Determinar el tiempo de incubación y la concentración de quitosano, suficientes para producir una respuesta de defensa en callos de *Cocos nucifera* L.
2. Identificar y caracterizar la expresión de genes expresados bajo las condiciones experimentales determinadas en el punto 1.
3. Evaluar el efecto del ácido salicílico y del jasmonato de metilo en la inducción de los genes de interés.

2.13 BIBLIOGRAFÍA.

- Agrios GN** (2005) Plant Pathology 5 th ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Alami I, Maris S and Clerivet A** (1998) A glycoprotein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. platani triggers phytoalexin synthesis in *Platanus × acerifolia* cell-suspension cultures. *Phytochem* **48**: 771-776.
- Albersheim P, Ayers AR, Valent BS, Ebel J, Hahn M, Wolpert J and Carlson R** (1977) *Supramol. Struct.* **6**: 599-616.
- Alvarez ME, Pennel RI, Meijer P-J, Ishikawa A, Dixon RA and Lamb C** (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell.* **92**: 773-784.
- Anderson AJ** (1989) Plant-microbe interactions. Molecular and genetic perspectives, (T. Kosuge, E. Nester, Eds.), McGraw Hill, New York, 87-130.
- Angelova Z, Georgiev S, and Roos W** (2006) Elicitation of Plants. *Biotechnology and biotechnological equipment.* **20**: 72-83.
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willman MR, Chiu W-L, Gómez-Gómez L, Boller T, Ausubel FM and Sheen J** (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature.* **415**: 977-983.
- Ashburner GR, Cordoba II, Oropeza CM, Illingworth R and Harrison NA** (1996) First report of coconut lethal yellowing disease in Honduras. *Plant Dis.* **80**:960.
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B and Kumar-Dinesh SP** (1997) Signaling in Plant-microbe interactions. *Science.* **276**: 726-733.
- Benhamou N, Belanger RR, Rey P and Tirilly Y** (2001) Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 681-696.
- Benhamou N and Nicole M** (1999) Cell biology of plant immunization against microbial infection: the potential of induced resistance in controlling plant diseases. *Plant Physiol. Biochem.* **37**: 703-719.
- Bent AF, Inners RW, Ecker JR, and Staskawicz BJ** (1992) Disease development in ethylene insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol Plant Microbe Interact.* **5**: 372-378.
- Bleecker AB and Kende H** (2000) Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 1-18.
- Bocardo G, Beaver RG, Randles JW and Imperial JS** (1981). Tinangaja and bristle top, coconut diseases of uncertain etiology in Guam, and their relationships to cadang-cadang disease of coconut in the Philippines. *Phytopathol.* **71**: 1104-1107.

- Bonas U and Lahaye T** (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr. Op. Microbiol.* **5**: 44-50.
- Bowles D** (1998) Signal transduction in the wound response of tomato plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **353**: 1495-1510.
- Brodelius P., Funk C., Haner A and Villegas M.** (1989) A procedure for the determination of optimal chitosan concentrations for elicitation of cultured plant cells. *Phytochemistry.* **28**: 2651-2654.
- Brogie, K, Chet, I, Holliday, M, Cressman, R, Biddle, P and Knowlton, S.** (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science.* **254**: 1194-1197.
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS and Dong X** (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducer of systemic acquired resistance. *Plant Cell.* **6**: 1583-1592.
- Carlson P** (2007) Culture, Food and agriculture. www.msr.umn.edu/.../chollett/anth%203204/Student%20Research%20Projects/Paul's%20revisado en el 2008.
- Castro MS and Fontes W** (2005) Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Pep Lett.* **12**: 13-18.
- Chang JH, Rathjen JP, Bernal AJ, Staskawicz BJ and Michelmore RW** (2000) *avrPto* enhances growth and necrosis caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato lines lacking either *Pto* or *Prf*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 568-571.
- Chang MM, Hadwiger LA and Horovitz D** (1992) Molecular characterization of a pea beta-1, 3-glucanase induced by *Fusarium solani* and chitosan challenge. *Plant. Mol. Biol.* **20**: 609-18.
- Chisholm S, Coaker G, Day B and Staskawicz B** (2006) Host-Microbe Interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell.* **124**: 803-814.
- Clark SE, Williams RW and Meyerowitz EM** (1997) The CLAVATA 1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell.* **89**: 575-585.
- Cohen Y, Gisi U and Niderman T** (1993) Local and systemic protection against *Phytophthora infestans* induced in potato and tomato plants by jasmonic acid and jasmonic methyl ester. *Phytopathol.* **83**: 1054-1062.
- Coquoz J-L, Buchala A and Métraux J-P** (1998) The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. *Plant Physiol.* **117**: 1095-1101.
- Corner EJH** (1996) The natural history of palms. Berkeley, CA: University of California Press. pp 393.
- Creelman RA and Mullet JE** (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 355-381.

- Creelman RA and Mullet JE** (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 4114-4119.
- Crute IR and Pink DAC**(1996) Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. *Plant cell.* **8**: 1747-1755.
- da Cunha L, McFall AJ and Mackey D** (2006) Innate immunity in plants: A continuum of layered defenses. *Microbes Infect.* **8**: 1372-1381.
- Dangl JL and Jones JD** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* **411**: 826-833.
- Deikman J** (1997) Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene expression. *Physiol. Plant.* **100**: 561-566.
- Deprés C, DeLong C, Glaze S, Liu E and Fobert PR** (2000) The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell.* **12**: 279-290.
- Dixon RA and Paiva NL** (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* **7**: 1085-1097.
- Dixon RA, Dey PM and Lam CJ** (1994) Phytoalexins; enzymology and molecular biology. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **55**: 1-135.
- Domínguez S** (1998) Logros de investigación del cocotero en México. *1ra. Reunión Nacional de Palma de cocotero.* Acapulco, Guerrero, México, pp 35-45.
- Droog F, Spek A, van der Kooy A, de Ruyter A, Hoge H, Libbenga K, Hooykaas P and van der Zaal B** (1995) Promoter analysis of the auxin-regulated tobacco glutathione s-transferase genes *Nt103-1* and *Nt103-35*. *Plant. Mol. Biol.* **29**: 413-429.
- Dwyer SC, Legendre L, Heinstejn PH, Low PS and Leto TL** (1996) Plant and human neutrophil oxidative Burst complexes contain immunologically related proteins. *Biochim Biophys Acta.* **1289**: 231-237.
- Ebel J and Scheel D** (1997) In: *Plant relationships ,The Mycota V, part A.* (G.C. Caroll, P. Tudzynski,.), Springer Berlin Heidelberg, 85-105.
- Ebel J and Cosio EG** (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* **148**:1-36.
- Enyedi AJ, Yalpani N, Silverman P and Raskin I.** (1992) Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell.* **70**: 879-886.
- Elliott M L** (2004) Bacterial bud rot. Pages 7-8 in: *Compendium of Ornamental Palm Diseases and Disorders.* M. L. Elliott, T. K. Broschat, J. Y. Uchida, and G. W. Simone, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

- Fan W and Dong X** (2002) *In vivo* interaction between NPR1 and transcription factor TAcgi-b2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **14**: 1377-1389.
- FAOSTAT AGRICULTURE DATA** (1999) <http://apps.fao.org/bin/nph-dp.pl?subset=agriculture>.
- Farmer EE and Ryan CA** (1992) Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**: 129-134.
- Farmer EE, Johnson RR and Ryan CA** (1992) Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **98**: 995-1002.
- Felix G, Duran JD, Volko S and Boller T** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant Journal.* **18**: 265-276.
- Feys BJ and Parker JE** (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends genetics.* **16**: 449-455.
- Flor H** (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 275-296.
- Foyer CH, Lelandais M and Kunert KJ** (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* **92**: 696-717.
- Friedrichsen DM, Joazeiro CA, Li J, Hunter T and Chory J** (2000) Brassinosteroid-insensitive-1 is a ubiquitously expressed leucina-rich repeat receptor Serine/Threonine kinase. *Plant Physiol.* **123**: 1247-1256.
- Fritig B, Heitz T and Legrand M** (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* **10**: 16-22.
- García M C** (1981) Lista de insectos y ácaros perjudiciales a los cultivos en México. *Fitófilo.* **86**: 7-196.
- Glazebrook J** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 205-227.
- Gómez-Gómez L** (2004) Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Mol. Immunol.* **41**: 1055-1062.
- Gómez-Gómez L, Bauer Z and Boller T** (2001) Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **13**: 1155-1163.
- Gómez-Gómez L and Boller T** (2000) FLS2: A LRR receptor-like kinase involved in recognition of the flagellin elicitor in *Arabidopsis*. *Mol. Cell.* **5**: 1003-1011.
- Gómez-Gómez L, Felix G and Boller T** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal.* **18**: 277-284.

- Grant JJ and Loake GJ** (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol.* **124**: 21-29.
- Grant M and Mansfield J** (1999) Early events in host-pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2**: 312-319.
- Griffith R** (1980) The transmission of micro-organisms associated with Cedros wilt disease of coconut. *Jour Agricult Soc Trinidad and Tobago.* **80**: 303-310.
- Guang-Yi W, T J Michailides, BD Hammock, Young-Moo L and R M Bostock** (2000) Affinity Purification and Characterization of a Cutinase from the Fungal Plant Pathogen *Monilinia fructicola* (Wint.) Money. *Arch. Biochem. Biophys.* **382** (1): 31-38.
- Guttman D** (2004) Plants as models for the study of human pathogenesis. *Biotechnol Adva.* **22**: 363-382.
- Haas A and Wilson L** (1985) Coconut wood. Processing and use. *FAO For. Pap.* 57. Rome: food and agriculture organization of the United nations. 58p.
- Hahlbrock K and Scheel D** (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 347-369.
- Hahn M G** (1996) Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**: 387-412.
- Hammond-Kosack K E and Jones JDG** (2000) In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. (B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones, Eds,) ,ASPP Press, Rockville, MD. 1102-1156.
- Hammond-Kosack KE and Jones JDG** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant cell.* **8**: 1773-1791.
- Harries H** (1978) The evolution, dissemination and classification of *Cocos nucifera* L. *Bot. Rev.* **44**: 265-320.
- He Z, Wang Z, Y Li, J Zhu, Q Lamb, C, Ronald P and Chory J** (2000) Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science.* **288**: 2360-2363.
- Heath IB and Geitmann A** (2000) Cell biology of plant and fungal tip growth- getting to the point. *Plant Cell.* **12**: 1513-1517.
- Heath MC** (2000) Non host resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **3**: 315-319.
- Heck S, Grau T, Buchala A, Metraux JP and Nawrath C** (2003) Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the Arabidopsis- *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* interaction. *Plant J.* **36**: 342-52.

- Hoffman T, Schmidt JS, Zheng X and Bent AF** (1999) Isolation of ethylene-insensitive soybean mutants that are altered in pathogen susceptibility and gene-for-gene disease resistance *Plant Physiol.* **119**: 935-950.
- Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Colney LH, Brooks BA and Hankinson O** (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science.* **252**: 954-958.
- Horvath D, Huang D and Chua N-H** (1998) Four classes of salicylic late-induced tobacco genes. *Mol. Plant-Microbe interact.* **11**: 895-905.
- Horvath D and Chua N-H** (1996) Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant. Mol. Biol.* **31**: 1061-1072.
- Howard F, Norris R and Thomas D** (1983) Evidence of transmission of palms lethal yellowing agent by plant hopper *Myndus crudus* (Homoptera:cixidae). *Trop. Agric.* **60**: 168-171.
- Huet JC, Nespoulous C and Permollet JC** (1992) Structures of elicitin isoforms secreted by *Phytophthora drechsleri*. *Phytochem.* **31**: 1471-1476.
- Jinn T, Stone J and Walker J** (2000) HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev.* **11**: 108-117.
- Johnson C, Boden E, Desai M, Pascuzzi and Arias J** (2001) In vivo target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *Plant J.* **28**: 237-243.
- Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti Pj and Jones JDG** (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science.* **266**: 789-793.
- Keen NT** (1992) Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* **24**: 447-463.
- Keen NT** (1975) Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens? *Science.* **187**: 7-12.
- 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.
- Kjemtrup S, Nimchuk Z and Dangl JL** (2000) Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Curr. Opin. microbial.* **3**: 73-78.
- Kniskern J and Rausher M** (2001) Two modes of host-enemy coevolution.. *Pop Ecol.* **43**: 3-14.
- Knoester M, Pieterse JF, Bol and LC van Loon** (1999). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol. Plant-Microb. Interact.* **12**: 720-727.

- Kobe B and Deisenhofer J** (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 415-421.
- Kombrink E and Schmelzer E** (2001) The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**: 69-78.
- Krawczyk S, Thurow C, Niggeweg R and Gatz C** (2002) Analysis of the spacing between the two palindromes of *activation sequence-1* with respect to binding to different TGA factor and transcriptional activation potential. *Nucleic Acids Res.* **30**: 775-781.
- Kritzman G, Chet I and Gilan D** (1981) Spore germination and penetration of *Botrytis allii* into *Allium cepa* host. *Bot. Gaz.* **142**: 151-55.
- Kúc J** (2001) Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**: 7-12.
- Kunoh H** (1984) Cytological aspects of penetration of plant epidermis by fungi. In *Infection Processes of Fungi, Conference Report*, ed. D. W. Roberts, J. R. Aist, pp. 137-146. New York: Rockefeller Found.
- Lamb C and Dixon RA** (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 251-275.
- Lamb E and Lamb YKP** (1995) Binding site requirements and differential representation of TGA factor in nuclear ASF-1 activity. *Nucleic Acid Res.* **23**: 3778-3785.
- Laugué R and De Wit P JGM** (1998) Fungal avirulence genes: structure and possible functions. *Fungal Genet. Biol.* **24**: 285-297.
- Lee H-I, León J and Raskin I** (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**: 4076-4079.
- Lee S, Choi H, Suh S, Doo I S, Oh K Y, Choi EJ, Taylor TS, Low PS and Lee Y** (1999) Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol.* **21**: 147-52.
- Lewis NG and Yamamoto E** (1990) Lignin: occurrence, biogenesis, and degradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: 455-469.
- Low PS and Merida JR** (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol. Plant.* **96**: 533-542.
- Ludwig AA, Saitoh H, Felix G, Freymark G, Miersch O, Wasternack C, Boller T, Jones JD and Romeis T** (2005). Ethylene-mediated cross-talk between calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **102**: 10736-10741.
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF and Raskin I** (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to tobacco mosaic virus. *Science.* **250**: 1002-1004.

- Maleck K, A Levine T, Eulgem A, Morgan J, Schmid KA, Law ton, JL Dangl, and RA Dietrich** (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* **26**: 403–410.
- Mauch-Mani, B and Slusarenko AJ** (1996) Production of salicylic acid precursors is a major function phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell.* **8**: 203-212.
- McCoy RE** (1983). Lethal yellowing of palms. University of Florida Agricultural Experiment stations Bulletin, No.834.
- McDowell JM and Dangl JL** (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends. Biochem. Sci.* **25**: 79–82.
- Mehdy MC** (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* **105**: 467-472.
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K and He SY** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell.* **126**: 969–80.
- Mestre P, Brigneti G and Baulcombe D** (2000) An Ry-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the Nla proteinase from potato virus Y. *Plant J.* **23**: 653-661.
- Métraux J-P, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W and Inverardi B** (1990) Increase in salicylic acid at the on set of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006.
- Mölders W, Buchala A and Métraux J-P** (1996) Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus-infected cucumber plants. *Plant Physiol.* **112**: 787-792.
- Montesano M, Brander G and Tapio Palva E** (2003) Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol. Plant Pathol.* **4**(1): 73-79.
- Morrissey JP and Osbourn AE** (1999) Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* **63**: 708-724.
- Mosterio P** (1978) Utilization of coconut palm timber: its economic significance in some countries in the tropics. *Forpride digest.* **7**(1): 44-57.
- Muller E, Gargani D, Val R, Schaeffer Stevens J, Fernandez-Becerra C, Sanchez-Moreno M and Dollet M** (1994) Variability in the phloem restricted plant trypanosomes (*Phytomonas spp*) associated with wilts of cultivated crops Isoenzyme comparison with the lower trypanosomatids. *Eur.Jour.Plant. Phat.* **100**: 425-434.
- Nimchuk Z, Rohmer L, Chang JH and Dangl JL** (2001) Knowing the dancer from the dance: R-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **4**: 288-294.
- Nimchuk Z, Marois E, Kjemtrup S, Leister RT, Katagiri F and Dangl JL** (2000) Eukaryotic fatty Acylation drives plasma membrane targeting and enhances

- function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell*. **101**: 353-363.
- Noriega C D H, Becerra L Fand Hernandez R** (1992) Estudio preliminar de enfermedades del cocotero en la costa de Guerrero, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* **9**: 84-93.
- Norman-Setterblad C, Vidal S and Palva ET** (2000) Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **13**: 430-438.
- Nurnberger T, Brunner F, Kemmerling B and Piater L** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev.* **198**: 249-66.
- Nuernberger T** (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. Mol. Life. Sci.* **55**: 167-182.
- Nurnberger T, Wirtz W, Nennstiel D and Hahlbrock K** (1997) Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense. *Jour. Recep. Signa. Transd. Res.* **17**: 127-136.
- Nürnberg T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K and Scheel D** (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide inducer to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell.* **78**: 449-460.
- O'Donnell PJ, Calvert C, Atzorn R, Wasternack C, Leyser HMO and Bowles DJ** (1996) Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science.* **274**: 1914-1917.
- Oh HS and Collmer A** (2005) Basal resistance against bacteria in *Nicotiana benthamiana* leaves is accompanied by reduced vascular staining and suppressed by multiple *Pseudomonas syringae* type III secretion system effector proteins. *Plant J.* **44**: 348-359.
- Opeke K** (1982) Tropical tree crops. Chichester, UK. John Wiley and Sons. P 312.
- Orozco-Cardenas M and Ryan CA** (1999) Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 6533-57.
- Osborn AE** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell.* **8**: 1821-1831.
- Osorio G A** (1984) identificación de fitopatógenos asociados a la marchitez del coco (*cocos nucifera* L.) en Centla, Tabasco. Tesis Profesional. CSAT.H.Cárdenas, Tabasco. 63p.
- Parker JE** (2003) Plant recognition of microbial patterns. *Trends. Plant. Sci.* **8**: 245-247.
- Parker JE and Coleman MJ** (1997) Molecular intimacy between proteins specifying plant pathogen recognition. *Trends Biochem Sci.* **22**: 291-296.

- Peck S C** (2003) Early phosphorylation events in biotic stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 334-338.
- Persey G** (1992) Replanting the tree of life. Towards an international agenda for coconut palm research. A.C.I.A.R. Redwood Press Australia.
- Picard K, Ponchet M, Blein JP, Rey P, Trilly Y and Benhamou N** (2000) Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiol.* **124**: 379-395.
- Pontier D, Miao Z-H and Lam E** (2001) Transdominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *Plant. J.* **27**: 529-38.
- Polle A** (1997) Defense against photooxidative damage in plants. In *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Ed. By Scandalios JG, Cold Spring Harbor Laboratory Press pp 623-666.
- Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP and Starkov AA** (1997) Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS Lett.* **415**: 87-90.
- Qin XF, Holuigue L, Hrvath DM and Chua N-H** (1994) Immediate early transcription activation by salicylic acid via the cauliflower mosaic virus *as-1* element. *Plant Cell.* **6**: 863-874.
- Quillec G, Renard J L and Ghesquiere H** (1984) Le *Phytophthora heveae* du cocotier son role dans le pourriture du coeur et dans le chute des noix. *Oleagineux.* **39** (10): 477-482.
- Radman R, Saez T, Bucke C and Keshavarz T** (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**: 91-102.
- Randles JW, Hodgson RAJ and Wefels E** (1996) The rapid and sensitive detection of plant pathogens by molecular methods. *Australasian Plant Pathol.* **25**: 71-85.
- Randles JW and Hanold D** (1989) Coconut foliar decay virus particles are 20-nm icosahedra. *Intervirology.* **30**: 177-180.
- Raskin I** (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **43**: 439-463.
- Reinbothe S, Mollenhauer B and Reinbothe C** (1994) JIPs and RIPs: the regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell.* **6**: 1197-1209.
- Ren T, Qu F and Morris TJ** (2000) *HRT* gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell.* **12**: 1917-1926.
- Robles SR** (1983) Producción de oleaginosas y textiles, el cultivo del cocotero (*Cocos nucifera* L.) Cap. 8. Ed. LIMUSA, México pp. 393-416.

- Rodriguez R A** (1982) La Mancha Acuosa del coco. *Revista ASBANA*. **17**: 16-19.
- Roller S and Covill N** (1999) The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int J Food Microbiol.* **47**: 67-77.
- Rushton PJ and Somssich IE** (1998) Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Op. Plant. Biol.* **1**: 311-5.
- Schenk PM, Kazan I, Wilson, JP Anderson, T Richmond, SC Somerville and JM Manners** (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 11655-11660.
- Seigrist J, Muhlenbeck S and Buchenauer H** (1998) Cultured parsley cells, a model system for the rapid testing of abiotic and natural substances as inducers of systemic acquired resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **53**: 223-238.
- Sembdner G and Parthier B** (1993) The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 569-589.
- Shan L, Thara VK, Martin GB, Zhou J-M and Tang X** (2000) The *Pseudomonas* AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *Plant Cell.* **12**: 2323-2337.
- Sharp JK, McNeil M and Albersheim P** (1984) The primary structures of one elicitor-active and seven elicitor- inactive hexa(beta-D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea*. *J. Biol. Chem.* **259**: 11321-11336.
- Shulaev V, Silverman P and Raskin I** (1997) Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature.* **385**: 718-721.
- Skulachev VP** (1996) Role Of Uncoupled And Non-Coupled Oxidations In Maintenance Of Safely Low Levels Of Oxygen And Its One-Electron Reductants *Quart. Rev. Biophys.* **29**: 169-202.
- Shulaev V, León J and Raskin I** (1995) Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Cell.* **7**: 1691-1701.
- Silverman P, Seskar M, Kanter D, Schweizer P, Métraux J-P and Raskin I** (1995) Salicylic acid in rice. *Plant Physiol.* **108**: 633-639.
- Smith KD and Ozinsky A** (2002) Toll-like receptor-5 and the innate immune response to bacterial flagellin. *Curre. Top. Microbiol. Immunol.* **270**: 93-108.
- Smith CJ** (1996) Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytol.* **132**: 1-45.
- Song WY, Wang GL, Chenn LL, Kim HS Pi, LY Holsten, T Wang, B Zhai, WX, Zhu H, Fauquet C and Ronald P** (1995) A receptor kinase-like protein encoded by rice disease resistance gene Xa21. *Science.* **270**: 1804-1806.

- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG and Jones JDG** (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*. **268**: 661-667.
- Sticher L, Mauch-Mani B and J-P Me´traux** (1997) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**: 235–270.
- Strompen G, Grüner R and Pfitzner UM** (1998) An *as-1*-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis related protein 1A from tobacco. *Plant. Mol. Biol.* **37**: 871-883.
- Subileau C, Renard JL and Lacoste L** (1990) Complexe parasitaire implique dans l'extension récente des maladies foliaires des cocotiers sur une plantation en Amazonie brésilienne. 2nd Congress of the Societe francaise de Phytopathologie, Montpellier.
- Subramaniam R, Desveaux D, Spickler C, Michnick SW and Brisson N** (2001) Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nature Biotech.* **19**: 769-772.
- Torri KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura T, Yokoyama R, Whittier RF and Komeda Y** (1996) The *Arabidopsis ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant cell.* **8**: 735-746.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA and Broekaert WF** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 15107–15111.
- Threlfall DR, Whithead IM** (1988) Co-ordinated inhibition of squalene synthetase and induction of enzymes of sesquiterpenoid phytoalexin biosynthesis in cultures of *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry.* **27**: 2567-2580.
- Ton J, Davison S, Van Wees SC, Van Loon L and Pieterse CM** (2001) The *Arabidopsis isr1* locus controlling rhizobacteria mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol.* **125**: 652–661.
- Torii KU** (2000) Receptor Kinase activation and signal transduction in plants: an emerging picture. *Curre. Opin. Plant. Biol.* **3**: 361-367.
- Torri KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura T, Yokoyama R, Whittier RF and Komeda Y** (1996) The *Arabidopsis ERECTA* gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant cell.* **8**: 735-746.
- Toth IK, Bell KS, Holeva MC and Birch PRJ** (2003) Soft rot Erwiniae: from genes to genomes. *Mol. Plant. Pathol.* **4**: 17–30.
- Thordal-Christensen H** (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **6**: 351-357.

- Thomma BP, Eggermont K, Tierens KF and Broekaert WF** (1999) Requirement of functional ethylene insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **121**: 1093–1102.
- Uknes S, Dincher S, Friedrich L, Negrotto D, Williams S, Thompson Taylor H, Potter S, Ward E and Ryals J** (1993) Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant cell.* **5**: 159-169.
- Ulla Bonas and Thomas Lahaye** (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 44–50.
- Underwood W, Melotto M and Yang He** (2007) Role of plant stomata in bacterial invasion. *Cell. Microbiol.* **9**(7): 1621–1629.
- Valueva TA and Mosolov VV** (2004) Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry.* **69**: 1305-1309.
- Van den Ackerveken G, Marois E and Bonas U** (1996) Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell.* **87**: 1307-1316.
- Van Etten HD, Mansfield JW, Bailey JA and Farmer EE** (1994) Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoanticipins. *Plant Cell.* **6**: 1191-1192.
- Vanlerberghe GC and McIntosh L** (1992) Coordinate regulation of cytochrome and alternative pathway respiration in tobacco. *Plant. Physiol.* **100**: 1846–1851.
- van Loon, M Rep and Pieterse CMJ** (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**: 135–62.
- Van Loon, PAHM Bakker and CMJ Pieterse** (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 453-483.
- Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T and Conejero V** (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**: 245-264.
- Van Wees SCM, De Swart EAM, Van Pelt JA, Van Loon LC and Pieterse CMJ** (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 8711–16.
- Van der Biezen EA and Jones JDG** (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci.* **23**: 454-456.
- Walbot V, Hoisington DA and Neuffer MG** (1983) Disease lesion mimics in maize. In *Genetic Engineering of Plant*, Vol 3, T. Kosuge, C. Meredith, and A. Hollaender, eds (New York: Plenum Publishing), pp. 431-442.
- Walling LL** (2000) The myriad plant responses to herbivores. *Jour Plant Growth Regul.* **19**: 195-216.

- Wagner AM** (1995) A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett.* **368**: 339–342.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Métraux JP and Ryals JA** (1991) Coordinated gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell.* **3**: 1085-1094.
- Wasternack C and Parthier B** (1997) Jasmonate-signal plant gene expression. *Trends Plant Sci.* **2**: 302-307.
- Weston W H** (1918) Report on the plant disease situation in Guam. pp. 45–62. *In* Guam Agricultural Experiment Station Report for 1917. Guam Agricultural Experiment Station.
- White FF, Yang B and Johnson LB** (2000) Prospects for understanding avirulence gene function. *Curr. Op. Plant Biol.* **3**: 291-298.
- White RF** (1979) Acetyl salicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology.* **99**: 410-412.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G and Ausubel FM** (2001) Ischorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature.* **414**: 562-565.
- Wojtaszek P** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J.* **322**: 681-692.
- Xiang C, Miao Z H and Lam E** (1996) Coordinated activation of *as-1* type elements and tobacco glutathione S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Mol. Biol.* **32**: 415-426.
- Xiang C, Miao Z and Lam E** (1997) DNA binding properties, genomic organization and expression pattern of *TGA6*, a new member of the *TGA* family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant. Mol. Biol.* **34**: 403–15.
- Yalpani N, Silverman P, Wilson TMA, Kleier DA and Raskin I** (1991) Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco. *Plant Cell.* **3**: 809-818.
- Yan Z, MS Reddy, C-M. Yu, JA McInroy, M Wilson and JW Kloepper** (2000) Induced systemic protection against tomato late blight by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathol.* **92**: 1329–1333.
- Yang Y and Gabriel DW** (1995) *Xanthomonas* avirulence/pathogenicity gene family encodes functional plant nuclear targeting signals *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **8**: 627-631.
- Zimmermann S, Frachisse J-M, Thomine S, Barbier-Brygoo H And Guem J** (1998) Effects of potential signal transduction antagonists on phytoalexin accumulation in tobacco. *Plant. Physiol. Biochem.* **36**: 665-674.

Zelazny B, Randles JW, Boccoardo G and Imperial JS (1982) The viroid nature of the cadang-cadang disease of coconut palm. *Scientia Filipinas*. **2**: 45-63.

Zizumbo D, Hernandez F And Harries HC (1993) Coconut varieties in México. *Economic Botany*. **47**: 65-78.

CAPÍTULO III. RESULTADOS

Chitosan activates molecules related to pathogenesis and modify the abundance of defense-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L.

Gabriel Lizama-Uc, Iván A. Estrada-Mota, María Goretty Caamal-Chan, Ramón Souza-Perera, Carlos Oropeza-Salín, Ignacio Islas-Flores, José Juan Zúñiga-Aguilar.

Parte de la información del capítulo III se incorporó como parte del artículo "Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L." el cual ha sido aceptado para su publicación en la revista "Physiological and Molecular Plant Pathology".

Abstract

As the study of coconut defense responses against pathogenic microorganisms is hampered by the absence of suitable model systems, we investigated if imbibition of coconut calli with chitosan could be used *in vitro* to simulate the molecular interactions that occur with pathogens. Our results showed that calli imbibition with 10 mg·mL⁻¹ chitosan caused the accumulation of hydrogen peroxide, and stimulated a β -1,3-glucanase activity with an Rf near 0.1. Chitosan addition also differentially modified the expression of some genes, whose DNA sequence showed high similarities to receptor-like kinases (RLKs), *Verticillium*-like protein, and mitochondrial alternate oxidase 1b. Addition of salicylic acid to the calli also modified transcript abundance for these genes, while methyl jasmonate did not seem to influence their expression, implying that they could be involved in defense responses. These results strongly suggest that elicitation of coconut tissues cultivated *in vitro* constitutes a suitable alternative to characterize both biochemical and molecular interactions that occur between the coconut palm and its associated pathogens.

Keywords: *Cocos nucifera* L., differential display, chitosan, plant-pathogen interaction.

Abbreviations: AOX, mitochondrial alternative oxidase; SA, salicylic acid; MeJA, methyl jasmonate; NO, nitric oxide; ROS, reactive oxygen species; AC, activated charcoal; TTC, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride; dp, degree of polymerization; SN, supernatant; RT, room temperature.

3.1. Introduction

Coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is an ecologically and economically important species in the tropics. Unfortunately, this palm is subject to attack by several disease producing agents, including viruses (Rohde *et al.*, 1990), viroids (Hanold and Randles 1991), mollicutes (Howard and Barrant, 1989), protozoa (Parthasarathy *et al.*, 1978), fungi (Joseph *et al.*, 1975), and nematodes (Griffith, 1987). Some diseases become epidemic, e.g., in the recent years, the "Atlantic Tall" variety has been almost totally eliminated from the coasts of the Yucatan Peninsula and its abundance diminished along the Gulf of Mexico because of the Lethal Yellowing (LY) disease (Oropeza *et al.*, 1997). Even though there are many epidemiological studies for this and other coconut

diseases, the basic physiology of coconut-pathogen interaction is poorly understood. In addition, there are no data regarding the coconut's biochemical resistance/susceptibility to pathogens, nor have the genes involved in the establishment of disease resistance been identified. Some factors that traditionally restrict these analyses include the coconut's long life cycle, the large size of the whole palm, and the lack of an efficient *in vitro* propagation system. *In vitro* plant tissue cultures have shown its feasibility as alternative models to the study of intact plants, as they maintain the basic physiology to respond to the addition of both elicitors (Desikan *et al.*, 1998) and signaling intermediates (Felix and Boller, 1995) that induce the expression of genes involved in the defense against plant pathogens. In this way, *in vitro* elicitation of defense responses using general elicitors have been successfully applied to several plant species including *Oryza sativa* (Kuta and Gaivaronskaya, 2004), *Hordeum vulgare* (Maksimov *et al.*, 2004), *Lycopersicon peruvianum* (Stratmann *et al.*, 2000), *Pinus sylvestris* (Shein *et al.*, 2003), etc., and could be attempted in coconut. Unfortunately, working with *in vitro* tissue cultures of coconut and other palms has proven to be extremely difficult, to our knowledge only cell suspension cultures from other palms like *Elaeis guineensis* Jacq. (Teixeira *et al.*, 1995) and *Phoenix dactylifera* L. have been established (Fki *et al.*, 2003).

In spite of this, protocols for coconut regeneration from *in vitro* embryogenic calli have been optimized recently with the use of activated charcoal (Chan *et al.*, 1998; Verdeil *et al.*, 2001). Thus, *in vitro* coconut calli culture has emerged as a potential model to gain insights into the coconut-pathogen interactions. As the use of *in vitro* tissue cultures is a reasonable way to work aseptically with susceptible or endangered plant species, the main goal of this study was to evaluate whether elicitation of coconut calli could be a suitable alternative to study plant defense mechanisms, including the activation of signaling cascades and the induction of defense related genes.

3.2. Materials and methods

3.2.1 Plant materials and treatments

Calli from *Cocos nucifera* L., var. "Atlantic Tall" were cultured *in vitro* according to Chan *et al.* (1998). Three-month-old calli were used in all experiment treatments, which were repeated at least three times with three replications each. To determine the optimal chitosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) concentration for elicitation, calli were vacuum infiltrated (650 mm Hg, negative pressure) for 20 min with different concentrations of chitosan (0, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mg mL⁻¹), then total proteins were extracted at different periods (0, 4, 12, 16 and 24 h after treatment) and activity of β -1,3-glucanases was evaluated as described below. To evaluate the effects of elicitation on gene expression, calli were exposed for 20 min to different concentrations of either chitosan (10.0 mg·mL⁻¹), salicylic acid (SA)(0, 5, 50, and 500 mM) or methyl jasmonate (MeJA)(0, 50, and 500 μ M). After these periods, calli were rinsed with control buffers and incubated further for 2 and 4 h at room temperature (RT), and then total RNA was extracted, pooled and analyzed by reverse northern blotting as described below. For corroboration of the gene expression patterns, two negative controls were applied: first, "untreated" calli were neither vacuum infiltrated nor exposed to any solution (labeled "U" in Figs. 3.3 and 3.4); second, "control" calli were vacuum-infiltrated for 20 min with

the correspondent control buffers (labeled “C” in Fig. 3.4). Chitosan stock solution was prepared according to Benhamou and Thériault (1992), and the chitosan working solutions were prepared from this stock after adjusting the pH at 5.5 using 2.5 N NaOH. Dilutions of SA (Sigma) were prepared from a 500 mM stock solution prepared in water. MeJA stock solution (50 mM) was prepared in ethanol and working solutions were obtained by final dilution in 1% (v/v) ethanol.

3.2.2 Protein extraction

Coconut calli that were subjected to the different chitosan treatments were frozen in liquid nitrogen and homogenized in 1 mL of extraction buffer per g of tissue (50 mM HEPES-Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 50 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium orthovanadate, 10 mM sodium fluoride, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), 1 μ M aprotinin, 1 μ M leupeptin, 5 mM DTT, 20% transcinamic acid, 20% polyvinylpyrrolidone (PVPP)). Cell extracts were centrifuged at 19 500 $\times g$ for 30 min at 4 °C. The supernatant (SN) was recovered, quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until used. The protein concentration in the samples was measured by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin (Sigma) as standard.

3.2.3 β -glucanase assays

β -glucanase assays were conducted according to Pan *et al.* (1991). Briefly, protein extracts (35 μ g) from calli exposed to different chitosan treatments were fractionated by native polyacrylamide gel electrophoresis. After a 5 min wash with 0.05 M sodium acetate, gels were incubated for 1 h at 40 °C in the same solution supplemented with 13.3 mg mL⁻¹ laminarin (SIGMA); then enzymatic activity was revealed by addition of 0.075% 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma) in 1M NaOH. Gels were heated in a microwave oven for 10 s and photographed. Software from a Kodak EDAS 290 system was used to determine the relative band intensities.

3.2.4 Quantification of hydrogen peroxide production

Coconut calli were vacuum-infiltrated for 20 min with 10 mg mL⁻¹ chitosan, then calli samples were collected at different periods (0, 2 and 4 h) and ground in liquid nitrogen. After homogenization with 1 mL of 10 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid (MES), pH 6.5, per g of tissue, samples were centrifuged at 14 000 $\times g$ for 5 min at RT, and total H₂O₂ was determined in the supernatant with a modification of the procedure described by Messner and Boll [21]. Briefly, 200 μ L of supernatant were quickly mixed at RT with freshly prepared reaction buffer (10 mM MES, pH 6.5; 20 μ M phenol red; 10 ng mL⁻¹ horseradish peroxidase (SIGMA)) in a final volume of 1 mL. The reaction was stopped after 3 min by addition of 20 μ L NaOH (0.5N). H₂O₂ molar concentration in samples was determined by measuring the absorbance decrement at 558 nm resulting from the H₂O₂ - dependent peroxidase-catalyzed oxidation of phenol red (SIGMA). As control, production of H₂O₂ was evaluated in a mixture of supernatants pooled from “untreated” and “control” calli, generated as described above. Every experimental point was repeated independently three times, with three calli each.

3.2.5 RNA isolation, differential display (DD) and RT-PCR amplification

Total RNA was isolated from each sample using Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. For differential display, 2 µg of total RNA from each sample (see below) were incubated with oligo-dT primer for 60 min at 42 °C; then reverse transcriptase was denatured by heating 5 min at 70 °C. PCR was carried out with 1 µL single-strand cDNA aliquots using four different combinations of downstream (T) and upstream (P) primers (T1:P10, T6:P10, T4:P10, and T1:P1 from the Clontech Delta® Differential Display kit) under the following conditions: 94 °C 5 min, 40 °C 5 min, 68 °C 5 min, 1 cycle; 94 °C 2 min, 40 °C 5 min, 68 °C 5 min, 2 cycles; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 68 °C 2 min, 25 cycles. For comparison of product patterns, 5 µL of PCR products were fractionated in denaturing 5% polyacrylamide/8 M urea sequencing gels in 0.5X TBE buffer, at 70W for 2.75 h. Gels were stained with silver nitrate according to the protocol of Bassam *et al.* (1991). Differentially abundant cDNA bands were excised from the gel and the successfully PCR-reamplified bands were ligated into pGEM-T Easy Vector (Promega) and sequenced. Each sequence was subjected to BLAST comparison, using the NCBI WEB facility. To clearly differentiate modifications in cDNA populations produced by the chitosan treatment from those produced by the procedure itself (which includes addition of buffers and vacuum application), an aliquot of total RNA pooled from "untreated" and "control" calli (as described above) was reverse transcribed and PCR amplified as a single "control" reaction. Every RT-PCR amplification was performed twice from two independent experiments.

3.2.6 Effects of chitosan, SA and MeJA on gene expression

Corroboration of the DD patterns of isolated clones, and gene expression analysis in SA- and MeJA-treated coconut calli were performed by a modification of the method described by Patel *et al.* (1998). In brief, 2 µg of total RNA from four independent calli that were not vacuum-infiltrated (U), or vacuum-infiltrated with either control buffers (C.), chitosan (Ch), salicylic acid (SA), methyl jasmonate (MeJA), or from different tissues of non-elicited plantlets were reverse transcribed using oligo-dT, then each single-strand cDNA was PCR amplified with the corresponding T-P primer combination (T1:P1 for clones G1 and G2; T4:P10 for clone G1-C). The resulting double-strand cDNA populations were size fractionated by agarose gel electrophoresis, blotted to nylon membranes and hybridized separately with each digoxigenin-labeled probe with the method of Church and Gilbert (1984). Positive hybridizations were detected by enhanced chemiluminescence (CSPD®, Roche Diagnostics).

3.3. Results and discussion

3.3.1 Chitosan application to coconut calli promotes the increment of a β -1,3-glucanase activity.

It has been observed that chitosan oligomers are able to activate defense in different plant species (Kendra and Hadwiger, 1984; Conrath *et al.*, 1989; Kauss *et al.*, 1989; Hadwiger *et al.*, 1994). Therefore, our first goal was to determine whether addition of chitosan could also trigger defense responses when added to *in vitro* coconut calli. The “effective” concentration of chitosan has been demonstrated to be specific for the different plant models employed, ranging from $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Lin *et al.*, 2005; Mason and Davis, 1997) to mg mL^{-1} (Vasyukova *et al.*, 2001; Klepzig and Walkinshaw, 2003). In addition, specific studies directed to analyze the effects of the molecular weight of chitosan on its elicitation capacity found that lower molecular weights of 1 335 Da (6-9 dp) (Vasyukova *et al.*, 2001) and 5 000 Da (22-33 dp) (Lin *et al.*, 2005) exerted the highest elicitation; so we used acid deacetylated crab shell chitosan, the dp of which was not noted, but was likely to be between 6 and 11 (Pitta and Giuliotti, 1999). We cultivated coconut calli in the presence of activated charcoal (AC), and is known that when AC is added to plant tissue culture media, it can adsorb chemicals added or released to the medium reducing their effective concentration (Pan and van Staden, 1998). For instance, Ebert and Taylor (1990) demonstrated that more than 99% of exogenous auxin was adsorbed by AC, while Nomanbhay and Palanisamy (2005) found that AC interacted with chitosan, reducing its free concentration considerably. Therefore, some chemicals must be added in excess to compensate their adsorption in AC (Van Winkle *et al.*, 2003; van Winkle and Pullman, 2005), and we speculated that relatively higher concentrations of chitosan should be applied to elicitate the coconut tissues, to circumvent the presence of activated charcoal in the culture medium. In order to determine the most effective chitosan concentration to induce a defense response, we vacuum infiltrated *in vitro* coconut calli with control buffer or with increasing concentrations of chitosan (0, 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 mg mL^{-1}) for 20 min. Protein samples isolated from each treatment were then collected at different intervals (0, 4, 8, 12, 16, and 24 h). These range of concentrations were chosen because although the minor concentration we used (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) is 10-fold higher than the optimal concentration observed in some reports (Lin *et al.*, 2005), it is indeed 4- or 6-fold lower than others used in the absence of AC (Benhamou and Thériault, 1992; Benhamou *et al.*, 1998). We evaluated the activation of β -1,3-glucanases, which are PR-2 group proteins that have been broadly accepted as an effective parameter of defense induction in plants (Kauffmann *et al.*, 1987; van de Locht *et al.*, 1990). Figure 3.1 shows the results obtained with protein extracts obtained after 8 h treatment. We detected a single band of activity with an Rf value of ~ 0.1 , which was present in the control treatment (Fig. 3.1A, lane 1). The activity of this band was not appreciably modified when elicitor was added in concentrations below 5.0 mg mL^{-1} (Fig. 3.1A, lanes 2 and data not shown); however, the activity clearly increased more than 50% when a concentration of 10.0 mg mL^{-1} was used (Fig. 3.1A, lane 3). Remarkably, only when we applied the highest chitosan concentration the β -1,3-glucanase activity did rise above basal levels. This effect was not due to an increment in the osmolarity as the osmotic pressure of the chitosan solution was not so different when compared with

the osmolarity of buffer alone (-0.68 and -0.70 MPa, respectively). Under this chitosan concentration, the increment in β -1,3-glucanase activity from calli was detected from at least 4 h, reached a peak between 12 and 16 h, and then began to decrease by 24 h after treatment application (Fig. 3.2A, lanes 2 to 5). Since the increment in the β -1,3-glucanase activity after chitosan application strongly suggested that these elicitation conditions were adequate to set up the defense response.



Fig. 3.2. Effect of chitosan concentration on the induction of β -1,3-glucanase activity in *Callisandra* calli. Calli were treated with 0.1% chitosan (lane 2) or buffer (lane 3) for 24 h. The amount of β -1,3-glucanase activity was measured by using a 14 C-labeled substrate. A representative experiment is shown. The data are the mean \pm SD of three independent experiments. * indicates a significant difference ($P < 0.05$) between lanes 2 and 3.

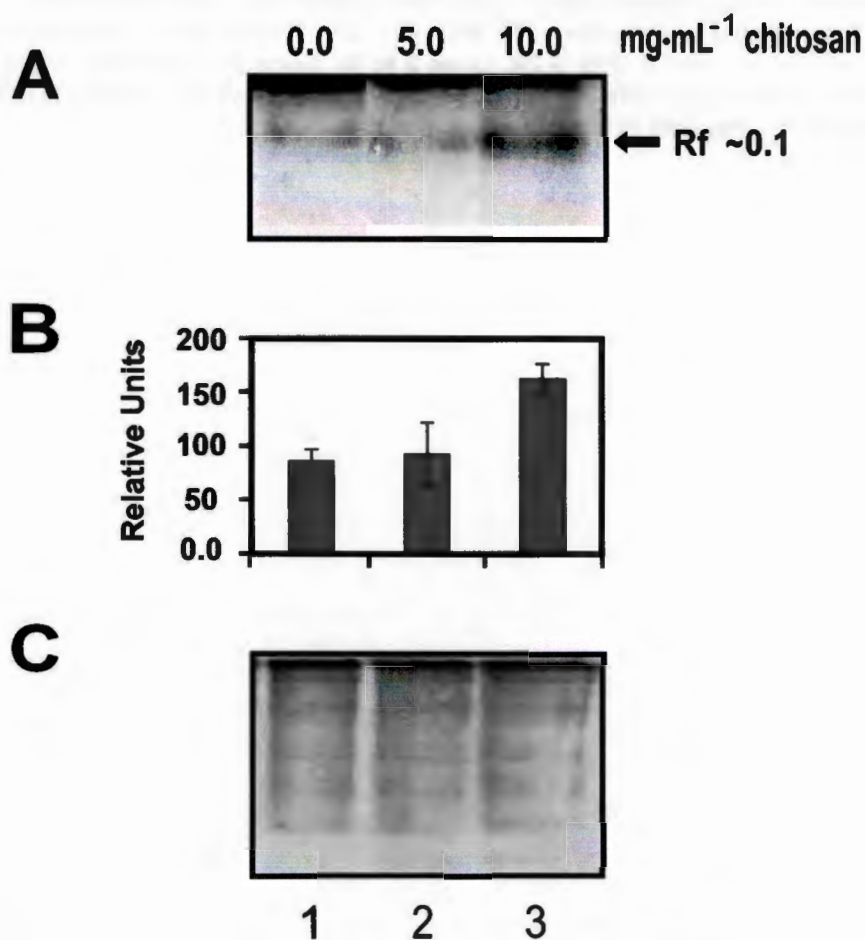


Fig. 3.1. Effect of the chitosan concentration in the induction of β -1,3-glucanase activities in *Cocos nucifera* calli. Protein extracts (35 μ g) isolated 8 h after calli were exposed for 20 min to different chitosan concentrations, were fractionated by native electrophoresis in a 12% polyacrylamide gel and β -1,3-glucanase activity was evaluated in the gel as described in the experimental procedures. **A**, a representative photograph of the activity gels; **B**, bars represent mean values of densitometric units \pm SD of three independent experiments; **C**, Coomassie staining of a parallel gel.

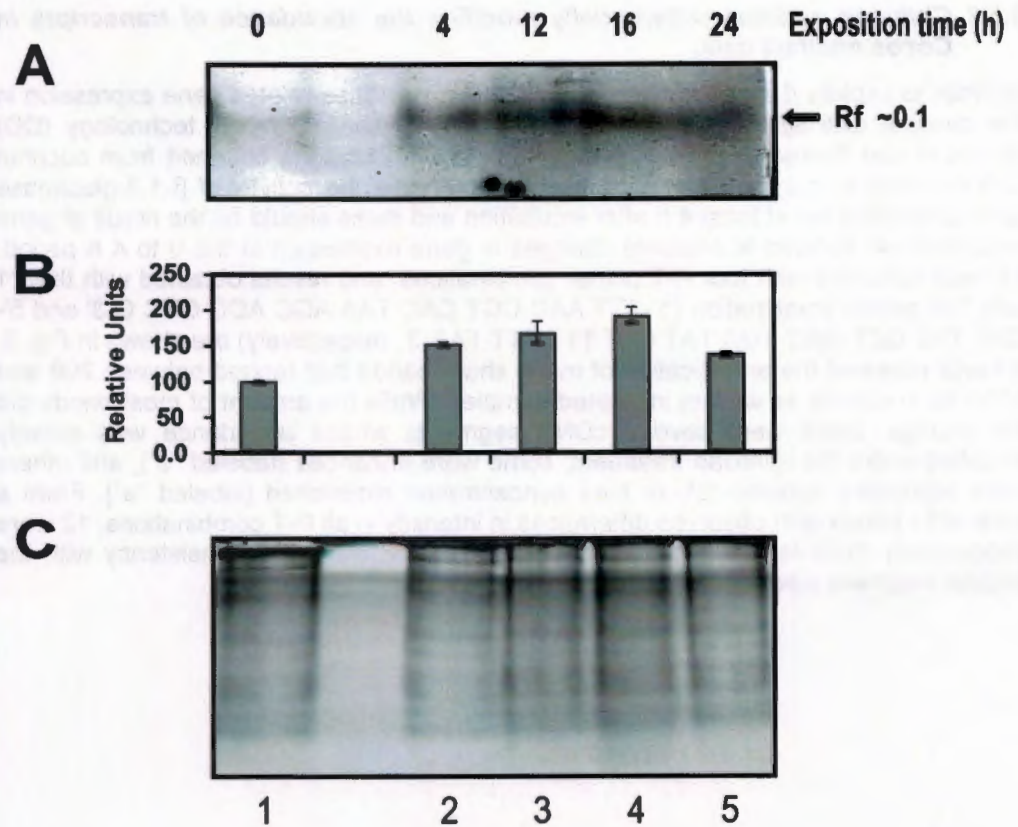


Fig. 3.2. Effect of the chitosan incubation period in the induction of β -1,3-glucanase activities in *Cocos nucifera* calli. Protein extracts (35 μ g) isolated at different periods after calli were exposed for 20 min to 10 mg.mL⁻¹ chitosan, were fractionated by native polyacrylamide electrophoresis. Detection of β -1,3-glucanase activity was assessed as described in experimental procedures. **A**, a representative photograph of the activity gels; **B**, bars represent mean values of densitometric units \pm SD of three independent experiments; **C**, Coomassie staining of a parallel gel.

3.3.2 Chitosan addition differentially modifies the abundance of transcripts in *Cocos nucifera* calli.

In order to explore if chitosan treatment also alters defense-related gene expression in the coconut calli system, we applied the RNA differential display technology (DD) (Rushton and Somssich, 1998) to compare RNA populations obtained from coconut calli exposed or not to chitosan. Since increments in the activity of β -1,3-glucanase were detected from at least 4 h after incubation and these should be the result of gene induction, we decided to evaluate changes in gene expression in the 0 to 4 h period. DD was executed with four P-T primer combinations, and results obtained with the P1 and T10 primer combination (5'-ATT AAC CCT CAC TAA AGC ACC GTC C-3' and 5'-CAT TAT GCT GAG TGA TAT CTT TTT TTT TAA-3', respectively) are shown in Fig. 3. Results revealed the amplification of many sharp bands that ranged between 200 and 1000 bp in control as well as in treated samples. While the amount of most bands did not change, there were several cDNA segments whose abundance was notably modified under the chitosan treatment: some were enhanced (labeled "c"), and others were repressed (labeled "b") or their concentration diminished (labeled "a"). From a total of 21 bands with observed differences in intensity in all P-T combinations, 12 were successfully PCR reamplified and cloned, but only 8 displayed consistency with the original fragment size.

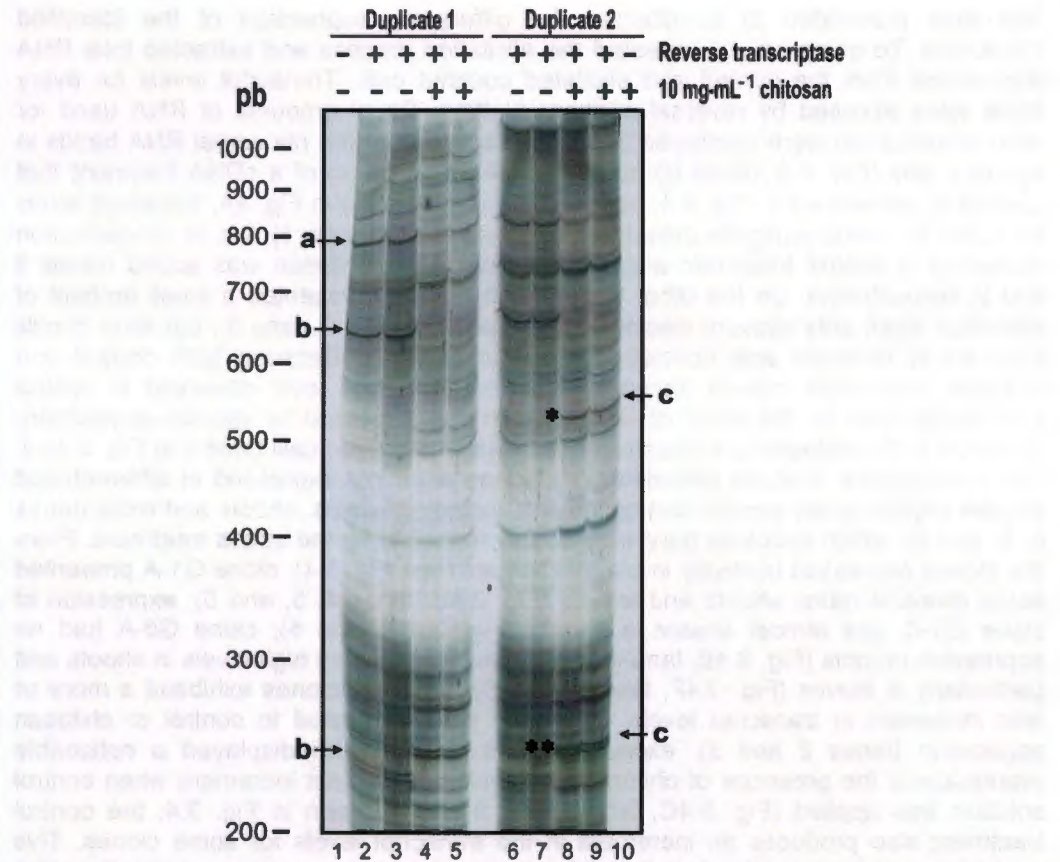


Fig. 3.3. Chitosan induces differential abundance of mRNAs in *C. nucifera* calli. cDNA products synthesized as described in Materials and Methods with P1-T1 primers were size fractionated and stained as described in materials and methods. **Lanes 1 and 10:** PCR amplification in the absence of reverse transcriptase as control for DNA contamination; **lanes 1, 2, 3, 6, and 7:** cDNA population amplified from control RNA (pooled from "untreated" and "control" calli, see text); **lanes 4, 5, 8, 9 and 10:** cDNA population amplified from the induced RNA pool (isolated from calli that were vacuum-infiltrated with chitosan); **a, b, and c:** examples of cDNA bands with reduced, repressed, or enhanced gene expression, respectively; **single and double asterisks:** indication of the original positions of clones G2 and G1, respectively; **Pb:** position of the 100 pb DNA ladder (Invitrogen).

We then proceeded to corroborate the differential expression of the identified transcripts. To do so, we repeated the elicitation process and extracted total RNA populations from the control and elicited coconut calli. Transcript levels for every clone were assessed by reversal northern blotting. Equal amounts of RNA used for retro-amplification were confirmed by visual inspection of the ribosomal RNA bands in agarose gels (Fig. 3.4, panel H) and RT-PCR amplification of a cDNA fragment that codifies a coconut actin (Fig. 3.4, panel G). As can be seen in Fig. 4A, transcript levels for Clone G1 were negligible detectable in untreated calli (lane 1), but its concentration increased in control treatment and slightly more when chitosan was added (lanes 3 and 2, respectively). On the other hand, clone G2 also presented a small amount of transcript when only vacuum treatment is applied (Fig. 3.4 D, lane 3), but level in calli exposed to chitosan was considerably higher (lane 2). Because both control and chitosan treatments include vacuum infiltration, the RNA level observed in control treatments could be the result of an additional stress exerted by vacuum application, as no G1 or G2 detectable expression was seen in untreated calli (lane 1 in Fig. 3.4A). The hybridization analysis revealed both clones were not expressed in differentiated plantlet organs under non-elicited conditions, including leaves, shoots and roots (lanes 4, 5, and 6), which indicates they were strictly inducible by the stress treatment. From the clones expressed normally in plantlet tissues (see Fig. 3.4), clone G1-A presented equal levels in roots, shoots and leaves (Fig. 3.4B, lanes 4, 5, and 6); expression of clone G1-C was almost absent in shoots (Fig. 3.4C, lane 5); clone G5-A had no expression in roots (Fig. 3.4E, lane 4), and clone G7 had very high levels in shoots and particularly in leaves (Fig. 3.4F, lanes 5 and 6). All these clones exhibited a more or less increment in transcript levels when calli were subjected to control or chitosan application (lanes 2 and 3), excepting clone G1-C, which displayed a noticeable repression in the presence of chitosan, but a slight transcript increment when control solution was applied (Fig. 3.4C, lane 2). As it can be seen in Fig. 3.4, the control treatment also produces an increment in the transcript levels for some clones. This might be explained by the fact that this treatment includes vacuum application of a neutralized acid solution; in consequence, there is a possibility that these clones could be moderately induced also by biotic stresses.

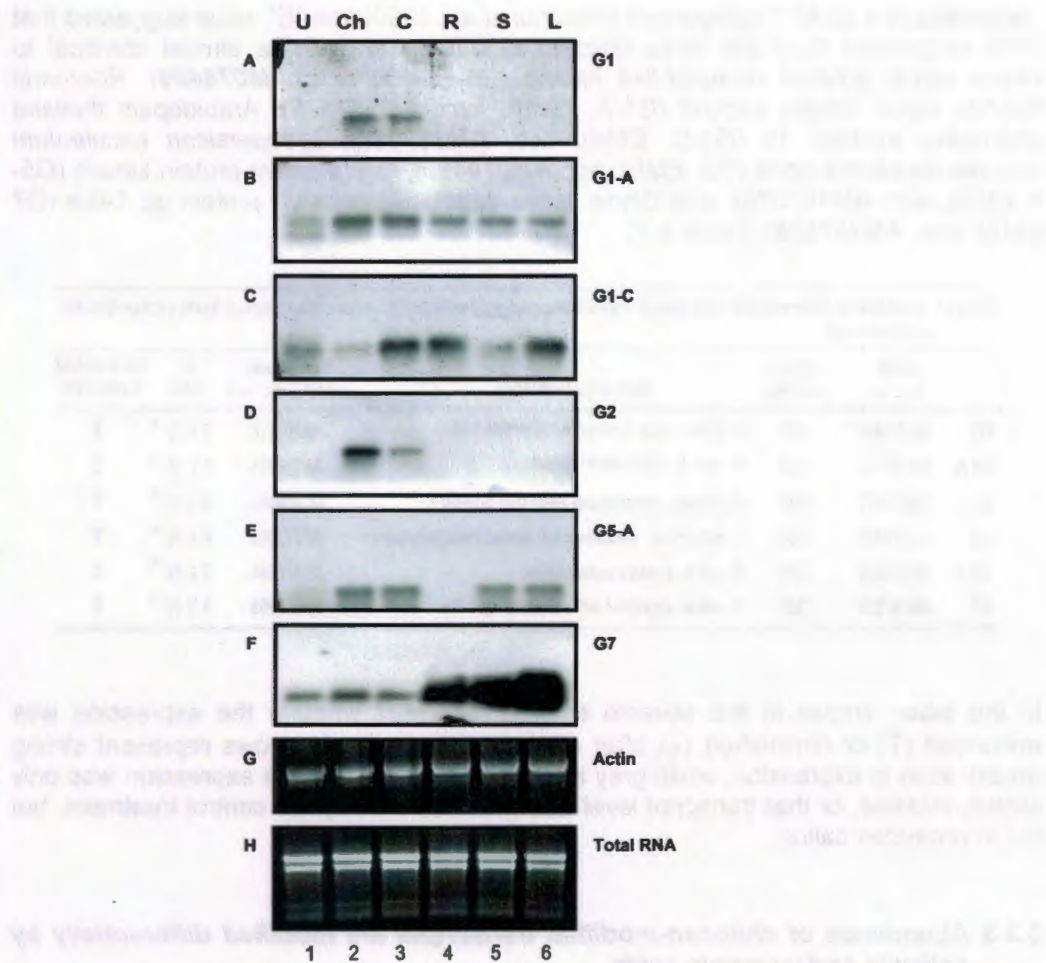


Fig. 3.4. Expression levels of chitosan-modified transcripts in tissues of adult plant. Two μg of RNA samples isolated from different tissues were reverse transcribed and amplified by PCR with the corresponding P-T primer combination as described. RT-PCR products were size fractionated in 1.1% agarose gels and blotted to nylon membranes, and then hybridized individually with the isolated clones labeled with digoxigenin. **a** to **c**, autoradiographies of the hybridized membranes; **d**, RT-PCR amplification of a coconut transcript for actin; **e**, ethidium bromide staining as control of RNA concentration; **U**, "untreated" calli (see materials and methods); **Ch**, chitosan-treated calli. **C**, "control" calli (see materials and methods); **R**, root; **S**, stem; **L**, leaf.

According to a BLAST comparison (Altschul et al., 1990), the “E” value suggested that DNA sequences from the three chitosan-modified clones were almost identical to *Oryza sativa* putative receptor-like kinase (G1, EMBL acc. **AM076489**), *Roemeria hybrida* alpha tubulin subunit (G1-A, EMBL acc. **AM167526**), *Arabidopsis thaliana* alternative oxidase 1b (G1-C, EMBL acc. **AM167527**), *Lycopersicon esculentum* disease resistance gene (G2, EMBL acc. **AM076490**), *Oryza sativa* protein kinase (G5-A EMBL acc. **AM167528**), and *Oryza sativa* vegetative cell wall protein gp 1-like (G7 EMBL acc. **AM167529**) (Table 3.1).

Table 3.1 Analysis of differentially expressed mRNA sequences isolated by differential display from elicitor-treated coconut calli

	EMBL acc. no.	cDNA size (bp)	Sequence homology	Data base match (acc. no.)	E value	Differential expression
G1	AM076489	225	<i>O. sativa</i> putative receptor-like protein kinase	ABA96476	3×10^{-30}	↑
G1-A	AM167526	345	<i>R. hybrida</i> alpha tubulin subunit	AF394915	5×10^{-56}	↑
G1-C	AM167527	192	<i>A. thaliana</i> mitochondrial alternative oxidase 1	DQ056603	3×10^{-20}	↓
G2	AM076490	531	<i>L. esculentum</i> Verticillium wilt disease resistance gene	AF272366	6×10^{-32}	↑
G5-A	AM167528	234	<i>O. sativa</i> putative protein kinase	XP475564	3×10^{-30}	↑
G7	AM167529	363	<i>O. sativa</i> vegetative cell wall protein gp1-like	XP550268	9×10^{-32}	↑

In the table, arrows in the seventh column represent whether the expression was enhanced (↑) or diminished (↓) after elicitation. Also, Black arrows represent strong modification in expression, while grey arrows represent either the expression was only slightly modified, or that transcript level was modified also by the control treatment, but not in untreated callus.

3.3.3 Abundance of chitosan-modified transcripts are modified differentially by salicylic and jasmonic acids

It has been shown that pathogen attack can trigger at least two defense pathways, one involving SA and one involving JA and ethylene (Zhang and Klessig, 2001). SA has been shown to play a crucial role in the induction of HR (Canagarajah et al., 1997) and the establishment of systemic acquired resistance (SAR) (Lee et al., 2001). The molecular mechanism by which SA could induce a defense response has been investigated principally in *A. thaliana*; in this model, SA induces SAR through the activation of NPR1 transcription factor, which in turn promotes expression of PR genes (Holley et al., 2003). On the other hand, JA has been proposed as signal transducer in tissue cultures incubated with pathogen elicitors (Hu et al., 2004), and activates several genes including those coding defense proteins like thionin (Fukuda et al., 1997), and PDF (Hazzalin and Mahadevan, 2002) in a SA-independent pathway. Since PR gene expression mediated by NPR1 is a cross-talk point between the SA and JA-ethylene signaling pathways that confer resistance to pathogens, we wanted to know if the transcripts induced differentially by chitosan were also modified by SA and MeJA.

As those chemical signals induce preferentially and antagonistically biotic or abiotic pathways, respectively, results of the proposed experiments may help in understanding either the identified genes are effectively related to defense.

C. nucifera calli were exposed to different concentrations of SA (Fig. 3.5A) and MeJA (Fig. 3.5B) as described, and transcript levels were evaluated by reverse northern blot. All results were interpreted after comparison against the intensity of response obtained with calli untreated or incubated with the corresponding control buffers (lane 1 and 4 for SA and lanes 5 and 7 for MeJA, respectively). Amount of transcript for clone G1 was increased with 50 mM SA, and at less extent by the two MeJA concentrations (lanes 2-4 and lanes 6-7, respectively); G1-A transcript levels were reduced at all SA and MeJA concentrations; G1-C was reduced with SA and not appreciably by MeJA; G2 was enhanced with 500 mM SA, but MeJA cause only a slight increment; G5-A was not affected considerably by SA, and was reduced with all MeJA concentrations; finally, SA did not promote an increment on G7 levels, but 50 μ M MeJA promotes a slight increasing. Elicitor influence on the expression patterns were complex; however, it is noteworthy that the two genes with no expression in calli and adult tissues, but actually induced by chitosan treatment (G1 and G2) were also induced by treatment with SA and MeJA. This strengthens the possibility that their gene products might be related to different processes in the coconut-pathogen interaction.

The third clone, G1-C, whose transcript levels were reduced by the chitosan treatment, is quite similar to *A. thaliana* and *N. tabacum* mitochondrial alternative oxidases (AOX); when expression of the corresponding soybean and pea genes is inhibited, a stimulation of the mitochondrial H₂O₂ production occurs, then it was proposed that this enzyme operates as a non-coupled anti oxygen defense mechanism (Korsmeyer, 1995). Also, Amirsadeghi *et al.* (2006) demonstrated that the lack of AOX in transgenic *N. tabacum* was accompanied by an increase in some antioxidant defenses. In that study, the authors suggested that susceptibility to cell death from signaling molecules like SA and nitric oxide (NO) is dependent upon the steady-state cellular level of reactive oxygen species (ROS) and that AOX levels clearly contribute to this steady state. According to these reports, if the observed chitosan-mediated repression of clone G1-C in coconut calli was related to defense, it should be accompanied by an increment in ROS, which is a physiological event that allows the establishment of the defense response (Durrant and Dong, 2004).

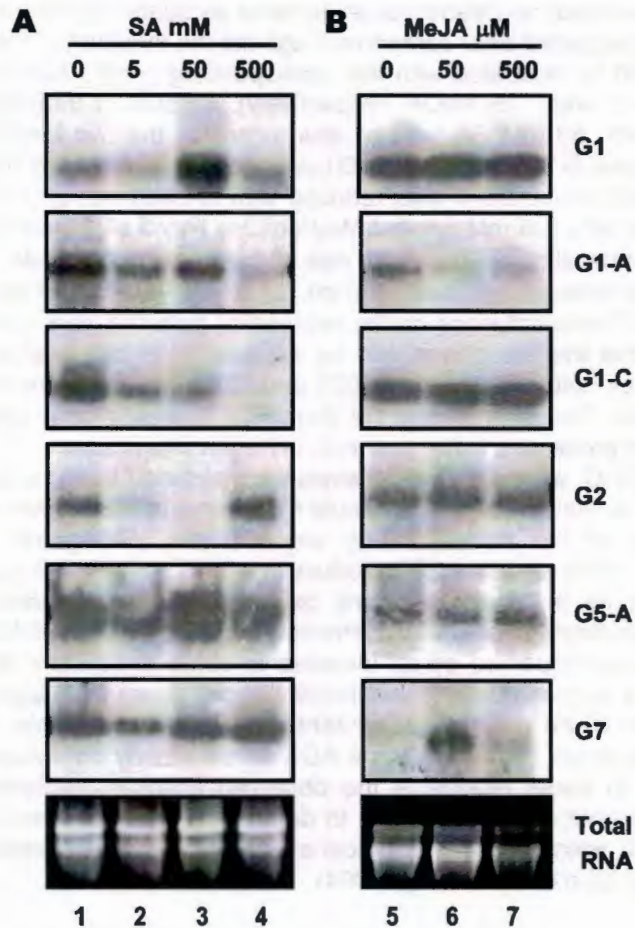


Fig. 3.5. Effect of SA and MeJA in the expression of the cDNAs isolated from *Cocos nucifera* calli. Two μ g of total RNA isolated at 2 and 4 h after coconut calli were vacuuminfiltrated for 20 min with different concentrations of salicylic acid (A) or methyl jasmonate (B), were pooled for each treatment, reverse transcribed and amplified by PCR with the corresponding P-T primers. RT-PCR products were size fractionated in 1.1% agarose gels and blotted to nylon membranes, and then they were hybridized individually with each isolated clone labeled with digoxigenin. **lanes 1 to 4:** salicylic acid (SA) treatments; **lanes 5 to 7:** methyl jasmonate (MeJA) treatments. Lower panel is ethidium bromide staining as control of RNA concentration.

To verify this hypothesis, we measured the total concentration of hydrogen peroxide produced by calli in the same elicitation period (0-4 h) when reduction of G1-C expression was found. The results obtained showed that vacuum-infiltration with control buffer produced a stepwise increment in the production of total H_2O_2 (See Fig. 3.6, white columns). However, when compared to control, vacuum-infiltration with chitosan produced a much higher H_2O_2 increment (up to 3 fold) after 2 h of treatment (Fig. 3.6, grey columns). The total H_2O_2 content in both control and chitosan treatments seemed to be equal after 4 h of infiltration. Consequently, though there is again a certain level of response when control treatments were applied, an early oxidative burst was present only after calli were infiltrated with chitosan. This result corresponded well with the chitosan- and SA-induced repression of clone G1-C, which occurred between 0 and 4 h after application of treatments (compare Fig. 3.6 with Figs. 3.5 and 3.4).



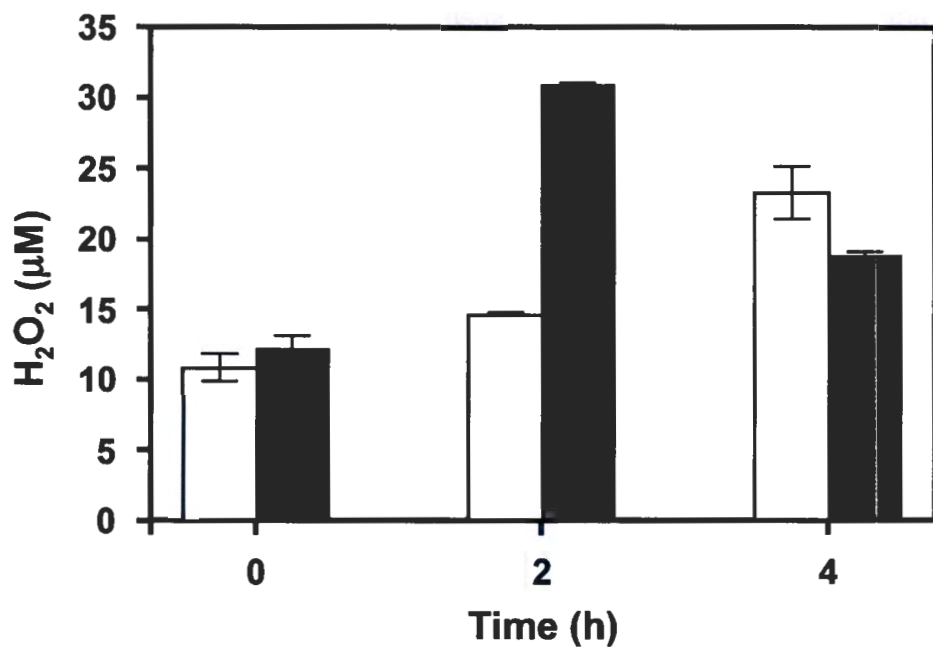


Fig. 3.6. Chitosan induces the production of hydrogen peroxide in *Cocos nucifera* calli. Concentration of total H₂O₂ in cell extracts was measured by the phenol red oxidation method [21] at 0, 2 and 4 h after application of the different treatments. **Grey columns**, H₂O₂ in cell extracts from calli vacuum-infiltrated for 20 min with 10 mg mL⁻¹ chitosan; **White columns**, H₂O₂ in a pool of cell extracts from “untreated” and “control” calli. All experiments were repeated three times with three calli each. Results are expressed as mean value ± SD.

In summary, the differential modification of gene expression supports the hypothesis that chitosan addition to coconut calli might be able to activate defense responses against pathogens. Research concerning the physiological and molecular relationships between the coconut palm and its associated pathogens has been traditionally overlooked due to several causes, and has focused mostly in disease diagnosis (Glazebrook, 2005) or in the detection of the pathogens by means of PCR-based techniques (Gundlach *et al.*, 1992; Becker and Apel, 1992). In this sense, using *in vitro* tissue cultures could be a suitable alternative to study the plant-pathogen relationships at molecular and biochemical levels. The evidence obtained in this work demonstrated the differential expression of defense-related genes (notoriously, the suppression of AOX and the induction of Verticillium wilt resistance gene, an R gene), the induction of PR proteins (i.e. β -1,3-glucanases), and the generation of an oxidative burst as a result of chitosan addition. To our knowledge, the results presented here identify, for the first time, a coconut signaling intermediate or molecular product induced expressly when tissues are incubated with pathogen-derived signals.

It is well known that perception of general elicitors can lead to the activation of broad-spectrum specific responses (Penninckx *et al.*, 1996); therefore, the model employed in this study constitutes an excellent alternative that can be used to identify and analyze signal transduction intermediates and molecular products involved in the defense response against pathogens.

References

- Altschul SF, Gish W, Millar W, Myers EW, Lipman DJ.** (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol.* 215: 403–10.
- Amirsadeghi S, Robson CA, McDonald AE, Vanlerberghe GC.** (2006) Changes in plant mitochondrial electron transport alter cellular levels of reactive oxygen species and susceptibility to cell death signaling molecules. *Plant Cell Physiol.* 47: 1509–19.
- Appel K, Hirt H.** (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 4:55: 373–99.
- Becker W, Apel K.** (1992) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a novel jasmonate-induced protein of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Mol Biol.* 19: 1065–7.
- Benhamou N, Kloepper JW, Tuzun S.** (1998) Induction of resistance against Fusarium wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta.* 204: 153–68.
- Chan JL, Saéñz 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: 515–21.
- Church GM, Gilbert W.** (1984) Genomic Sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991–5.
- Conrath U, Domard A, Kauss H.** (1989) Chitosan-elicited synthesis of callose and of coumarin derivatives in parsley cell suspension cultures. *Plant Cell Rep.* 8: 152–5.
- Desikan R, Reynolds A, Hancock JT, Nelly SJ.** (1998) Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in Arabidopsis suspension cultures. *Biochem J* 330: 115–20.
- Durrant WE, Dong X.** (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol.* 42: 185–209.
- Ebert A, Taylor HF.** (1990) Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* 20: 165–72.
- Felix G, Boller T.** (1995) Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. *Plant J.* 7: 381–9.
- Fki L, Masmoudi R, Drira N, Rival A.** (2003) An optimised protocol for plant regeneration from embryogenic suspension cultures of date palm, *Phoenix dactylifera* L., cv. Deglet Nour. *Plant Cell Rep.* 21: 517–24.
- Glazebrook J** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 205–27.

- Graham TL, Graham MY.** (1999) Role of hypersensitive cell death in conditioning elicitation competence and defense potentiation. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 55: 13–20.
- Griffith R.** (1987) Red ring disease of coconut palm. *Plant Dis.* 71: 193–6.
- Gundlach H, Müller MJ, Kutchan TM, Zenk MH.** (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 2389–93.
- Hadwiger LA, Ogawa T, Kuyama H.** (1994) Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 4;7: 531–3.
- Hanold D, Randles JW.** (1991) Coconut cadang-cadang disease and its viroid agent. *Plant Dis.* 1;75: 330–5.
- Howard FW, Barrant CI.** (1989) Questions and answers about lethal yellowing disease. *Principes.* 33: 163–71.
- Joseph T, Radha K.** (1975) Role of *Phytophthora palmivora* in bud rot of coconut. *Plant. Dis. Repr.* 59: 1014–7.
- Kauffmann S, Legrand M, Geoffroy P, Fritig B.** (1987) Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO J.* 6: 3209–12.
- Kauss H, Jeblick W, Domard A.** (1989) The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta.* 178: 385–92.
- Kawchuk LK, Hachey J, Lynch DR, Kulcsar F, van Rooijen G, Waterer DR,** (2001) Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1;98: 6511–5.
- Kendra DF, Hadwiger LA.** (1984) Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Fungal Gen Biol (Exp Mycol).* 4;8: 276–81.
- Klepzig KD, Walkinshaw CH.** (2003) Cellular response of loblolly pine to wound inoculation with bark beetle-associated fungi and chitosan. *Resch. Pap. SRS-30.* Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station, Asheville, NC, U.S. p. 1–9.
- Korsmeyer SJ.** (1995) Regulators of cell death. *Trends Genet.* 11: 101–5.
- Kuta DD, Gaivaronskaya LM.** (2004) Ca²⁺ and reactive oxygen species are involved in the defense responses of rice callus culture to rice blast disease. *Afr. J. Biotech.* 4;3: 76–81.
- Liang P, Pardee AB.** (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the Polymerase Chain Reaction. *Science.* 257: 967–71.

- Lin W, Hu X, Zhang W, Rogers WJ, Cai W.** (2005) Hydrogen peroxide mediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. *J. Plant. Physiol.* 162: 937–44.
- Maksimov IV, Cherepanova EA, Surina OB, Sakhabutdinova AR.** (2004) The effect of salicylic acid on peroxidase activity in wheat calli cocultured with the bunt pathogen *Tilletia caries*. *Russ. J. Plant. Physiol.* 51: 480–5.
- Mason ME, Davis JM.** (1997) Defense response in slash pine: Chitosan treatment alters the abundance of specific mRNAs. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 10: 135–7.
- Montesano M, Brader G, Palva ET** (2003) Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. *Mol. Plant. Pathol.* 4: 73–79.
- Nomanbhay SM, Palanisamy K.** (2005) Removal of heavy metal from industrial wastewater using chitosan coated oil palm shell charcoal. *Elect J Biotech.* 8: 43–53.
- Oropeza C, Zizumbo-Villarreal D.** (1997) The history of lethal yellowing in Mexico. In: Eden-Green SJ and Ofori F, editors. *Proc Int Wkshp Lethal Yellowing-like diseases of Coconut, Elmina, Ghana.* p. 69–76.
- Pan MJ, van Staden J.** (1998) The use of charcoal in in vitro culture—A review. *Plant Growth Reg.* 26: 155–63.
- Parthasarathy MV, van Slobbe WG, Soudant C.** (1978) Hartrot or Fatal wilt of palms. 1. Coconuts (*Cocos nucifera*). *Principes.* 22: 3–14.
- Patel IR, Attur MG, Patel RN, Stuchin SA, Abagyan RA, Abramson SB,** (1998) TNF- α Convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: Isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF- α 1. *J Immunol.* 160: 4570–9.
- Penninckx IAMA, Eggermont K, Terras FRG, Thomma BPHJ, De Samblanx GW, Buchala A.** (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell.* 8: 2309–23.
- Pitta-Alvarez SI, Giulietti AM.** (1999) Influence of chitosan, acetic acid and citric acid on growth and tropane alkaloid production in transformed roots of *Brugmansia candida* Effect of medium pH and growth phase. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* 59: 31–8.
- Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP, Starkov AA.** (1997) Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS Lett.* 415: 87–90.
- Rohde W, Randles JW, Langridge P, Hanold D.** (1990) Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus. *Virology.* 176: 648–51.

- Shein V, Andreeva ON, Polyakova GG, Zrazhevskaya GK.** (2003) Effect of pine callus elicitation by the *Fusarium* strains of various pathogenicity on the content of phenolic compounds. *Russ. J. Plant. Physiol.* 50: 634–9.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ** (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell.* 15: 760–70.
- Stratmann J, Scheer J, Ryan CA.** (2000) Suramin inhibits initiation of defense signaling by systemin, chitosan, and a β -glucan elicitor in suspension-cultured *Lycopersicon peruvianum* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 8862–7.
- Teixeira J B, Söndahl MR, Nakamura T, Kirby EG.** (1995) Establishment of oil palm cell suspensions and plant regeneration. *Plant Cell Tiss Org Cult* 40: 105–11.
- Thelley TM, Mohankumar C.** (2001) H⁺-ATPase as a biochemical marker for early detection of root (wilt) disease in coconut palms (*Cocos nucifera* L). *Indian. J. Biochem. Biophys.* 38: 199–02.
- van de Locht U, Meier I, Hahlbrock K, Somssich IE.** (1990) A 125 bp promoter fragment is sufficient for strong elicitor-mediated gene activation in parsley. *EMBO J.* 9: 2945–50.
- Van Winkle S, Jonson S, Pullman GS.** (2003) The impact of Gelrite and activated carbon on the elemental composition of two conifer embryogenic tissue initiation media. *Plant. Cell. Rep.* 21: 1175–82.
- Van Winkle SC, Pullman GS.** (2005) Achieving desired plant growth regulator levels in liquid plant tissue culture media that include activated carbon. *Plant Cell. Rep.* 4: 201–8.
- Vasyukova NI, Zinov'eva SV, Il'inskaya LI, Perekhod EA, Chalenko GI, Gerasimova NG.** (2001) Modulation of plant resistance to diseases by water-soluble chitosan. *Appl. Biochem. Microbiol.* 37: 103–9.
- Wang GL, Ruan DL, Song WY, Sideris S, Chen L, Pi LY.** (1998) Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell.* 10: 765–79.

CAPITULO IV. DISCUSIÓN GENERAL

Actualmente se tiene un conocimiento vasto en los diferentes niveles de los mecanismos de defensa que las plantas establecen en contra de microorganismos patógenos. Este conocimiento generado a partir de estudios realizados en plantas modelo, ha permitido comprender mejor las bases bioquímicas y moleculares de la interacción planta-patógeno y ha permitido también extrapolar las aproximaciones experimentales aún a plantas que no son consideradas como modelo.

De esta manera, se han investigado diferentes modelos específicos o “patosistemas” de interacción planta-patógeno, entre los que se incluyen tabaco, arroz, jitomate, maíz, etc., todos ellos con sus respectivos patógenos asociados. No obstante, también existen ejemplos de interacciones planta-patógeno para las cuales es difícil establecer un modelo experimental en el laboratorio o en condiciones ambientales prácticas. Tal es el caso del cocotero, en donde el tamaño de la planta y el largo ciclo de vida, entre otros factores, hacen impráctico el estudio de cualquiera de sus patosistemas. Para casos particularmente difíciles se ha diseñado estrategias alternas, como la incubación de tejidos cultivados *in vitro* con alguno de los productos de los genes de avirulencia o de los PAMPs, dependiendo de si la respuesta en estudio es específica (host response) o inespecífica (non-host response).

En el Centro de Investigación Científica de Yucatán existe un programa de investigación dedicado al estudio de diversas alternativas para el estudio de aspectos fitosanitarios y de producción de la palma de coco. Dentro de la línea de investigación planta-patógeno del programa institucional de cocotero, en el presente trabajo decidimos evaluar la factibilidad de establecer un sistema *in vitro* para mimetizar las condiciones bajo las cuales se pueda activar los sistemas de defensa de manera controlada, mediante la adición de quitosano a callos cultivados *in vitro*. Los resultados del presente trabajo constituyen el primer reporte en donde se caracteriza bioquímica o molecularmente la respuesta de defensa de la palma de coco, mediante la utilización de inductores.

4.1 La adición de quitosano a callos de *Cocos nucifera* promueve la síntesis de proteínas de defensa.

El quitosano es un compuesto no tóxico para las plantas, el cual puede incrementar la resistencia de las plantas ante el ataque de patógenos mediante su aplicación en semillas (Benhamou *et al.*, 1994; Lafontaine and Benhamou, 1996), en frutos (Benhamou, 2004) y en hojas (Trotel-Aziz *et al.*, 2006), así como reducir la enfermedad causada por hongos patógenos. Estas propiedades lo clasifican como un inductor que promueve la inducción de moléculas relacionadas con los mecanismos de defensa en plantas.

Entre las moléculas inducidas por el quitosano se encuentran proteínas con actividad hidrolítica como las β -1,3 glucanasas. Estas proteínas representan un tipo de enzimas antifúngicas presentes en la mayoría de las plantas (Broekaert, *et al.*, 2000). Se ha demostrado que este tipo de proteínas son capaces de romper la pared celular de las hifas durante el evento de penetración por parte del hongo, así como interferir directamente en el crecimiento de la hifa (Toyada *et al.*, 1991; Arlotio *et al.*, 1992).

Esto trae como consecuencia un impedimento de colonización del patógeno hacia la planta.

Para determinar si la adición de quitosano induce o incrementa la síntesis de β -1,3 glucanasas en callos de cocotero cultivados *in vitro*, se estableció un sistema que permitió evaluar este tipo de moléculas. La infiltración al vacío de una solución de quitosano a callos de cocotero durante 20 min demostró que con una concentración de 10 mg mL^{-1} se induce un incremento en la actividad enzimática de β -1,3 glucanasas durante las primeras 12 h posteriores a la inducción, obteniéndose un máximo de actividad a las 16 h. Este incremento en la actividad supone un evento que forma parte de los mecanismos de defensa inducidos. Una característica de algunas isoformas de estas proteínas es su expresión basal de manera constitutiva en diferentes tejidos de las plantas (Mauch and Staehelin, 1989) y se ha observado que durante la inducción de los mecanismos de defensa se incluye una posterior síntesis de este tipo de moléculas, generando con esto una aceleración auto catalítica de los sistemas de defensa (Benhamou *et al.*, 1990; Boller, 1995).

La concentración de quitosano empleada en el presente estudio (10 mg mL^{-1}) se encuentra entre las más altas reportadas en la literatura. Sin embargo, en diferentes estudios se han utilizado una amplia gama de concentraciones de este compuesto. El callo de cocotero es una estructura poco friable, es probable que debido a esta naturaleza, en los callos sea difícil la penetración de diferentes sustancias. Por tal motivo se requiere una mayor concentración de quitosano que las reportadas en la literatura, así como la aplicación de vacío con el fin de asegurar la penetración y un contacto homogéneo de este inductor en todo el callo.

El uso de vacío se ha empleado como una herramienta para la infiltración de sustancias. Wayne y colaboradores (1994) emplearon vacío para la infiltración de toxinas producidas por *Myrothecium roridum* a callos de *Cucumis melo* L. Por otra parte Jean y colaboradores (2001) emplearon vacío para la inoculación de bacterias a plantas de *Pyrus communis* y *Nicotiana tabacum*. En ambos trabajos, la infiltración al vacío demostró ser una mejor estrategia para la introducción de moléculas al sistema de estudio.

A diferencia de los estudios realizados *in vitro* como los empleados en este trabajo, en el que es necesario una alta concentración del inductor así como la aplicación de vacío, en una interacción real hongo-planta, existe ruptura de las defensas basales estructurales por parte del hongo durante la penetración. Durante esta penetración, la pared celular del hongo es sustrato de hidrolasas antimicrobianas secretadas por la planta, dando lugar a la desintegración de las hifas, esto lleva a la liberación de fragmentos poliméricos componentes de la pared celular que pueden actuar como inductores de los sistemas de defensa en la planta (Boller, 1995; Vander *et al.*, 1998). Estudios realizados por Inglis y Kachuk (2002) demostraron que el tratamiento de la pared celular de hongos con enzimas hidrolíticas libera quitosano en concentraciones del orden de los nanomoles, por lo que es probable que la concentración de quitosano liberado durante el proceso de degradación de la pared celular de los hongos, sea suficiente para desencadenar los sistemas de defensa, debido a que se libera dentro del sistema *in vivo*.

4.2 La adición de quitosano modifica diferencialmente los niveles de transcritos de genes de defensa en callos de *Cocos nucifera* L.

En la actualidad no existen programas de fitomejoramiento basados en el uso de marcadores bioquímicos o moleculares, que estén encaminados a la selección de variedades de cocotero resistentes a las enfermedades; es por ello que las acciones dirigidas a la generación de híbridos resistentes no han dado resultados satisfactorios. Debido a la falta de modelos de estudio apropiados, no se conoce prácticamente nada sobre la identidad ni la naturaleza de los genes de cocotero que podrían condicionar la resistencia a las enfermedades. Por ello, el objetivo más importante de este proyecto es el de demostrar si la adición de quitosano puede modificar los patrones de expresión de genes relacionados con la defensa en callos de cocotero cultivados *in vitro*.

Aun cuando el quitosano ha sido ampliamente utilizado como inductor de las respuestas de defensa en las plantas (Kendra and Hadwiger, 1984; Benhamon and Theriault, 1992; El Ghaouth *et al.*, 1992) estos trabajos se han enfocado a evaluar de manera independiente la inducción o modificación de moléculas particulares relacionadas con los mecanismos de defensa; en este sentido existen muy pocas evidencias de su uso para analizar los cambios en los patrones de expresión de genes relacionados con la defensa. Uno de los pocos reportes al respecto fue publicado por Mason y Davis en 1997. Ellos demostraron la acumulación de transcritos de la ácido cinámico-4-hidroxilasa y de una quitinasa cuando incubaron cultivos celulares de *Pinus elliotte* var. *Elliottii* con $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de quitosano por 24 h.

En los ensayos con callos de *C. nucifera*, se estableció un protocolo para elicitar las respuestas de defensa y evaluar la expresión génica diferencial. La secuenciación de los genes aislados y su posterior análisis de expresión permitiría determinar su relación con los sistemas de defensa. La combinación de cuatro juegos de cebadores de ADN (lo cual supone teóricamente el análisis del 4.4% del transcriptoma de cocotero) fue suficiente para evidenciar cambios en los patrones de expresión mediante la inspección directa del fraccionamiento de los productos del RT-PCR en los geles de secuenciación. Si bien no fue posible ni la reamplificación ni la clonación de todas las bandas diferenciales detectadas, la secuencia de los seis ADNc que sí se pudieron clonar demostró una identidad con productos celulares involucrados en la defensa. Aun cuando el despliegue diferencial es una excelente herramienta que permite evidenciar cambios en el nivel transcripcional, también es cierto que unos de sus puntos débiles es la dificultad que se presenta durante la reamplificación de bandas. Un ejemplo de estas dificultades es documentado en estudios realizados por Sánchez y González (2003), los cuales se avocaron a la identificación de genes durante una interacción de manzana y *Penicillium expansum*. En dicho estudio se emplearon catorce combinaciones de cebadores obteniendo noventa y ocho secuencias diferenciales y de las cuales solo catorce pudieron ser reamplificadas.

Mediante la comparación de las secuencias en bancos de datos, se encontró que las clonas aisladas presentaron niveles altos de similitud con genes de resistencia (clona G2, similar al gen *Ve* de *Lycopersicon esculentum* que le confiere resistencia al hongo *Verticillium dahliae*), a una subunidad de alfa tubulina (clona G1-A) a una cinasa tipo

receptor (clona G1, un putativo RLK de *Oryza sativa*), a una putativa proteína cinasa (clona G5-A), a una proteína de la pared celular tipo gp-1 (clona G7) y a productos relacionados con la explosión oxidativa (clona G1-C, similar a una oxidasa alterna 1b de *Arabidopsis thaliana*).

Es muy interesante el hecho de que la síntesis de tres productos génicos mostró una absoluta dependencia de la presencia de quitosano. Los genes que codifican a las clonas G1 y G2 se encuentran apagados en los tejidos de la planta adulta y en los callos cultivados en condiciones normales, pero la síntesis del transcrito ocurre cuando los callos son incubados con la concentración de quitosano empleada en este estudio. Por otro lado, el gen que codifica a la clona G1-C se encuentra normalmente tanto en los tejidos de planta adulta como en los callos bajo condiciones normales, pero su expresión casi se abate en los callos cuando éstos se incuban con la solución de quitosano. Aún cuando los otros productos génicos no muestran una dependencia por la presencia de quitosano, es interesante que sí se observa una modificación ante la presencia de las soluciones control, que contienen ácido clorhídrico y fueron aplicadas al vacío, sugiriendo un posible papel en respuesta al estrés abiótico.

Aún cuando en el presente estudio no se analizaron las funciones de los productos de estos genes durante la interacción de la planta completa con microorganismos patógenos, existen reportes en los cuales se han estudiado secuencias similares de otras especies y se han mostrado evidencias de su papel durante la interacción planta-patógeno. Por ejemplo, a la fecha se desconoce el mecanismo mediante el cual el gen *Ve* media el establecimiento de la resistencia en la planta. Sin embargo, debido a que diferentes especies del género *Verticillium* están presentes de manera constante en el xilema de plantas resistentes, los autores especulan que la proteína de resistencia *Ve* podría ejercer su actividad en células del parénquima cercanas al xilema. Esta especulación se refuerza por los trabajos reportados por Mes y colaboradores (2000), donde demuestran la expresión de este gen en células del parénquima de *Lycopersicon esculentum* resistente a *Fusarium oxysporum*.

Por otra parte, las cinasas tipo receptor (RLK) son proteínas transmembranales que ligan señales a través de su dominio extracelular rico en repeticiones de leucina (LRR) y propagan la señal vía el dominio intracelular de cinasa. Se sabe que ciertos RLK están involucrados en diferentes niveles de la interacción planta-patógeno; el receptor *Xa21* de *Oryza sativa* está involucrado en la resistencia específica (host resistance) contra un patotipo de la bacteria *Xanthomonas oryzae* (Song *et al.*, 1995), mientras que el receptor *FLS2* de *Arabidopsis* es responsable de la resistencia no específica (non-host resistance) contra diversas especies de bacterias, mediante la percepción de la flagelina (Gomez-Gomez and Boller, 2000).

Por otro lado, se sabe que durante la interacción de las plantas con sus patógenos asociados se ha observado un incremento de proteínas ricas en prolina asociadas con la fortificación de la pared celular (Showater *et al.*, 1985). Es por esto que aún cuando para la clona G7 no se observa un incremento significativo ante la adición de quitosano, no puede descartarse que pudiese estar participando en la fortificación de la pared celular.

Se observó que el quitosano induce una disminución de los niveles de transcrito de una oxidasa alterna (clona G1-C), además de un incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno. Un incremento en el nivel de peróxido de hidrógeno como respuesta al quitosano ya había sido demostrado por Lin y colaboradores (2005) en arroz. También, Popov y colaboradores (1997) encontraron una correlación entre la inhibición de la actividad de la oxidasa alterna y el incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno. Por otra parte, Amirsadeghi y colaboradores (2006) demostraron que la carencia de la oxidasa alterna en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* se correlacionó con un incremento en los niveles de transcritos de la superóxido dismutasa, de la catalasa y de la ascorbato peroxidasa, enzimas involucradas en la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno. El incremento de los niveles de peróxido de hidrógeno es uno de los eventos que se desencadenan durante la respuesta de hipersensibilidad (HR) en la interacción planta-patógeno.

La elicitación de callos de *Cocos nucifera* cultivados *in vitro* permitió la identificación de genes expresados diferencialmente, cuyos genes ortólogos tienen funciones claramente definidas durante el establecimiento de los sistemas de defensa, por ello es posible suponer que los genes de cocotero podrían tener funciones similares y que por lo tanto, el sistema de elicitación con quitosano constituye una alternativa para la identificación de moléculas que pudieran estar implicadas en la interacción planta-patógeno en cocotero.

Aun cuando se han detectado moléculas con un posible papel en los eventos de defensa en callos de cocotero, no es posible establecer una extrapolación de estos resultados a plantas de cocotero, esto se debe a que los callos son tejidos desdiferenciados y a que en ellos puede existir variación somaclonal, la cual involucra todas las formas de variantes de plantas regeneradas a partir del cultivo de tejidos (Larkin and Scowcroft, 1981; Jain *et al.*, 1998a; Jain and De Klerk, 1998). Entre estas variaciones podemos encontrar: i) cambios físicos y morfológicos en callos no diferenciados; ii) diferencias en la habilidad de organizarse y formar órganos *in vitro*; iii) cambios cromosomales. Por su parte plantas regeneradas a partir de callos no organizados tienen una mayor variación sobre aquellos generados a partir de callos organizados, mientras que una nula o muy poca variación ocurre cuando las plantas son regeneradas directamente sin una fase intermedia de generación de callos (Bouman and De Klerk, 1996). Una forma de hacer compatible estos resultados, sería evaluar los genes reportados en este trabajo en plantas de cocotero cultivadas *in vitro* retadas con quitosano así como también con hongos para los cuales se ha reportado que causan enfermedades en este cultivo tal como: *Phytophthora palmivora*, *Endoconidiophora paradoxa*, *Pestalotia palmarum*, *Botryodiplodia theobromae*, *Phyllacora torrendiella* y *Botryosphaeria cocogena*.

4.3 El ácido salicílico y el jasmonato de metilo modifican diferencialmente la abundancia de los transcritos identificados tras el tratamiento con quitosano de callos de *Cocos nucifera*.

Como se demostró en el capítulo III, el quitosano modifica los niveles de transcritos de G1, G2 y G1-C. Por otro lado, se sabe que el SA y el JA juegan un papel importante en los mecanismos de transducción de las señales involucradas en el establecimiento de las respuestas de defensa ejerciendo un papel en la modificación a nivel transcripcional. Así, también se ha demostrado que el establecimiento de algunos mecanismos de defensa no está mediado por estas moléculas y al parecer, el establecimiento de la defensa se da por rutas alternas de señalización. Bajo las condiciones de los ensayos realizados en este trabajo, G1 y G2 son inducidos por SA. La inducción de receptores tipo cinasa por SA en *A. thaliana* ha sido evidenciada en trabajos de Ohtake y colaboradores (2000); sin embargo, a la fecha, no existe reporte alguno de la inducción del gen *Ve* mediante SA.

Dentro de los eventos tempranos en el establecimiento de los mecanismos de defensa se encuentra el incremento de especies reactivas de oxígeno. Ante este aumento la célula cuenta con mecanismos de desintoxicación. La participación de moléculas mitocondriales encargadas de la desintoxicación de estas moléculas se ha evidenciado mediante la participación de oxidasas alternas mitocondriales. Sin embargo, para que ocurra un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, los mecanismos de desintoxicación deben disminuir, tal es el caso de los resultados presentados por Popov y colaboradores (1997), en donde la inhibición de oxidasas alternas estimula la producción de peróxido de hidrógeno. En nuestros ensayos la aplicación de SA induce la disminución de los niveles de transcritos para la clona G1-C, mismo efecto que se observó ante la aplicación de quitosano. Aunado a esto, se observó un incremento en los niveles de peróxido de hidrógeno a las dos horas posteriores al tratamiento con quitosano. Estas evidencias experimentales permiten proponer que la oxidasa alterna mitocondrial podría estar involucrada en los eventos tempranos de la interacción planta-patógeno. La adición de JA no indujo cambios en los niveles de transcritos para estos dos genes, aún cuando hay reportes de que el JA induce genes del tipo RLK (Sun *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en esta tesis apuntan hacia una regulación de estos genes posiblemente vía SA pero no de JA en la respuesta inducida por el quitosano en los callos del cocotero. Mientras que SA induce la acumulación de los transcritos G1 y G2, por otro lado, induce la disminución del transcrito G1-C. Este efecto no ocurre al aplicar JA, lo cual sugiere que SA pudiera participar en el establecimiento de las respuestas de defensa en callos de *C. nucifera* L.

Finalmente, en la figura 4.1 se representa de manera esquemática los resultados del presente estudio, relacionados con los diferentes eventos bioquímicos y moleculares activados por el quitosano en los callos de cocotero.

Es probable que la percepción del quitosano en callos de cocotero sea mediada por receptores asociados a la membrana celular. Esta hipótesis es fundamentada por el hecho de que en trabajos realizados en frijol (Felix, 1998) y en jitomate (Bradley, 2001) se muestran evidencias de la existencia de receptores para el quitosano; estos

autores sugieren que la unión del quitosano a receptores unidos a la membrana plasmática es indispensable para la inducción de las respuestas de defensa.

Tras la adición de quitosano, se observa una serie de cambios en diferentes eventos relacionados con la respuesta de defensa. Como se reportó por Lizama *et al.* (2007), el presente sistema de elicitación induce la activación de una MAPK de 46 kDa, a los 5 minutos de exposición. La rápida activación de esta ruta de transducción de señales sugiere que éste es un evento primario en la señalización del quitosano, lo que significaría que la acumulación de peróxido de hidrógeno, la activación de proteínas PR (β -1,3-glucanasa) y la activación transcripcional de genes relacionados con la defensa podrían estar bajo la influencia de las MAPK. Sin embargo, se ha demostrado también que las proteínas MAPKs son activadas por el peróxido de hidrógeno en plantas, lo cual lleva a la modulación en la expresión génica (Kamata y Hirata, 1999; Zwerger y Hirt, 2001; Torres y Forman, 2003). Ahora bien, no sabemos si en nuestro modelo el peróxido de hidrógeno tiene algún efecto sobre la activación de las MAPK o viceversa (Hancock *et al.*, 2001), por lo que se requiere realizar experimentos adicionales para demostrar si existe una dependencia directa entre ambos eventos celulares.

Con respecto a las modificaciones en la expresión génica, el presente modelo permitió identificar y aislar, como resultado de un análisis no exhaustivo, un número de genes cuya participación en la defensa contra patógenos es apoyada de manera indirecta por al menos dos factores; i) sus correspondientes secuencias nucleotídicas tienen similitud con las secuencias de ortólogos de otras especies, para los cuales sí se ha demostrado la participación y relevancia en la defensa; ii) por otro lado, la exposición de los callos al ácido salicílico modifica la expresión de dichos genes de manera similar a como lo hace el quitosano, pero no así la incubación con jasmonato de metilo. Estos datos sugieren que las funciones de los correspondientes productos génicos podrían estar más relacionadas con el estrés biótico que con el abiótico, algo que también deberá ser demostrado con experimentos adicionales.

4.3 Bibliografía

- Arlorio M, Ludwig A, Boller T, Bonfante P** (1992) Inhibition of fungal growth by plant chitinases and β -1,3-glucanases. A morphological study. *Protoplasma* **171**: 34–43.
- Benhamou N** (2004) Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: A comparison with the effect of chitosan. *Phytopathology* **94**, 693–705.
- Benhamou N, Lafontaine PJ and Nicole M** (1994) Seed treatment with chitosan induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. *Phytopathology* **84**, 1432–1444.
- Benhamou N, Joosten MH, De Wit PJGM** (1990) Subcellular localization of chitinase and its potential substrate in tomato root tissues by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici*. *Plant Physiology* **92**: 1108–1120.
- Boller T** (1995) Chemoreception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 189–214.
- Bouman H, De Klerk GJ** (1996) Somaclonal variation in biotechnology of ornamental plants. In: Geneve R, Preece J, Merkle S, editors. *Biotechnology of ornamental plants*. UK: CAB International; p. 165–83.
- Bradley Day, Mitsuo Okada, Yuki Ito, Koji Tsukada, Habib Zaghouni, Naoto Shibuya and Gary Stacey** (2001) Binding Site for Chitin oligosaccharides in the Soybean Plasma Membrane. *Plant Physiol.* **126**: 1162–1173.
- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA** (2000) Induced and preformed antimicrobial proteins. In: Slusarenko A, Fraser RSS, Loon LC, eds. *Mechanisms of resistance to plant diseases*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 371–477.
- Felix G, Baureithel K, Boller T** (1998) Desensitization of the perception system for chitosan fragments in tomato cells. *Plant Physiol.* **117**: 643–50.
- Inglis GD and Kawchuk LM** (2002) Comparative degradation of oomycete, ascomycete, and basidiomycete cell walls by mycoparasitic and biocontrol fungi. *Can. J. Microbiol.* **48**: 60–70.
- Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS** (1998) Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Acad. Publ.; p. 603.
- Jain SM, De Klerk GJ** (1998) Somaclonal variation in breeding and propagation of ornamental crops. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* **4**(2):63–75.
- Jean-Stéphane Venisse, Gabor Gullner², and Marie-Noëlle Brisset (2001)**
Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiol.* **125**: 2164–2172.
- Kamata H and H Hirata** (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.* **11**: 1-14.
- Lafontaine PJ and Benhamou N** (1996) Chitosan treatment: an emerging strategy for enhancing resistance of greenhouse tomato plants to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Biocontrol. Sci. Technol.* **6**, 111–124.
- Larkin PJ, Scowcroft WR** (1981). Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* **60**: 17–214.

- Lizama Gabriel, Estrada Ivan, Caamal Goretty, Souza Ramon, Oropeza Carlos, Islas Ignacio, Zúñiga José** (2007) Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. **70**: 130-141.
- Mauch F, Staehelin A.** (1989) Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell* **1**: 447-457.
- Torres M and HJ Forman** (2003) Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors*. **17**: 287-296.
- Toyoda H, Matsuda Y, Yamaga T, Ikeda S, Morita M, Tamai T, Ouchi S.** (1991) Suppression of the powdery mildew pathogen by chitinase microinjected into barley coleoptile epidermal cells. *Plant Cell Rep.* **10**: 217-220.
- Trotel-Aziz P, Couderchet M, Vernet G and Aziz A** (2006) Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol* **114**, 405-413.
- Vander P, Varum KM, Domard A, El Gueddari NE, Moerschbacher BM.** (1998) Comparison of the ability of partially *N*-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.* **118**: 1353-1359.
- Wayne A Mackay, Timothy J Ng, Freddi A Hammerschlag** (1994) *Cucumis melo* L. Callus Response to Toxins Produced by *Myrothecium roridum* Tode ex. Fries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **119**(2):356-360.
- Zwenger K and H Hirt** (2001) Recent advances in plant MAP kinase signalling. *Biol Chem.* **382**: 1123-1131.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

En la actualidad, el conocimiento generado sobre la resistencia del cocotero contra cualquier microorganismo patógeno es prácticamente inexistente. Entre otras razones se encuentra el largo ciclo de vida, la gran talla de la planta adulta y la recalcitrancia al cultivo de tejidos. Como prueba de lo anterior, se puede mencionar el hecho de que hasta la fecha ningún laboratorio ha podido establecer un cultivo de células en suspensión de cocotero.

Debido a lo anterior, tampoco se ha logrado implementar programas fitosanitarios eficientes, por lo que las plantaciones están expuestas a diversas enfermedades, algunas de ellas devastadoras, como el amarillamiento letal.

Por ello, en el presente trabajo se planteó evaluar la factibilidad de identificar y caracterizar genes de defensa del cocotero, mediante la implementación de un modelo *in vitro*, tomando ventaja de la experiencia desarrollada recientemente en el cultivo de tejidos en esta especie.

Con base en los resultados obtenidos de los diferentes experimentos realizados, en este trabajo es posible concluir que:

1. La adición de quitosano a callos de *C. nucifera* L. var Alto del Atlántico en una concentración de 10 mg mL^{-1} durante 20 minutos, es suficiente para incrementar la actividad de β -1,3-glucanasas e inducir la producción de peróxido de hidrógeno. Esto sugiere que estas condiciones experimentales son adecuadas para elicitar la respuesta de defensa.
2. La adición de quitosano modifica diferencialmente los niveles de transcritos en callos de *C. nucifera* L. Las secuencias nucleotídicas de algunos transcritos muestran altos niveles de similitud con genes de defensa estudiados en otras especies.
3. Con el presente modelo se pudo determinar que algunos genes son regulados con relativa especificidad por la adición exógena de quitosano y de ácido salicílico, pero no por el jasmonato de metilo. Debido a que los dos primeros compuestos están más relacionados con las respuestas de defensa contra factores bióticos y el tercero con las respuestas contra factores abióticos, es probable que los genes identificados tengan una relación con las respuestas de defensa contra patógenos. Sin embargo, esto debe ser verificado con otro tipo de experimentos.
4. Finalmente, un análisis global de los resultados obtenidos permite sugerir que el sistema de elicitación en callos cultivados *in vitro*. sí permite el establecimiento de las respuestas de defensa en *C. nucifera* L.

CAPITULO VI. PERSPECTIVAS

Las plantas están en continua interacción con organismos de su entorno, durante estas interacciones éstos pueden actuar como patógenos y causar diversas enfermedades en su hospedero. Este hecho ha originado cuantiosas pérdidas en diversos cultivos de importancia económica. El estudio de los mecanismos con los cuales las plantas contienden ante los patógenos ha llevado a establecer las bases para futuras aplicaciones en el contexto de la de interacción planta-patógeno en cultivos de interés.

Cocos nucifera L. es un cultivo de importancia económica en los trópicos, el mismo ha sufrido una severa devastación por enfermedades causadas por microorganismos. En el presente trabajo hemos establecido un sistema para estudiar la interacción planta-patógeno en este cultivo. Los resultados obtenidos pueden constituir la base para futuros trabajos cuyas perspectivas se enlistan a continuación.

1. **EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN EL SISTEMA PROPUESTO, EMPLEANDO UN MAYOR NÚMERO DE CEBADORES.** Los resultados presentados aquí fueron obtenidos empleando cuatro diferentes combinaciones de cebadores, porque el objetivo era evaluar si con el modelo experimental propuesto era factible el estudio de la respuesta de defensa del cocotero y la identificación de genes de defensa. Las evidencias sugieren que lo anterior es posible, por ello, ahora puede implementarse un estudio exhaustivo, con un juego extenso de cebadores, para un análisis completo de las modificaciones en la expresión génica y poder tener un panorama más amplio de los eventos que se están estableciendo.
2. **USO DE OTROS INDUCTORES O DE MICROORGANISMOS COMPLETOS.** Dado que los ensayos realizados se llevaron a cabo utilizando un inductor general de las respuestas de defensa ante patógenos, puede evaluarse si los transcritos identificados se expresan de manera diferencial cuando los callos de *C. nucifera* sean incubados con microorganismo tales como hongos y/o bacterias, e inclusive con inductores derivados de ellos. Esto permitiría conocer la especificidad en la expresión de dichos genes de acuerdo con el tipo de microorganismo, o si estos genes se inducen de manera general ante un estrés biótico.
3. **ESTUDIO DE LAS FUNCIONES INDIVIDUALES DE LOS GENES IDENTIFICADOS.** Si bien los genes aislados no son numerosos, su identificación permite establecer protocolos experimentales para estudiar sus respectivas funciones en la defensa contra patógenos en cocotero.
4. **USO COMO MARCADORES MOLECULARES DE RESISTENCIA.** Es sabido que la variedad de cocotero Enano Malayo presenta más tolerancia contra algunas enfermedades que la variedad Alto del Atlántico; sin embargo, la segunda tiene un valor comercial más alto. Los genes identificados en este trabajo, así como los que puedan ser identificados posteriormente, pueden ser utilizados para

determinar si sus niveles de expresión correlacionan con los niveles de tolerancia en las diferentes variedades de cocotero cultivadas en nuestro país.

Apéndice 1

Secuencias reportadas en la base de datos NCBI.

AM167527

1 ggtggaaga aagataagat gttggtgagc tactggggga tggcgcccgc
caaggtcgtc
61 aaagaggacg gcaccgagtg gaagtggcca tgttttaagc catgggattc
atacacatcg
121 aaccagtcga tcgatctcca caagcaccac gtaccaatga cgtgggggtga
aaaactggct
181 tattggatcg gt

AM076490

1 atgctgggga aaatttctac actcggcgtc cttgttttgc ggtccaatga
attctatggc
61 catgttgac ctccccagg aaacgatgga agcaattaca cattcgagat
gctgcagata
121 tttgatctgt cttccaaca cttcaccggc agcttaccct ccgaatgctt
taagaatcta
181 aaagccctga aggttaatcc agacttgaat acggtggtt ataggtaacct
ggagttgagc
241 aatcatcct actatcagaa cagcatcaca gtcacaagca aagggctggt
gatgacgcta
301 gtgaagatcc tgacgatctt cacatccatt gatttttcca gtaatcactt
cgaagggtggc
361 atcccggagg tgattgggga actcaattca ctgggtggtgc tgaacatgct
gcacaatgct
421 cttacaggtg aatccctcc tcagcttggg aacctgctgc agctcgagtc
tttggatcta
481 tcttcaaag acctctctgg cgagattccc cagcat.

AM076489

1 aatgctgggg aaggggagcc tagggacggt gtaccgggcg gtgctggagg
acgggtgcat
61 ggtggcggtg aagcggctca aggacgcaa tcctgcgcc cgcgccgact
tccacaagta
121 catggatctc atcggccggc tgcgccatcc caacctcgtc cgctccagg
cctactatta
181 cgccaagcag gagaagctcc tcatctacga ctacctccc agcat

AM167529.

1 atgctgggga tgctggtgga aggaggtgca gacaatgtca accaatgctt
tctagaagct
61 tcacgctttg ggagtacaga acttgtgctc attttgcttc agattgctca
gaggaacagc

121 ttggatgtgg atgttgatct tgccttggc tttgcatccc actactgtaa
gattggaacc
181 atggattgct tggttgaaga ggggaatgct ggggccttcc tgggccctct
gatgcgagct
241 gctgagcgag ggtgtatgca agttgtccag tggtttgtcg accggggatg
cagggacatg
301 gagctctgtc ttgcgctcac tgcagccacc tccagcagcc aggtgggcgt
cgctgggtat
361 ctctcccc

AM167526

1 agcaccgtcc agtttgttga ctgggtgtcct actggcttca agtgtggcat
caactatcag
61 ccaccactg tggttcctgg tggggatcct gccaaaggctc agagggcagt
ttgcatggtc
121 tccaactcca ccagtgttgc tgaagtgttc tctcgcattg atcacaagtt
tgatctcatg
181 tatgcgaagc gtgcatttgt gcaactggat gttggtgagg gcatggagga
gggagagttc
241 tcggaggctc gtgaggatct tgccgcattg gagaaggatt atgaggaggt
tgggtgctgag
301 tctgctgagg atgaggacgg tgcttttagtg agggttaata atcac

AM167528

1 agcaccgtcc ttaactcctg gaagatgagg ataaaggctc tattggacgc
ggcgaggggc
61 atcgaatacc tccacaacta cgccgtaccg cggatcatcc acagagacat
caaatcgctg
121 aacatcctcc tcgacgggaa ctgggtggcg aggggtgctcg acttcgggct
gtcgtgatg
181 gagccggagt cggacagcgg gcacctctcg atgagggcgg cggggacggt gctt



Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L.

Gabriel Lizama-Uc^{a,1,2}, Iván A. Estrada-Mota^{a,2}, María Goretty Caamal-Chan^a,
Ramón Souza-Perera^a, Carlos Oropeza-Salín^b, Ignacio Islas-Flores^a,
José Juan Zúñiga-Aguilar^{a,*}

^aUnidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plasmata, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., calle 43 no. 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida 97200, Yucatán, México

^bUnidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México

Accepted 18 August 2007

Abstract

As the study of coconut defense responses against pathogenic microorganisms is hampered by the absence of suitable model systems, we investigated if imbibition of coconut calli with chitosan could be used *in vitro* to simulate the molecular interactions that occur with pathogens. Our results showed that calli imbibition with 10 mg mL⁻¹ chitosan caused the accumulation of hydrogen peroxide, and stimulated a β -1,3-glucanase activity with an RF near 0.1. In addition, in-gel kinase assay and specific immunoblotting showed that a ~46 kDa MAPK-like protein was activated shortly after elicitation, and remained in this state for at least 80 min. Chitosan addition also differentially modified the expression of some genes, whose DNA sequence showed high similarities to receptor-like kinases (RLKs), *Verticillium*-like protein, and mitochondrial alternate oxidase 1b. Addition of salicylic acid to the calli also modified transcript abundance for these genes, while methyl jasmonate did not seem to influence their expression, implying that they could be involved in defense responses. These results strongly suggest that elicitation of coconut tissues cultivated *in vitro* constitutes a suitable alternative to characterize both biochemical and molecular interactions that occur between the coconut palm and its associated pathogens.
© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Cocos nucifera* L.; Differential display; Chitosan; Plant-pathogen interaction

1. Introduction

Coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is an ecologically and economically important species in the tropics. Unfortunately, this palm is subject to attack by several disease-

producing agents, including viruses [1], viroids [2], mollicutes [3], protozoa [4], fungi [5], and nematodes [6]. Some diseases become epidemic, e.g., in the recent years, the "Atlantic Tall" variety has been almost totally eliminated from the coasts of the Yucatan Peninsula and its abundance diminished along the Gulf of Mexico because of the Lethal Yellowing (LY) disease [7]. Even though there are many epidemiological studies for this and other coconut diseases, the basic physiology of coconut-pathogen interaction is poorly understood. In addition, there are no data regarding the coconut's biochemical resistance/susceptibility to pathogens, nor have the genes involved in the establishment of disease resistance been identified. Some factors that traditionally restrict these analyses include the coconut's long life cycle, the large size of the whole palm, and the lack of an efficient *in vitro* propagation system.

Abbreviations: MAPK, mitogen-activated protein kinase; MBP, myelin basic protein; AOX, mitochondrial alternative oxidase; SA, salicylic acid; MeJA, methyl jasmonate; NO, nitric oxide; ROS, reactive oxygen species; AC, activated charcoal; TTC, 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride; dp, degree of polymerization; SN, supernatant; RT, room temperature.

*Corresponding author. Tel.: +52 999 981 3921; fax: +52 999 981 3900.

E-mail address: zuniga@ccicy.mx (J.J. Zúñiga-Aguilar).

¹Present address: Instituto Tecnológico Superior del Sur del Estado de Yucatán, Carretera Muna-Felipe Carrillo Puerto, tramo Oxtutzab-Akai, Yucatán, México.

²Both authors contributed equally to this work.

0885-5765/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.pmpp.2007.08.001

