



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.  
Posgrado en Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN DE GENES TIPO  
*THESEUS1* EN LOS CULTIVOS  
TROPICALES DE PLÁTANO (*Musa  
acuminata*) Y PAPAYA (*Carica papaya*), Y  
SU RELACIÓN CON LA MUERTE CELULAR  
PROGRAMADA**

Tesis que presenta

**ÁNGELES GUADALUPE MAYORGA LÓPEZ**

Opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS  
(Ciencias biológicas: Opción Biotecnología)**

Mérida, Yucatán, México  
Junio 2013







## RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado: "Caracterización de genes tipo *THESEUS1* en los cultivos tropicales de plátano (*Musa acuminata*) y papaya (*Carica papaya*), y su relación con la muerte celular programada" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Santy Peraza Echeverría, dentro de la opción Biotecnología perteneciente al programa de Maestría del Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

---

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC



## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



---

Ángeles Guadalupe Mayorga López



## **AGRADECIMIENTOS**

A mi director de tesis el Dr. Santy Peraza Echeverría, primero que nada por permitirme ser parte de su grupo de investigación, gracias a la confianza brindada, por darme la libertad de explotar al máximo la curiosidad, creatividad y el pensamiento crítico que como futura investigadora requiero. Por sus aportaciones al proyecto estos 2 años de trabajo arduo en los cuales la retroalimentación fue de gran ayuda para mí, motivándome a fortalecer mi formación como científico y como persona

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

Tan importante agradecer también a mi comité tutorial conformado por el Dr. Jorge Manuel Santamaria Fernández y al Dr. Víctor Manuel Suárez Solís, quienes en conjunto con mi asesor cuestionaron mi trabajo positivamente en cada evaluación.

A mi comité de revisión de tesis, al Dr. Jorge Manuel Santamaria Fernández, Dr. Víctor Manuel Suárez Solís, Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia y a la Dra. Luisa Alhucema López Ochoa. Por emplear parte de su tiempo para la revisión de esta tesis.

Al Dr. Amit Dhingra de la Washington State University por aceptar ser mi asesor durante mi estancia de intercambio estudiantil y brindarme la atención necesaria para realizar mi trabajo en su laboratorio de una manera muy atenta.

A la Q.B.A Ileana Borgues Arguez por su apoyo técnico y atención brindada para la realización de este proyecto. Reconozco que tu ayuda hizo la diferencia para poder concluir en tiempo mi proyecto, siempre tuviste tiempo para enseñarme y aclarar mis dudas.

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 314001) otorgada para los estudios de maestría, así como al financiamiento del proyecto de CONACYT Ciencia Básica 106289 otorgado para la realización de este proyecto.

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

A mis compañeros del laboratorio de cultivos tropicales y microalgas, Miguel Ángel, Rodrigo, Roberto, Luis Ernesto, María Eugenia, Melissa, Merly Adilene, Anayeli, Patricia, Alejandra, Margarita, Shirley y Laura por hacerme sentir muy contenta en mi área de trabajo con sus conversaciones, comidas y salidas a pasear, gracias por haberme brindado tan sencillamente su amistad.

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

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

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

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

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

Finalmente a Dios por ser mi guía y darme la capacidad para obtener otro logro más en mi carrera.

A todos les doy mi más sincero agradecimiento.

## DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada con mucho amor y esfuerzo a mi madre Gloria López Salinas, la persona que ha sido mi razón de ser, porque siempre has tenido una sonrisa para mí desde el momento en que nací. Tu amor, comprensión y apoyo incondicional son los sentimientos que llevaré grabados en mi corazón por siempre.



## CONTENIDO

Resumen.....	1
Abstract.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO I.....	9
1.1 ANTECEDENTES GENERALES .....	9
1.1.1 Origen e historia de los cultivos tropicales de plátano y papaya .....	9
1.1.2 Biología y clasificación taxonómica del plátano y papaya .....	11
1.1.3 El plátano y la papaya como cultivos agrícolas .....	16
1.1.4 Producción de plátano y papaya a nivel mundial .....	20
1.1.5 Producción de plátano y papaya en México.....	22
1.1.6 Problemáticas de la producción: aspectos de patógenos y plagas.....	25
1.1.7 Biotecnología aplicada a los cultivos de plátano y papaya.....	28
1.1.8 El sistema inmune de las plantas .....	30
1.1.9 La respuesta hipersensible: un tipo de muerte celular programada para combatir el ataque de patógenos .....	32
1.1.10 La resistencia sistémica adquirida: una resistencia de amplio espectro para combatir el ataque de patógenos.....	37
1.1.11 Rutas de señalización en los mecanismos de defensa de plantas .....	38
1.1.12 La proteína de resistencia PTO como un modelo de estudio de la interacción planta-patógeno y de la respuesta hipersensible .....	42
1.1.13 Evolución de PTO .....	46
1.1.14 Sobreexpresión de PTO en plantas transgénicas.....	47
1.1.15 Genes mutantes de PTO que activan la muerte celular .....	48
1.1.16 Clonación de homólogos de PTO en otras especies de plantas .....	50
1.1.17 El gen <i>THESEUS1</i> en el desarrollo y su posible papel en la defensa contra patógenos y muerte celular.....	52
1.1.18 Estrategias de ingeniería genética para desarrollar resistencia a patógenos en plantas mediante la inducción de la muerte celular programada.....	58
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	61
1.3 HIPÓTESIS.....	62
1.4 OBJETIVOS.....	62

1.4.1 General.....	62
1.4.2 Particulares.....	62
1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	63
1.6 BIBLIOGRAFÍA.....	64
CAPÍTULO II.....	75
2.1 INTRODUCCIÓN.....	75
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
2.2.1 Identificación de secuencias homólogas a <i>THESEUS1</i> en el genoma de plátano y papaya.....	78
2.2.2 Obtención de los marcos de lectura abierto y la determinación del porcentaje de identidad.....	78
2.2.3 Alineamiento múltiple de secuencias tipo <i>THESEUS1</i> de plátano y papaya.....	79
2.2.4 Modelaje por homología de la estructura tridimensional de las secuencias tipo <i>THESEUS1</i> de plátano y papaya.....	79
2.2.5 Análisis filogenético.....	79
2.2.6 Análisis de hidrofobicidad.....	80
2.2.7 Evaluación del dominio de activación en secuencias tipo <i>THESEUS1</i> de plátano y papaya.....	80
2.3 RESULTADOS.....	81
2.3.1 Identificación de secuencias homólogas a <i>THESEUS1</i> en plátano y papaya....	81
2.3.2 Obtención de los marcos de lectura abierto y determinación del porcentaje de identidad.....	83
2.3.3 Alineamiento múltiple de secuencias de plátano y papaya.....	88
2.3.4 Modelaje por homología de la estructura tridimensional de las secuencias tipo <i>THESEUS1</i> de plátano y papaya.....	92
2.3.5 Análisis filogenético.....	93
2.3.6 Análisis de hidrofobicidad.....	95
2.3.7 Análisis del sitio de activación de secuencias tipo <i>THESEUS1</i> de plátano y papaya.....	96
2.4 DISCUSIÓN.....	98
2.5 BIBLIOGRAFÍA.....	103
CAPÍTULO III.....	109
3.1 INTRODUCCIÓN.....	109

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	111
3.2.1 Material vegetal.....	111
3.2.2 Síntesis química de la secuencia MaTHE1 de plátano.....	111
3.2.3 Extracción de ácidos nucleicos de papaya.....	112
3.2.4 Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría.....	113
3.2.5 Síntesis de ADN complementario.....	114
3.2.6 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para papaya.....	114
3.2.7 Clonación del gen <i>CpTHE1</i> de papaya en el vector pGEM-T-easy.....	115
3.2.8 Secuenciación.....	116
3.2.9 Análisis Bioinformático.....	117
3.2.10 Mutagénesis de <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> de papaya.....	117
3.2.11 Subclonación de los fragmentos <i>MaTHE13::NOS</i> , <i>mathe1</i> <sup>Y627D</sup> ::NOS y el promotor Ubiquitina-1 en el vector de expresión pCAMBIA2200.....	120
3.2.12 Subclonación de los fragmentos <i>CpTHE1</i> y <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> en el vector de expresión pCAMBIA 2200::35S::NOS.....	122
3.2.13 Micropropagación de plantas de plátano.....	123
3.2.14 Transformación temporal de los genes <i>MaTHE1</i> WT y <i>CpTHE1</i> WT y sus versiones mutantes <i>mathe1</i> <sup>Y627D</sup> y <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> , en hojas de plátano y papaya.....	124
3.2.15 Evaluación del fenotipo de las hojas transformadas con los genes <i>MaTHE1</i> y <i>CpTHE1</i> y sus versiones mutantes <i>mathe1</i> <sup>Y627D</sup> y <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> en hojas de plátano y papaya.....	125
3.3 RESULTADOS.....	127
3.3.1 Aislamiento de ácidos nucleicos.....	127
3.3.2 Amplificación de los genes <i>CpTHE1</i> a partir de ADNc de papaya.....	128
3.3.3 Clonación del fragmento correspondiente al dominio de cinasa de <i>CpTHE1</i> de papaya.....	128
3.3.4 Alineamiento de la ORF <i>CpTHE1</i> del cv Maradol con la ORF <i>CpTHE1</i> del cv SunUp.....	129
3.3.5 Análisis de restricción de la secuencia <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> .....	131
3.3.6 Alineamiento de la secuencias mutante <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> con la secuencia silvestre <i>CpTHE1</i> .....	132
3.3.7 Subclonación de los fragmentos <i>MaTHE1::NOS</i> y <i>mathe1</i> <sup>Y627D</sup> ::NOS de plátano en el vector de expresión pCAMBIA2200::Ubi-1.....	134

---

3.3.8 Subclonación de los fragmentos <i>CpTHE1</i> WT y <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> en el vector de expresión pCAMBIA 2200 35S::NOS.....	135
3.3.9 Evaluación de fenotipo de hojas de plátano cv. Enano Gigante transformadas temporalmente con las construcciones de expresión <i>MaTHE1</i> y su versión mutante <i>mathe1</i> <sup>Y627D</sup> .....	136
3.3.10 Evaluación de fenotipo de la transformación temporal de hojas de papaya cv Maradol con los genes <i>CpTHE1</i> y su versión mutante <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> .....	139
3.4 DISCUSIÓN.....	146
3.5 BIBLIOGRAFÍA.....	152
CAPÍTULO IV.....	157
4.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	157
4.2 CONCLUSIONES.....	161
4.3 PERSPECTIVAS.....	162
4.4 BIBLIOGRAFÍA.....	165

## LISTADO DE ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
ADNg	ADN genómico
Avr	Gen de avirulencia
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor (Del inglés: Cauliflower Mosaic Virus)
DTT	Ditiotreitol
EFR	Receptor del factor de elongación Tu
ET	Etileno
ETI	Inmunidad activada por efectores (Del inglés: Effector Triggered Immunity)
FLS2	Receptor sensible a flagelina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Superóxido de hidrógeno
ISR	Resistencia sistémica inducida (del inglés: Induced Systemic Resistance)
JA	Ácido jasmónico
Mb	Mega bases
NB-LRR	Repeticiones ricas en leucinas con un dominio de unión a nucleótidos
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub>	Superóxido
Oligo-dT	Oligo deoxitimidina
ORF	Marco abierta de lectura (Del inglés: Open Reading Frame)
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos (Del inglés: Pathogen Associated Molecular Pattern)
Pb	Pares de bases
PCD	Muerte celular programada (Del inglés: Programed Cell Death)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Relacionado con patogénesis (Del inglés: Pathogenesis-Related )
PRR	Receptores de reconocimiento de patógenos (Del inglés: Pathogen Recognition Receptor)
PTI	Inmunidad activada por PAMPs (Del inglés: Pamp Triggered Immunity)
R	Gen de resistencia
RH	Respuesta hipersensible (Del inglés: Hypersensitive Response)
RLK	Receptor tipo cinasa (Del inglés: Receptor Like Kinase)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Del inglés: Reactive Oxygen Species)
RPK	Receptor de proteína cinasa (Del inglés: Receptor Protein Kinase)
SA	Ácido salicílico
SAR	Respuesta sistémica adquirida (Del inglés: Systemic Acquired Response)
Ser/Thr	Serina/treonina
TF	Factor de transcripción (Del inglés: Transcription Factor)
TMV	Virus del mosaico del tabaco

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura de la planta de plátano.....	13
Figura 1.2 Estructura de la planta de papaya .....	15
Figura 1.3 Estadísticas de la producción de plátano a nivel mundial .....	21
Figura 1.4 Estadísticas de la producción de papaya a nivel mundial .....	22
Figura 1.5 Estadísticas de la producción de plátano en México .....	23
Figura 1.6 Estadísticas de la producción de papaya en México .....	24
Figura 1.7 Datos de exportación del cultivo de papaya en el periodo 2000-2008 .....	25
Figura 1.8 Ciclo del desarrollo de la enfermedad de la Sigatoka negra.....	26
Figura 1.9 Modelo de evolución de la resistencia contra microorganismos en plantas.....	31
Figura 1. 10 Respuesta hipersensible presente en plantas monocotiledóneas.....	34
Figura 1. 11 Respuesta hipersensible presente en diversas plantas dicotiledóneas.....	35
Figura 1.12 Mecanismos de defensa involucrados en la respuesta hipersensible.....	37
Figura 1.13 Representación esquemática de las diferentes respuestas a patógenos de las plantas.....	38
Figura 1.14 Interacción entre las diferentes rutas de señalización reguladas por fitohormonas durante la respuesta de las plantas al ataque de patógenos.....	40
Figura 1.15 Clasificación de la familia de receptores de proteínas cinasa (RPKs) involucrados en el desarrollo y resistencia a enfermedades en plantas. ....	41
Figura 1.16 Modelos para el reconocimiento receptor-ligando de receptores tipo cinasa en plantas. A) Xbe3 XB3 es requerido para estabilizar a XA21.....	42
Figura 1.17 Mapa físico de la secuencia de nucleótidos traducida de <i>PTO</i> .....	43
Figura 1.18 Estructura general de los complejos de PTO y sus efectores.....	44
Figura 1.19 Comparación estructural de los complejos AvrPTO <sub>121-201</sub> -PTO y AvrPTO-PT .....	45
Figura 1.20 Ruta de activación de PTO (círculo rojo) a partir de estudios de pérdida de función.....	46
Figura 1.21 Modelo decoy para la inducción de ETI.. .....	47
Figura 1.22 Evaluación de constructos de PTO en combinación con AvrPTO mediante transformación temporal con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . ....	49
Figura 1. 23 Árbol filogenético de Neighbor-joining basado en un alineamiento ClustalX de STKs de <i>Arabidopsis thaliana</i> , la proteína de resistencia PTO de tomate y Pto-RGCs y otras secuencias tipo STK en plátano.....	51
Figura 1. 24 Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen <i>THE1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	54
Figura 1. 25 Papel que desempeña THESEUS 1 (THE1) en el monitoreo de la pared celular.....	55
Figura 1. 26 La relación de receptores cinasa y PTO. ....	56
Figura 1.27 Mecanismo de la posible función de la familia LRK THESEUS1/FERONIA.. .	57
Figura 1. 28 Expresión local en respuesta a <i>Peronospora parasitica</i> pv <i>Cala2</i> .....	59
Figura 1. 29 Uso de la ingeniería genética en la resistencia a enfermedades.....	60

Figura 2.1 Dominios presentes en las secuencias tipo <i>THESEUS1</i> de plátano y papaya...	85
Figura 2. 2 Alineamiento ClustalW de secuencias tipo <i>THESEUS1</i> de plátano. ....	90
Figura 2. 3 Alineamiento ClustalW de secuencias tipo <i>THESEUS1</i> de papaya. ....	92
Figura 2. 4 Modelaje tridimensional de secuencias tipo <i>THESEUS1</i> de plátano y papaya.	92
Figura 2. 5 Árbol filogenético Neighbor-Joining de la familia RLK. ....	94
Figura 2. 6 Dominio de activación de secuencias tipo <i>THESEUS1</i> . ....	97
Figura 3. 1 Alineamiento de la ORF de MaTHE1 predicho <i>in silico</i> de plátano variedad DH-Pahang y la secuencia parcial TgTHE13 obtenida de plátano variedad Tuu Gia.....	111
Figura 3. 2 Alineamiento del dominio cinasa <i>MaTHE1</i> y <i>mathe1</i> <sup>Y627D</sup> de plátano. ....	112
Figura 3. 3 Secuencia de nucleótidos traducida de <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> . ....	118
Figura 3. 4 Reacción bioquímica de peroxidación. ....	126
Figura 3. 5 Extracción de ácidos nucleicos de papaya. ....	127
Figura 3. 6. Resultados de RT-PCR anidada de <i>CpTHE1</i> de papaya Maradol. ....	128
Figura 3. 7 Clonación de la secuencia <i>CpTHE1</i> WT de papaya en el vector pGEM-T-easy..	129
Figura 3. 8 Alineamiento de la ORF de <i>CpTHE1</i> de papaya cv SunUp y las secuencias generadas mediante la PCR anidada de papaya cv Maradol.....	131
Figura 3. 9 Construcción de la secuencia mutante <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> de papaya en el vector pGEM-T-easy.....	132
Figura 3. 10 Alineamiento de la ORF de <i>CpTHE1</i> con la ORF mutante <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> ..	133
Figura 3. 11 Clonación de las secuencias <i>MaTHE1</i> y <i>mathe1</i> <sup>Y627D</sup> de plátano en el vector pCAMBIA 2200::Ubi-1. ....	135
Figura 3. 12 Clonación de las secuencias <i>CpTHE1</i> y <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> de papaya en el vector de expresión pCAMBIA 2200. ....	135
Figura 3. 13 Transformación temporal de hojas de plátano cv Enano Gigante con <i>MaTHE1</i> y <i>mathe1</i> <sup>Y627D</sup> . ....	137
Figura 3. 14 Transformación temporal de hojas <i>in vitro</i> de plátano cv Enano Gigante con <i>MaTHE1</i> y <i>mathe1</i> <sup>Y627D</sup> . ....	138
Figura 3. 15 Transformación temporal de hojas de plátano cv Enano Gigante y papaya cv Maradol con el vector pCAMBIA 1305.1.. ....	139
Figura 3. 16 Transformación temporal de hojas de papaya cv Maradol con <i>CpTHE1</i> y <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> . ....	140
Figura 3. 17 Efecto de la transformación temporal de hojas de papaya cv Maradol <i>CpTHE1</i> y <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> . ....	141
Figura 3. 18 Transformación temporal de hojas de papaya cv Maradol con <i>MaTHE1</i> y <i>mathe1</i> <sup>Y627D</sup> . ....	142
Figura 3. 19 Transformación temporal de hojas de plátano cv Enano Gigante con <i>CpTHE1</i> y <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> . ....	143

---

Figura 3. 20 Expresión temporal de versiones mutantes de los genes *MaTHE1* y *CpTHE1* inducen una respuesta similar a la respuesta hipersensible en hojas de plátano cv Enano Gigante y papaya cv maradol..... 144

Figura 4. 1 Estrategia biotecnológica propuesta para desarrollar resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* en el cultivar comercial de plátano 'Enano Gigante', mediante la activación de la muerte celular programada tipo respuesta hipersensible, utilizando la secuencia *mathe1*<sup>Y627D</sup> fusionada a un promotor inducible a *M. fijiensis*. ..... 163

Figura 4. 2 Estrategia biotecnológica propuesta para desarrollar resistencia a *Colletotrichum gloesporioides* ó al virus de la mancha anular de papaya (PRSV) en el cultivar comercial de papaya 'Maradol', mediante la activación de la muerte celular programada tipo respuesta hipersensible, utilizando la secuencia *cpthe1*<sup>Y393D</sup> fusionada a un promotor inducible a *C. gloesporioides* ó al PRSV..... 164

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1 Resultados de la búsqueda de secuencias homólogas a THESEUS1 en el genoma de <i>M. acuminata</i> variedad DH-Pahang, utilizando el programa TBLASTN.....	82
Cuadro 2. 2 Resultados de la búsqueda de secuencias homólogas a THESEUS1 en el genoma de <i>C. papaya</i> cv SunUp utilizando el programa TBLASTN.....	83
Cuadro 2.3 Tamaño de las secuencias tipo <i>THESEUS1</i> de plátano y papaya.....	84
Cuadro 2. 4 Porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos de THESEUS1 de <i>Arabidopsis</i> y PTO de tomate con las diecisiete secuencias tipo THESEUS1 de plátano.....	86
Cuadro 2.5 Porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos de THESEUS1 de <i>Arabidopsis</i> y PTO de tomate con las nueve secuencias tipo THESEUS1 de papaya. ....	87
Cuadro 2. 6 Resultados del análisis de hidrofobicidad para las secuencias tipo THESEUS1 de plátano, utilizando el programa ProtScale.....	95
Cuadro 2. 7 Resultados del análisis de hidrofobicidad para las secuencias tipo THESEUS1 de papaya, utilizando el programa ProtScale.....	96
Cuadro 3. 1 Oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes tipo <i>THESEUS1</i> de papaya.....	115
Cuadro 3.2 Oligonucleótidos para la mutante <i>cpthe1</i> <sup>Y393D</sup> en papaya variedad maradol.....	119
Cuadro 3. 3 Medios de cultivo para el mantenimiento de plantas de plátano .....	124



**Resumen**

El plátano y la papaya son frutos tropicales que tienen un alto valor nutrimental y su comercio representa una importante fuente de divisas y empleos para México. Actualmente, estos cultivos se encuentran afectados por diferentes enfermedades ocasionadas por patógenos del tipo virus, bacteria, hongo o nemátodo que ocasionan grandes pérdidas a la producción. Una solución ideal para esta problemática sería el mejoramiento genético de las variedades de plátano y papaya que actualmente se cultivan. Una estrategia atractiva para este mejoramiento genético consiste en el uso de genes de resistencia (R), cuyas proteínas son bastante efectivas para proteger a las plantas del ataque de patógenos mediante la activación de una muerte celular programada en el sitio de ataque, también conocida como respuesta hipersensible. Las secuencias genómicas de ambos cultivos ya se encuentran disponibles por lo que dicho conocimiento acelerará el descubrimiento de genes de resistencia. Recientemente, el gen *THESEUS1* de *Arabidopsis thaliana* fue identificado como un sensor de cambios en la pared celular, y se ha sugerido que podría estar involucrado en la resistencia a patógenos.

El objetivo de la presente tesis fue caracterizar *in silico* la estructura de la familia *THESEUS1* de plátano y papaya, así como determinar el papel del dominio de cinasa de estas secuencias en la muerte celular. Se identificaron en el genoma de plátano 17 secuencias (*MaTHE1-MaTHE17*) y en el genoma de papaya 9 secuencias (*CpTHE1-CpTHE9*) tipo *THESEUS1*. El dominio de cinasa de estas secuencias presentó una estructura tridimensional similar a la proteína de resistencia PTO, siendo las secuencias *MaTHE1* y *CpTHE1* las más parecidas a esta proteína R. Esta homología con PTO sugiere una posible función de las secuencias tipo *THESEUS1* de plátano y papaya en la resistencia a patógenos. Mediante mutagénesis sitio-dirigida del codón que especifica para la tirosina del sitio de activación del dominio de cinasa de estas secuencias se pudo determinar que las secuencias *MaTHE1* y *CpTHE1* pueden activar una muerte celular similar a la versión mutante *pto*<sup>Y207D</sup> y de otros genes R. Por lo tanto, las tirosinas presentes en el sitio de activación de las secuencias *MaTHE1* y *CpTHE1* podrían estar actuando como reguladores negativos de la activación de la muerte celular programada. Los resultados de este trabajo han abierto la posibilidad de generar resistencia a las enfermedades que más afectan la producción de plátano y papaya mediante la manipulación de la muerte celular programada tipo respuesta hipersensible.



**Abstract**

Banana and papaya are tropical fruits with high nutritional value and both represent an important commodity for Mexico. Currently, the production of these fruits is affected by numerous diseases caused by virus, bacteria, fungi or nematodes. An ideal solution to these problems is to genetically improve the current cultivars used for the production of these fruits. One attractive strategy to improve these cultivars is by using disease resistance (R) genes, which are quite effective to protect plants against pathogens through the activation of a programmed cell death at the site of pathogen attack, also known as the hypersensitive response. Recently, the banana and papaya genome sequences were published opening a new avenue for the systematic search for disease resistance (R) genes. Recently, the *THESEUS1* gene was identified in *Arabidopsis thaliana* as a sensor of cell wall integrity and might be involved in disease resistance.

The aim of the present thesis was to characterize *in silico* the structure of the *THESEUS1* gene family in banana and papaya, and to determine the role of their kinase domain in programmed cell death. BLAST searches identified seventeen and nine *THESEUS1* like sequences in the banana (*MaTHE1-MaTHE17*) and papaya (*CpTHE1-CpTHE9*) genomes, respectively. The banana and papaya *THESEUS1* protein sequences have all the typical subdomains of serine threonine kinases. The phylogenetic analysis showed that the kinase domain of the banana and papaya *THESEUS1* like sequences are closely related to the kinase domain of the disease resistance protein PTO. This homology with PTO suggests that the banana and papaya *THESEUS1*-like sequences might be involved in disease resistance. Through site-directed mutagenesis in the tyrosine codon of the activation site of *MaTHE1* and *CpTHE1*, and transient expression assays using biolistics in banana and papaya leaves, we were able to determine that these sequences activate a constitutive cell death similar to the *pto*<sup>Y207D</sup> mutant version and other R genes. Hence, these tyrosines are probably working as negative regulators of programmed cell death in *MaTHE1* and *CpTHE1*. This thesis has provided the first insights about the role of *THESEUS1* in a programmed cell death process and paved the way for engineering disease resistance in banana and papaya using the hypersensitive response.



## INTRODUCCIÓN

El plátano (*Musa acuminata*) es una planta herbácea monocotiledónea, que pertenece a la familia Musáceae. Por otra parte la papaya (*Carica papaya*) es una dicotiledónea considerada también una herbácea, que pertenece a la familia Caricaceae. En México ambos cultivos son cosechados principalmente en los estados de Chiapas, Veracruz, Tabasco y Oaxaca (Claridades Agropecuarias, 1999). El plátano y la papaya tienen múltiples usos desde nutricional, ornamental, medicinal entre otras teniendo un amplio mercado a nivel internacional.

Sin embargo, como la mayoría de los monocultivos presentan graves problemas de enfermedades ocasionadas por patógenos del tipo virus, bacteria, hongo o nemátodo. Por ejemplo para el caso de plátano se tiene al hongo *Mycosphaerella fijiensis* que causa la enfermedad foliar de la Sigatoka negra que ocasiona necrosis en la hoja, madurez precoz de los frutos y en etapas avanzadas la muerte de la planta (Churchill, 2010). Por otra parte en papaya se tiene el caso del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* que causa la enfermedad de antracnosis originando manchas necróticas que terminan pudriendo el fruto generando grandes problemas para su comercialización (Zavala *et al.*, 2005). El control de estas enfermedades es costoso debido a los altos insumos requeridos en forma de pesticidas. Una solución ideal a estas problemáticas sería el mejoramiento genético de los cultivares de plátano y papaya que actualmente se usan para el consumo humano. No obstante, dicho mejoramiento aún no se ha logrado utilizando técnicas de mejoramiento genético tradicional. Por lo anterior mencionado, la biotecnología a través de la tecnología del ADN recombinante ofrece múltiples oportunidades para realizar dicho mejoramiento mediante la identificación, manipulación y transferencia de genes específicos que puedan conferir resistencia a las enfermedades que más afectan la producción de plátano y papaya. El resultado esperado es el de nuevas variedades que no requieran del uso de pesticidas o en su caso una cantidad mínima de los mismos y que los frutos de estos cultivos mantengan sus mismas propiedades organolépticas.

Las plantas cuentan con diferentes barreras físicas y bioquímicas preexistentes para repeler el ataque de patógenos. Cuando estas barreras son superadas, la planta cuenta con diferentes mecanismos moleculares del tipo inducible para combatir al patógeno invasor. Uno de estos mecanismos es la inmunidad activada por efectores (ETI por sus

siglas en inglés) que consiste en la activación de una muerte celular programada localizada en el sitio de ataque que impide el desarrollo del patógeno, a esta respuesta inducible también se le conoce como respuesta hipersensible (HR por sus siglas en inglés) (Chisholm *et al.*, 2006). La HR es un mecanismo altamente efectivo que destruye al patógeno en un área determinada, tal mecanismo activa generalmente una segunda respuesta de defensa conocida como resistencia sistémica adquirida (SAR por sus siglas en inglés) que se propaga de la zona de muerte celular hacia el resto de las células vivas de la planta (Pieterse *et al.*, 2009). El SAR es una respuesta que activa a múltiples genes de defensa cuyas proteínas protegen a la planta de ataques subsiguientes del mismo patógeno o de otros tipos de patógenos, generando una protección de amplio espectro que perdura por varios días. Dada la relevancia del ETI en la protección de la planta contra diferentes patógenos. En los últimos años se ha incrementado la investigación de aquellos genes involucrados en este mecanismo de resistencia, por lo que varios genes implicados en la respuesta ETI han sido identificados en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y tabaco, así como en cultivos agrícolas. Varios de estos genes han sido sobre-expresados en plantas modelo lográndose incrementar la tolerancia de las plantas al estrés biótico, lo cual es de trascendental importancia para los programas de mejoramiento genético de los cultivos agrícolas.

Una de las proteínas involucradas en el ETI que ha sido utilizada como modelo de estudio de la muerte celular programada tipo hipersensible es la proteína cinasa PTO de tomate. Es una proteína de 321 aminoácidos que al reconocer a ciertas proteínas de avirulencia de la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* que tiene un estilo de vida hemibiótrofo desencadena una muerte celular en el sitio de ataque (Martin *et al.*, 1993). Experimentos de mutaciones en el sitio de activación del dominio cinasa de PTO y transformaciones temporales de estas secuencias mutantes en hojas de tabaco ocasionan una respuesta tipo hipersensible constitutiva en ausencia de *Pseudomonas syringae* (Rathjen *et al.*, 1999). Se ha propuesto que este tipo de secuencias mutantes que activan la HR podrían utilizarse en combinación con promotores inducibles de respuesta a patógenos para generar resistencia a enfermedades de plantas (Gurr and Rushton, 2005), dicha estrategia podría ser de gran utilidad en los programas de mejoramiento genético de los cultivos agrícolas, tal es el caso de plátano y papaya.

Recientemente, en nuestro laboratorio utilizando la herramienta bioinformática BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, por sus siglas en inglés) descubrimos que las secuencias más parecidas a PTO en los genomas secuenciados de plátano (D'Hont *et al.*, 2012) y papaya (Ming *e tal.*, 2008) son secuencias de tipo receptores de cinasa (RLK por sus siglas en inglés) de la familia THESEUS1. El gen *THESEUS1* fue descubierto en *Arabidopsis thaliana* y se le ha atribuido estar involucrado en sensor cambios en la integridad de la pared celular (Hématy *et al.*, 2007).

Previamente, en el caso de plátano ya se habían aislado mediante PCR degenerada secuencias parciales con homología al dominio de cinasa de PTO (Peraza Echeverría *et al.*, 2007) que posteriormente al compararlas con las secuencias del genoma de plátano correspondieron al dominio cinasa de la familia de THESEUS1. Recientemente se propuso que el gen *THESEUS1* de *Arabidopsis* podría estar involucrado en la muerte celular programada (Cheung y Wu, 2011), sin embargo, aún no se tienen evidencias al respecto por lo que nos preguntamos si el dominio de cinasa de THESEUS1 de plátano y papaya podría activar la muerte celular de manera similar al caso de PTO. Para contestar esta pregunta en la presente tesis se planteó el objetivo general de caracterizar la estructura de la familia THESEUS1 de plátano y papaya así como determinar el papel de su dominio de cinasa en la muerte celular programada.



## CAPÍTULO I

### 1.1 ANTECEDENTES GENERALES

#### 1.1.1 Origen e historia de los cultivos tropicales de plátano y papaya

##### Plátano

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

Los dos factores principales en la evolución del plátano fueron: la partenocarpia (formación del fruto sin previa fecundación, por lo tanto carece de semillas) y la esterilidad genética. Un evento clave fue la hibridación de *M. acuminata* con *M. balbisiana* (una especie más tolerante a sequía), esta cruce permitió el crecimiento de plátano en áreas donde la lluvia es estacional. Ambos genotipos son diploides, el genoma silvestre de *M. acuminata* es representado por AAw y de *M. balbisiana* BBw, los cultivos diploides de *M. acuminata* son designados por AA y diploides híbridos con *M. balbisiana* por AB (Jones, 2000). La triploidia, es otro paso en la evolución del plátano, se piensa que surgió después de la fertilización de células viables, un óvulo diploide se puede formar cuando la meiosis se descompone en la segunda división, con un polen haploide (Simmonds, 1987). Los cultivos triploides son encontrados en los grupos AAA, AAB y ABB y se caracterizan por ser plantas grandes, más resistentes y con un incremento en el tamaño de la fruta. Solo unos pocos cultivos tetraploides, han sido reconocidos pertenecientes a los grupos AAAA, AAAB y AABB, de igual forma se cree en la fertilización de óvulos triploides con polen haploide (Jones, 2000).

La mayoría de los cultivos comerciales son triploides y pertenecen al grupo AAA. Los grupos más importantes que se cultivan a nivel mundial son AAA (banano), AAB (plátano) y ABB (guineo) (Simmonds, 1995).

## Papaya

El fruto de la papaya tiene un grupo de híbridos pertenecientes al género *Carica*, de la familia *Caricaceae*. Su origen se ubica en Mesoamérica o la región que incluye el sureste de México hasta Costa Rica. Su cultivo se adapta a diferentes condiciones de terreno, no obstante, es necesario para el cultivo una riqueza en materia orgánica y humedad en abundancia. (Claridades Agropecuarias, 1999).

Descrita por primera vez en 1526 por el historiador Fernández de Oviedo y en su descripción mencionó que los colonizadores españoles la llamaban “higos de mastuerzo” y “papayas de los pájaros”. A través del intercambio natural de los primeros pobladores de América y el Caribe, la fruta logró diseminarse por muchas regiones de esas áreas. También se ha observado una gran concentración de especies de *Carica* en la región central de los Andes, comprendida entre Brasil, Bolivia, Colombia y Venezuela (Jiménez, 2002).

Los relatos del siglo XVIII de los viajeros y botánicos indican que las semillas de papaya fueron llevadas del Caribe a Las Molucas y posteriormente a la India. Desde Las Molucas y Filipinas se distribuyó a toda Asia y a la región Pacífico Sur. Se dice que el crédito de llevar las semillas a Hawaii, a principios de 1800, se debe a un explorador y agricultor español Francisco Marín, quien las obtuvo en las islas Marquesas (Jiménez, 2002). Fue hasta 1900 cuando la semilla llegó a Florida probablemente de las Bahamas. En 1978 se introdujeron a México las primeras semillas de la variedad *Maradol* a través de la CONAFRUT, en Xalapa, Veracruz. Como se puede ver la variedad se ha adaptado a diversas regiones tropicales y su distribución se debe indudablemente por su abundante semilla de amplia viabilidad (Claridades Agropecuarias, 1999)

Si bien existe una gran variedad de papayas el género *Carica* es el único que se cultiva para el uso de su fruto, mientras que los otros géneros son cultivados principalmente como ornamentales. Entre todas las especies de ese género la más común es la papaya lechosa *Carica papaya* (Teixeira da Silva, *et al.*, 2007).

La papaya Hawaiana en sus diferentes tipos, es el producto de un gran y extenso trabajo de fitomejoramiento, realizado por investigadores de la Universidad de Hawaii. Gracias a ello se originó la variedad hawaiana que la convierten entre las mejores del mundo de la

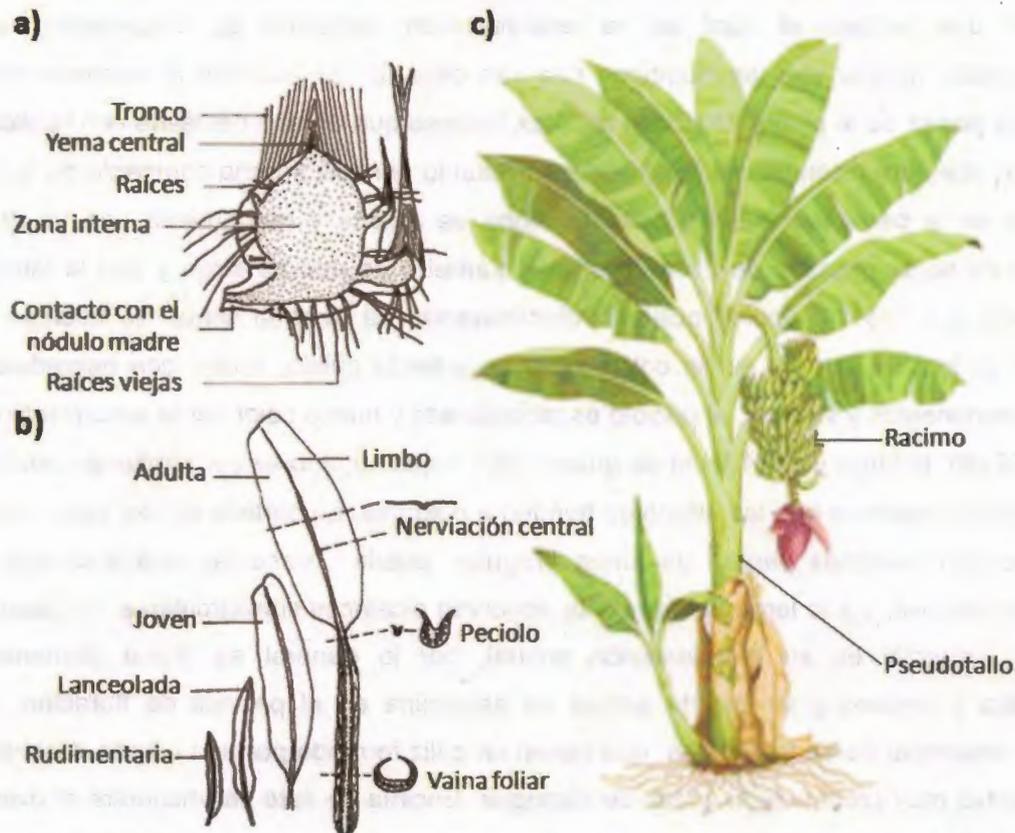
papaya, por sus sobresalientes características organolépticas. Actualmente esta fruta se cultiva en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Nakasone, 1986 citado por Jiménez, 2002).

### 1.1.2 Biología y clasificación taxonómica del plátano y papaya

#### Plátano

El plátano pertenece a las plantas monocotiledóneas y a la Familia botánica Musaceae, que a su vez está constituida por los géneros: *Musa* y *Ensete*. El género *Musa* esta conformado por cuatro secciones: *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* y *Eumusa*. La sección *Eumusa* es la de mayor importancia económica y difusión geográfica. Las especies más importantes son *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, ya que por hibridación o poliploidía dieron origen a los plátanos comestibles. El plátano es una planta herbácea de clima tropical que llega a medir de 3 a 8 m de altura, que consta de un tallo subterráneo denominado cormo o rizoma, que constituye el verdadero tallo de la planta, se presenta como una estructura cónica asimétrica. En su región externa está formado por entrenudos cortos, que están marcados por las cicatrices de las hojas que lo atravesaron en su desarrollo. Internamente está compuesto por dos zonas: el cilindro central y la zona cortical (zona más clara). En la parte superior del cormo y atravesando la corteza está el punto de crecimiento donde su diferenciación da origen a las hojas y al desarrollo externo de la planta. La mayor parte de las raíces salen de la parte superior del cormo, inmediatamente debajo de la inserción de las hojas y su número disminuye hacia la parte inferior. Principalmente se ramifican en secundarias y éstas, a su vez, en pelos absorbentes (Figura 1.1). El pseudotallo está formado por las vainas envolventes de las hojas que se disponen en forma helicoidal, unidas fuertemente unas con otras. Llegan a tener 30 cm de diámetro basal y no son leñosos. Su estructura es tan resistente que permite mantener a la planta en posición ligeramente inclinada a pesar de su peso, el del sistema foliar y el racimo. Continuando con el tallo floral, éste se eleva del cormo a través del seudotallo y es visible hasta el momento de la parición, terminando en la inflorescencia, su función es básicamente conectiva siendo el enlace vascular entre las raíces, hojas y el racimo. En la etapa de desarrollo de la planta, se observan varios tipos de hojas: hojas rudimentarias, hojas estrechas ensiformes y hojas verdaderas. El tamaño de la hoja verdadera aumenta hasta un máximo, pero el tamaño de las que nacen poco antes de la parición declina bruscamente. Una hoja verdadera consta de 5 partes: vaina, peciolo, lámina, nervadura central y apéndice (Figura 1.1). La vaina es la parte basal y

envolvente de la hoja que forma parte del pseudotallo. El peciolo es acanalado y tiene una forma característica de media luna. La nervadura central es la prolongación del peciolo y se adelgaza hacia el ápice de la hoja. La lámina de la hoja es de forma oblongada con su ápice en punta. El apéndice es una prolongación del nervio central y le permite a la hoja nueva abrirse paso por el pseudotallo al ir emergiendo. Finalmente el eje de la inflorescencia es la continuación del tallo floral. En éste las hojas están reemplazadas por brácteas que recubren las flores, estas se abren exponiendo los dedos, que inicialmente apuntan hacia abajo y posteriormente toman una posición inversa hacia arriba (Figura 1.1). El fruto es una falsa baya curvada, su cascara es verde y se torna amarilla en su madurez, el tamaño y peso de la fruta va a depender del vigor y salud de la planta. En cultivos del trópico puede ser cosechada entre 85 y 110 días después del floreamiento, pero en zonas subtropicales el desarrollo de la fruta puede tomar hasta 210 días. Cuando el racimo es cortado, la planta finaliza su ciclo de vida y es reemplazada por uno de los retoños que una vez emitió el cormo (Rodríguez *et al.*, 1985; Jones, 2000).



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

### Papaya

La papaya pertenece a las plantas dicotiledóneas y a la Familia Caricaceae, que contiene 35 especies agrupadas en cuatro géneros (*Carica*, *Cylicomorpha*, *Jarilla* y *Jacaratia*), los híbridos pertenecientes a esta familia evidencian una considerable variabilidad genética que constituye una fuente importante para el mejoramiento vegetal, la más importante es *Carica* teniendo usos agrícolas, medicinales e industriales (Teixeira da Silva, *et al.*, 2007; Jordán, *et al.*, 2009). La papaya (*Carica papaya*) es una herbácea arborescente de crecimiento relativamente rápido llegando a medir de 2 a 8 m de altura y de vida corta. Su sistema radicular está formado por una raíz principal o primaria y raíces secundarias. Está constituido por un tallo recto y cilíndrico, generalmente es un tallo único; sin embargo, ramifica cuando se elimina el punto apical. El tronco está compuesto de un tejido más

carnoso que leñoso, el cual se va endureciendo conforme su crecimiento, una característica notoria son las cicatrices que van dejando los peciolo al desprenderse, todas las partes de la planta producen un látex lechoso que emana del tejido con facilidad y con un olor acre distintivo. El follaje está constituido por una corona compacta de hojas grandes en la parte terminal del tallo. Su copa es abierta y redondeada con un gran número de hojas grandes de 25 a 75 cm de diámetro de peciolo largo y con la lámina palmeada con 7 o 11 lóbulos que van disminuyendo su tamaño según se acercan al peciolo. El haz de la hoja es de color verde amarillento pálido, opaco con nervaduras, venas prominentes y visibles, el peciolo es redondeado y hueco color verde amarillento de 25 a 100 cm de largo y 0.5-1.5 cm de grueso. Sus hojas superiores se mantienen erectas y extendidas mientras que las inferiores tienden a colgarse. La corteza es lisa color verde grisáceo con manchas pardas de forma irregular, puede presentar lenticelas que le permiten respirar, y a lo largo del tronco se observan cicatrices semicirculares. La papaya es muy especial en su manifestación sexual, por lo general es dioica (femenina, masculina o ambas) y su estado sexual se determina en el periodo de floración, se pueden encontrar flores femeninas que tienen un cáliz formado por una corona o estrella de 5 puntas muy pronunciada y fácil de distinguir. Encima de éste se encuentra el ovario cubierto por los sépalos; éstos son cinco, de color amarillo y cuando están muy tiernos tiene un ligero color violeta en la punta. Los estigmas son cinco, de color amarillo y tienen forma de abanico. Las flores hermafroditas tienen a su vez tres clases de flores. Una llamada pentadria, parecida a la flor femenina, pero al separar los pétalos se aprecian cinco estambres y el ovario es lobulado. Otra es llamada elongata y tiene diez estambres, la flor es alargada al igual que el ovario. La última es una flor intermedia o irregular, no es una flor bien constituida. Finalmente las flores masculinas tienen un pequeño pistilo rudimentario y carecen de estigmas por lo que no dan fruto. El fruto de la papaya es una baya ovoide de pulpa carnosa, cuyo color varía de verde a naranja en la madurez. Normalmente el fruto contiene gran cantidad de semillas, son oscuras y esféricas aproximadamente de 5 mm de diámetro recubiertas por una masa gelatinosa. Inician su producción entre los nueve y diez meses de edad y pueden seguir produciendo hasta alcanzar los tres años, posterior a este periodo reducen la calidad y cantidad de frutos. Los frutos miden de 10 a 50 cm de largo, dependiendo del cultivo (Guzmán, 1998).



**Figura 1.2** Estructura de la planta de papaya. Variedad de flores: a) femeninas, b) masculinas, c) hermafroditas 1) pentadria, 2) elongata y 3) intermedia. Imagen tomada y modificada de Sancho y Barona (1998).

### 1.1.3 El plátano y la papaya como cultivos agrícolas

#### Plátano

El plátano es una fruta tropical que posee una combinación de carbohidratos, minerales y vitaminas que la convierten en un alimento nutritivo en cualquier dieta. Es además, el complemento perfecto para las personas con gran actividad física, como niños y deportistas. A través de los años el plátano se ha convertido en un alimento básico en todas las zonas agrícolas del país y últimamente ha cobrado relevante importancia como un cultivo económicamente rentable, tanto para satisfacer el mercado interno como para exportación. Su potencial y perspectiva para los mercados externos son muy alentadores sobre todo cuando es cultivado por cooperativas (World Banana Forum: <http://www.fao.org/economic/worldbananaforum/en/>). Aunque en la producción de plátano aproximadamente el 85 % se da en parcelas relativamente pequeñas y huertos familiares o de traspatio con el fin de consumo local (Arias *et al.*, 2003). El cultivo es de interés para los agricultores, ya que cuenta con una rentabilidad alta, pues por cada peso invertido se recuperan \$1.40 pesos (Plan Rector del Sistema Nacional de Plátano, 2010).

Las zonas tropicales son óptimas para el desarrollo del cultivo de plátano, ya que poseen un clima húmedo y cálido. Su desarrollo se ve beneficiado en regiones que van desde el nivel del mar a los 300 m.s.n.m. sin embargo el plátano se adapta hasta alturas de 2200 m.s.n.m., considerando que las variaciones de altitud prolongan el ciclo biológico (Martín y Prevel, 1979; Palencia *et al.*, 2006). El rango de temperatura en la que se puede cultivar se encuentra entre 20°C y 30°C, en aquellas zonas en donde la temperatura desciende de 20° se produce un retardo en el desarrollo fisiológico de la planta retrasando la cosecha (Rodríguez *et al.*, 1985). Al ser un cultivo sensible al daño por temperatura, se limita su almacenamiento a temperaturas menores a 13°, obteniendo una maduración óptima entre 18°C y 20°C (Crane y Balerdi, 1998).

Debido a la naturaleza herbácea de la planta, su amplia superficie foliar y su rápido crecimiento, el plátano requiere grandes cantidades de agua para su adecuado desarrollo. Se recomienda sembrar en aquellas zonas que tengan niveles de precipitación que oscilen entre 1800 a 3000 mm anuales, con un nivel de precipitación de 150 a 180 mm por mes (Rodríguez *et al.*, 1985). Cuando se presenta escases de agua, el plátano deja de crecer e incluso pueden llegar a morir debido a que sus raíces son superficiales, sin embargo el fenómeno de inundación puede llegar a ser más grave que la sequía, dado

que se destruyen las raíces y se reduce el número de hojas y la actividad floral (Palencia *et al.*, 2006).

La luz existente en el trópico es suficiente para este cultivo, y es importante para el desarrollo de las yemas o brotes laterales (Palencia, 2006). Las plantas de plátanos son moderadamente tolerantes a la sombra (hasta un 50%), sin embargo, esto retarda el crecimiento y desarrollo de la planta y sus frutos (Crane y Balerdi, 1998).

Un factor que se debe tomar en cuenta al momento de establecer una plantación es el viento, debido a la naturaleza de la planta, sus hojas laminares y su sistema radical superficial vientos que excedan los 20 km/hora, producen su ruptura o rasgado. El daño que involucra el doblamiento de las hojas activas es un riesgo para la producción de la planta (Rodríguez *et al.*, 1985; Palencia, 2006).

La humedad relativa afecta a los cultivos de manera indirecta, porque favorece la incidencia de enfermedades foliares en especial las de origen fungoso (Palencia, 2006).

El tipo de suelo tiene influencia sobre el cultivo de plátano a través de sus características físicas y del suministro oportuno y balanceado de los elementos minerales esenciales requeridos para el metabolismo, crecimiento y producción de plantas. La selección de suelos es un factor fundamental para que el cultivo sea rentable. Es importante conocer las propiedades físicas, químicas y biológicas mediante un muestreo, la materia orgánica contenida en el suelo junto con el aire, agua y minerales se encuentran en diferentes estados de descomposición para la producción de humus y este actúa como acondicionador físico y activador de microorganismos a nivel de la rizosfera (Palencia, 2006). Las plantaciones deben establecerse en terrenos con una topografía plana con suelos que tengan una profundidad no menor a 1.2 m, con un buen sistema de drenado y una textura rica en materia orgánica con un pH de 5.5-7 (Rodríguez *et al.*, 1985). Aunque muchas variedades crecen en suelos arenosos, arcillosos del sur de Florida (Crane y Balerdi, 1998).

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

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

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

### Papaya

La papaya es una fruta tropical de sabor dulce que ha tenido una buena aceptación en el mundo no solo por sus innumerables propiedades nutritivas y digestivas, sino que la industria ha sabido encontrar aplicación en diversos procesos (Claridades Agropecuarias, 1999). El cultivo es de gran impacto socio-económico debido a que el 90% de la papaya que se cultiva con fines agroalimentarios se destina al consumo fresco, en tanto el 10% restante se destina a elaborar productos procesados tales como papaya deshidratada, harinas entre otros (SAGARPA 2009). El cultivo es atractivo para los agricultores, ya que tiene una rentabilidad alta, por cada peso invertido se recuperan \$2.40 pesos (Plan Rector del Sistema Nacional de Papaya, 2006).

La papaya se desarrolla mejor en clima cálido aunque se adapta mejor a regiones con alturas menores a 800 msnm. La temperatura para el cultivo es en un rango de 22°C y 30°C, pero su óptima es de 24°C y 27°C, las bajas temperaturas detienen su desarrollo y las altas pueden provocar la abscisión floral (Claridades Agropecuarias, 1998).

El agua es el contribuyente principal de la planta en un 85%. La papaya, tanto en un proceso de germinación, vivero y primeros meses de plantada, necesita para su desarrollo una gran cantidad de agua. Es importante que las tierras tengan una precipitación pluvial entre 1500 y 2000 mm de lluvia anual, con una humedad relativa entre 70 y 85%. Lluvia frecuente y moderada permite una producción continua (Guzmán, 1998).

La planta requiere alta luminosidad debido a su gran actividad fotosintética, generando frutos de mejor calidad en lugares soleados, el color y el sabor de la fruta depende mucho de la radiación solar (Guzmán, 1998).

Aunque se adapta a diferentes tipos de suelos, las principales características que deben reunir es ser profundos, ricos en materia orgánica, es importante que tengan un buen drenaje ya que un exceso de agua genera la presencia de enfermedades en la raíz, con un pH entre 6 y 7, de lo contrario es necesario el encalado (Claridades Agropecuarias, 1998).

En países como Cuba, Brasil, Taiwán y otros del África del Sur se han desarrollado variedades híbridos que han podido adaptarse a diferentes países de condiciones climáticas similares.

La variedad Hawaiano se originó de una sola fruta recogida de un mercado de Barbados en 1910 y mediante autopolinización y selección, los fitomejoradores desarrollaron una familia de variedades con frutas pequeñas y dulces llamadas "Solo". De 1930 a 1969, las líneas Solo 5 y Solo 8 dominaron el mercado de exportación en Hawai. La variedad Kapoho Solo dominó la producción a partir de los años 70 y se caracterizó por su tolerancia a sequía. Posteriormente vino Waimanalo Solo que producía una fruta 50% más grande entre las variedades Solo y se caracterizó por su precocidad y tolerancia al quemado de frutas. En los últimos años se desarrollaron las variedades Sunrise y Sunset que se caracterizan por tener pulpa color rosada y pesos entre 500 y 700 grs. El tipo Waimanalo se originó de un cruce de la variedad Betty de Florida y líneas Solo 8 y Solo 5, siendo precoz en su producción de fruta, aunque su tamaño es indeseable para la exportación. Kapoho es una variedad que crece vigorosamente, el tamaño y la forma de la fruta dependen de los factores climáticos y posee una pulpa color anaranjado intenso. Gold es una variedad de pulpa amarilla, se caracteriza por ser una planta tolerante a

*Cercosporosis sp.* y tiene un alto potencial de rendimiento (Plan Rector del Sistema Nacional de Papaya, 2005).

La papaya cv Maradol fue obtenida por el agricultor cubano Adolfo Rodríguez Rivera, empleando un método de selección que duró 11 años, en los que logró una fruta de sabor dulce y consistencia relativamente dura. Años después consiguió semillas de otra variedad del Oriente y realizó cruces con las que ya había logrado él. Como resultado obtuvo los cv Maradol roja y cv amarilla, aunque la segunda no tenía la consistencia de la primera. Su nombre se originó a partir de la unión de los nombres María y Adolfo, que corresponde al nombre de su esposa y el suyo (Plan Rector del Sistema Nacional de Papaya, 2005).

#### **1.1.4 Producción de Plátano y Papaya a nivel mundial**

##### Plátano

Según datos de la FAO, hasta el año 2009 en el mundo existen 4,834,774 Ha dedicadas al cultivo de plátano. El 58% de estas tierras se concentran en países con regiones tropicales y subtropicales (Figura 1.3). India y Brasil dedican 709,000 y 513,397 respectivamente al cultivo de este producto, continuando Tanzania (480,000 Ha), Filipinas (438,593 Ha), China (311106 Ha), Ecuador (215,521 Ha), Indonesia (105,797 Ha), México (78,471 Ha), Colombia (72,396 Ha) y Costa Rica (44,313 Ha) (FAOSTAT, 2009).

La producción mundial de este cultivo ha aumentado de 40 millones de toneladas en el año 2000 hasta 93 millones de toneladas en el 2008. En este apartado India y Filipinas son los mayores productores (26,217,000 y 8,687,624 T respectivamente), le sigue China (8,042,702 T), Brasil (6,998,150 T), Ecuador (6,701,146 T), Indonesia (5,741,352 T), Tanzania (3,500,000 T) y México (2,159,280 T). En las exportaciones, el principal exportador de plátano es Ecuador con 5,270,690 T, Costa Rica (2,052,640 T), Bélgica (1,322,840 T), Filipinas (1,906,780 T), y Colombia (1,696,510 T) respectivamente. El principal importador de plátano es Estados Unidos con 3,976,150 T, siguiendo Bélgica (1,482,930 T), Alemania (1,388,030 T) y Japón (1,092,740 T).

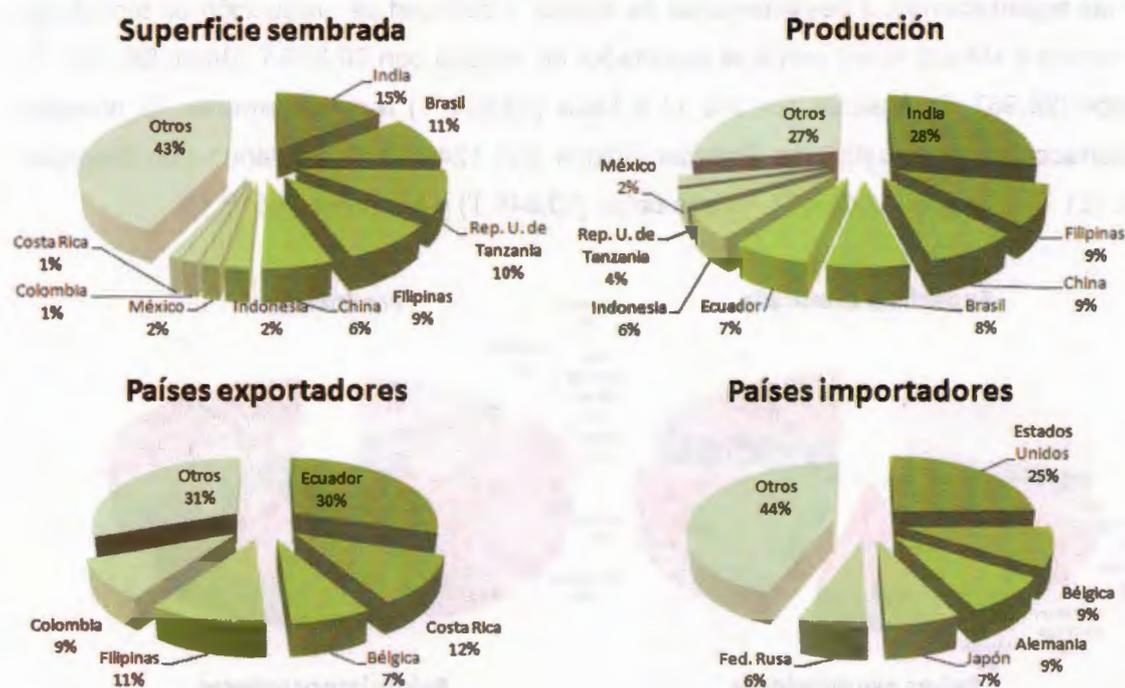


Figura 1.3 Estadísticas de la producción de plátano a nivel mundial (Fuente: FAOSTAT 2009).

### Papaya

Según la FAO, hasta el año 2009 en el mundo existen 413,227 Ha dedicadas al cultivo de papaya. El 70% se concentran en países con regiones tropicales y subtropicales (Figura 1.4). India y Nigeria dedican 98,000 y 92,500 Ha respectivamente al cultivo de este producto, continuando Brasil (36,585 Ha), México (16,084 Ha), República de Congo (13,500 Ha), Etiopía (12,500 Ha), Tailandia (12,140 Ha), Indonesia (8,982 Ha) y Colombia (5,496 Ha) (FAOSTAT, 2009).

La producción mundial de este cultivo ha aumentado de 7 millones de toneladas en el año 2000 hasta poco más de 10 millones en el 2009. En este apartado India y Brasil son los principales productores con 3,629,000 y 1,890,286 T respectivamente, continuando Nigeria (765,000 T), Indonesia (653,276 T), México (638,237 T), Etiopía (260,000 T), República Democrática del Congo (223,770 T), Colombia (207,698 T) y Tailandia (201,099 T).

En las exportaciones, a pesar del área de cultivo y cantidad de producción en toneladas, se coloca a México como principal exportador de papaya con 90,316 T, Brasil (29,968 T), Belice (28,967 T), Malasia (24,168 T) e India (13,834 T) respectivamente. El principal importador de este cultivo es Estados Unidos con 124,330 T, siguiendo con Singapur (23,181 T), Canadá (12,950 T), Países bajos (10,845 T) y Alemania (8,516 T).

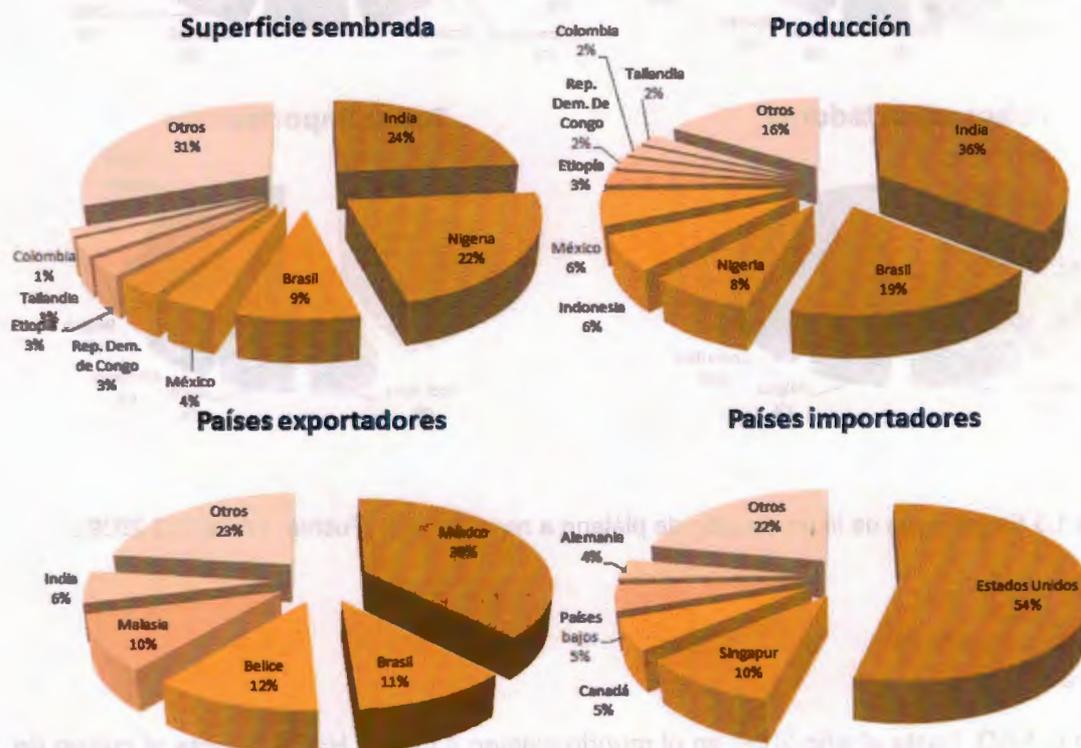


Figura 1.4 Estadísticas de la producción de papaya a nivel mundial (Fuente: FAOSTAT 2009).

### 1.1.5 Producción de Plátano y Papaya en México

#### Plátano

En nuestro país, alrededor de 76 mil hectáreas se encuentran cubiertas con este cultivo generando una producción anual de alrededor de 2.2 millones de toneladas, de las cuales el 95% se destina al consumo interno y el 5% restante para la exportación (SAGARPA, 2009).

En el 2009 se dedicaron 78,015 Ha al cultivo de plátano en toda la República Mexicana, el principal estado dedicado a este cultivo fue Chiapas con 24,810 Ha, continuando Tabasco (10,612 Ha) y Veracruz (14,559 Ha). Con una producción de 2,233,975 T/Ha en el 2009 del cual el 60% fue generado por los estados Chiapas y Tabasco con 774,432 y 550,459 T respectivamente. De acuerdo con los datos del SIAP los estados con mayor rendimiento son Tabasco (51.87 T/Ha), Jalisco (47.13 T/Ha) y Michoacán (32.86 T/Ha). Con un valor de producción total de \$6,163,079 mdp en el 2011 (Figura 1.5).

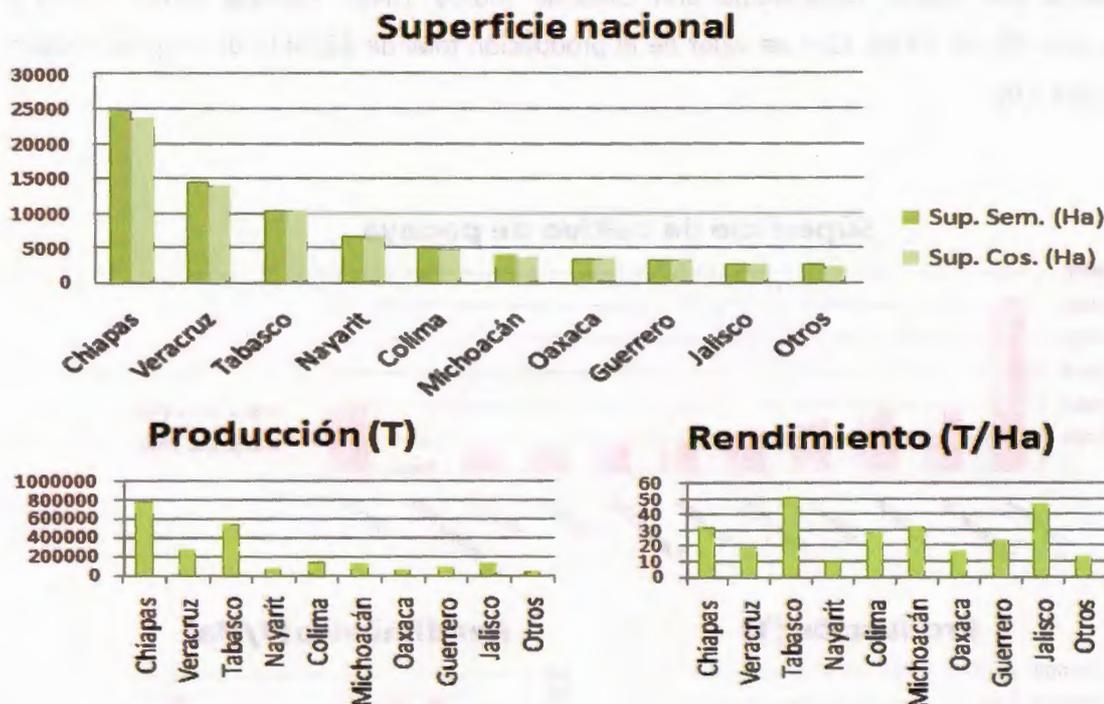


Figura 1.5 Estadísticas de la producción de plátano en México (Fuente: SIAP 2009).

En el periodo 2002-2005 México importaba de otros países, de los cuales el 85.3% provenían de los Estados Unidos. Sin embargo en el 2009 México exportó plátanos a Estados Unidos, Siria y Japón, que demandan el 92.24% del producto mexicano exportado. Estados Unidos es el principal socio comercial al cual se le envía el 73.44% del producto total exportado.

Papaya

En México datos obtenidos de la SIAP indican que en el 2009 se dedicaron 17,353 Ha para el cultivo de papaya en la República, sobresaliendo el estado de Veracruz con 5,283 Ha, seguido por Michoacán (1,840 Ha) y Chiapas (1,804 Ha). Con una producción de 707,346 T en el 2009 del cual el 58% fue generado principalmente por Veracruz, Chiapas y Oaxaca con 194,798, 119,873 y 97,199 T. De acuerdo con los datos del SIAP los estados con mayor rendimiento son Chiapas (68.66 T/Ha), Oaxaca (66.87 T/Ha) y Yucatán (50.92 T/Ha). Con un valor de la producción total de \$2,541,107 mdp en el 2011 (Figura 1.6).

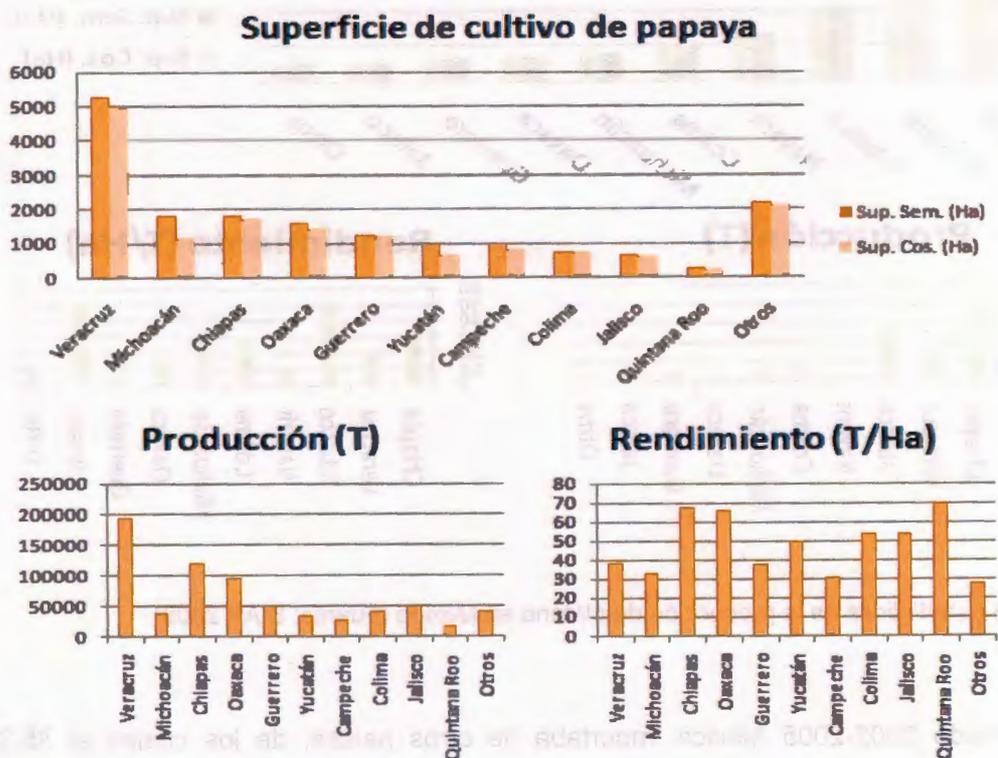
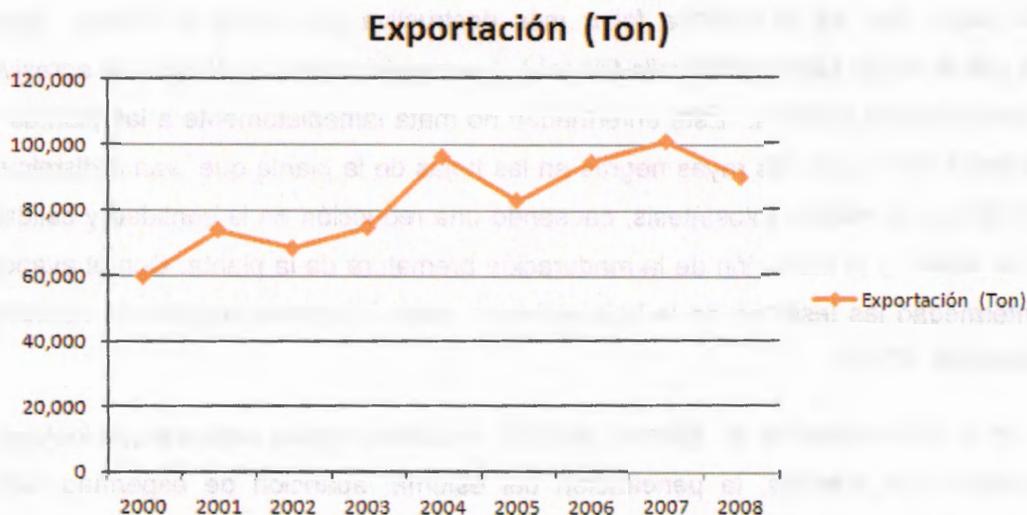


Figura 1.6 Estadísticas de la producción de papaya en México (Fuente: SIAP 2009).

La producción nacional de papaya de 2000 a 2009 varió entre un rango mínimo de 672,375 T en el 2000 hasta un máximo de 919,425 T en el año 2007. Sin embargo, la cantidad de exportación se ha mantenido estable a lo largo del mismo periodo, con un promedio estimado de 92,997 T que se exportan principalmente a Estados Unidos (Figura 1.7).



**Figura 1.7** Datos de exportación del cultivo de papaya en el periodo 2000-2008 (Fuente: FAOSTAT 2009).

### 1.1.6 Problemáticas de la producción: aspectos de patógenos y plagas

#### Plátano

Los cultivos de plátano son importantes a nivel mundial debido a que son una fuente rica de carbohidratos, vitaminas y minerales. Las principales causas de pérdidas se deben a la alta incidencia de plagas y enfermedades.

Entre las plagas más importantes tenemos al picudo negro (*Cosmopolites sordidus*) que es considerado como el más importante en países tropicales y subtropicales. Se alimenta y desarrolla dentro del rizoma formando túneles que obstruyen el paso del agua y los nutrientes. Además son la puerta de entrada de otras plagas como el Gusano tornillo (*Castniomera humboldti*), la Llagá estrellada (*Rosellinia pepo*) y el Moko ( bacteria *Ralstonia solanacearum*). En las plantas afectadas hay reducción de crecimiento, amarillamiento de las hojas, tendencia al desenraizamiento, reducción de la productividad y caída por acción de los vientos (Merchán, 2002).

Existen también enfermedades que son causadas por hongos, la primera identificada fue la Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*), se caracteriza por la presencia inicial de manchas necróticas, rodeadas a veces por un halo amarillo y posteriormente se da el secamiento y muerte de la mayor parte del área foliar. Posteriormente se identificó la

Sigatoka negra que es la mancha foliar más destructiva que ataca el género *Musa* causada por el hongo (*Mycosphaerella fijiensis*), que resultó tener un efecto más agresivo a comparación de la amarilla. Esta enfermedad no mata inmediatamente a las plantas y se caracteriza por causar las rayas negras en las hojas de la planta que van a disminuir su capacidad para realizar fotosíntesis, causando una reducción en la cantidad y calidad de la fruta debido a la inducción de la maduración prematura de la planta. Con el avance de la enfermedad las lesiones en la hoja se unen para finalmente producir la necrosis foliar (Churchill, 2010).

El ciclo de la enfermedad de *M. fijiensis* consiste en cuatro etapas distintas que incluyen la germinación de esporas, la penetración del estoma, aparición de espermogonios, peritecios y ascosporas, y producción de esporas (Figura 1.8). Plantas silvestres de plátano que no tienen ningún uso agronómico como es el caso de las subespecies burmannicoides Calcuta 4 ó *malaccensis* son resistentes a esta enfermedad a través de la muerte celular programada tipo respuesta hipersensible.



**Figura 1.8** Ciclo del desarrollo de la enfermedad de la Sigatoka negra. Infección en la hoja de *Musa spp.* Causada por *M. fijiensis*. Imagen tomada y modificada de Churchill (2010).

## Papaya

Los cultivos de papaya son de gran importancia a nivel mundial ya que proporcionan una fuente rica en nutrientes y vitaminas. En los últimos años los cultivos de papaya se han visto afectados por problemas sanitarios que limitan su producción y comercialización.

Entre las principales plagas en México se encuentran la araña roja (*Tetranychus cinnabarinus*) y el ácaro blanco (*Polyphagotarsonemus latus*) que afectan principalmente el follaje. Otra plaga incidente es el piojo harinoso (*Planococcus sp.*), también transmisor de enfermedades virósas. Las de menor incidencia son el periquito (*Acanophora projecta*) y la mosca de la papaya (*Toxotrypana cutvicauda*) (Guzmán, 2008). Dentro de las principales enfermedades más diseminadas a nivel mundial que presenta este cultivo se encuentran las virales como el virus de la mancha anillada (PRSV por sus siglas en inglés) y el virus del mosaico (PMV por sus siglas en inglés); Aunque el avance tecnológico ha desarrollado nuevas variedades como la hawaiana SunUp, la mexicana Azteca o la taiwanesa Tainung. Sin embargo, el cultivo es atacado también por diferentes organismos como: nemátodos (*Rotilenchus reniformis*) que le generan daños mecánicos y susceptibilidad a ataques por patógenos a la planta; enfermedades bacterianas causadas principalmente por los géneros *Pseudomonas* y *Erwinia* que causan clorosis en las hojas y enfermedades fúngicas originadas por especies como *Alternaria alternata*, *Mycosphaerella sp.*, *Cescospora papayae*, *Fusarium solani* y *Cladosporium sp.* principalmente (Poghosyan *et al.*, 2005).

Si bien el cultivo es susceptible a diferentes enfermedades, entre las más importantes se encuentra la enfermedad de antracnosis causada por el hongo hemibiótrofo *Colletotrichum gloeosporioides* siendo la principal causa de pérdidas a nivel post-cosecha. En papaya el hongo afecta cualquier órgano de la planta, causando manchas acuosas, hundidas y de color marrón oscuro en la superficie, afectando la calidad externa e interna del fruto y con ello su valor comercial (Zavala-León *et al.*, 2005). En papaya no se han generado variedades tolerantes a este patógeno, pero existen algunas alternativas empleadas en el control de la enfermedad post-cosecha como el uso de tratamientos físicos y químicos, los últimos implican el continuo uso de agroquímicos que a la larga podrían generar resistencia en el patógeno, al igual que causar daños a la

salud, al ambiente y en algunos casos afectar la calidad del fruto con manchas, olores y sabores desagradables (Gonzales *et al.*, 2007).

### 1.1.7 Biotecnología aplicada a los cultivos de plátano y papaya

#### Biotecnología en plátano

En plátano se han desarrollado cultivos híbridos (SHIA 21 y África 1) que presentan tolerancia a Sigatoka, pero esto se ha realizado mediante cruces entre variedades resistentes y un procedimiento de selección que resulta muy complicado. Este tipo de mejoramiento no ha sido posible de aplicar a los cultivares comerciales (Ej. Enano Gigante) debido a que son poliploides estériles. Por lo que la biotecnología a través de la transformación genética representa una alternativa atractiva para generar variedades de plátano resistentes a patógenos y plagas.

Por otra parte el área en que más se ha trabajado es en los procesos de micropropagación de plátano, las técnicas de embriogénesis somática (ES) fueron desarrolladas originalmente para lograr dos propósitos: 1) la micropropagación masiva y 2) el desarrollo de herramientas celulares para el mejoramiento genético (transformación genética y la fusión de protoplastos) (Canchignia *et al.*, 2008; Subramanyam *et al.*, 2011).

Actualmente existen procedimientos de cultivo *in vitro* ya establecidos para cada tipo de explante en plátano: explantes cigóticos (Cronauer y Krikorian, 1988; Escalant y Teisson, 1989), meristemos de rizomas y vainas foliares (Novak *et al.*, 1989), flores inmaduras masculinas o femeninas (Ma, 1991; Escalant *et al.*, 1994; Grapin *et al.*, 1996; Grapin *et al.*, 2000), cultivos meristemales proliferantes (escalpos) (Dhed'a *et al.*, 1991; Schoofs, 1997). Entre los cuales destaca el profesor Ma en la Universidad de Taiwán, quien desarrolló un medio de cultivo y una metodología para obtener suspensión de células embriogénicas (SCE), lo cual fue un gran avance para el desarrollo de un sistema de embriogénesis somática en plátano (Strosse *et al.*, 2003).

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

## Biotecnología en papaya

La papaya se ha convertido en un modelo para otros cultivos frutales con respecto a usos de la biotecnología. Esto se debe en gran parte al excelente desarrollo del cultivo *in vitro* generado durante las últimas tres décadas de investigación. La micropropagación de *Carica papaya* ha sido altamente desarrollada en regiones subtropicales para estabilizar y propagar genotipos seleccionados. Técnicas de rescate de embriones se han desarrollado eficientemente de varias clases de tejidos inmaduros en presencia de fitohormonas en especial auxinas (Manshardt y Drew, 1998). La facilidad que tiene el género *Carica* para generar híbridos interespecíficos a partir de embriones y óvulos, ha permitido que se realicen estudios que logren hacer híbridos de papaya con otras seis especies del género *Carica*, de esta manera se han obtenido algunos híbridos útiles que lograron heredar características de resistencia a enfermedades (Manshardt y Drew, 1998).

Los protocolos de transformación genética de papaya están bien establecidos tanto para la transformación mediada por biobalística (Cai *et al.*, 1999), así como mediada por *Agrobacterium* (Zhu *et al.*, 2006). Sin duda el avance biotecnológico de mayor impacto en papaya fue generar una variedad transgénica, por medio de la expresión de un gen que codifica para la proteína de la cápsida del virus PVRS, de esta manera lograron crear las variedades SunUP y Rainbow resistentes al virus de la mancha anular. Las variedades transgénicas de papaya son en la actualidad el único caso de un cultivo transgénico creado al 100% en instituciones públicas (Gonsalves, 1998).

Otro paso importante fue la publicación en 2008 de la secuencia genómica de *Carica papaya*, la cual consta de 372 Mega bases (Mb) y contiene un total de 24,746 genes (Ming *et al.*, 2008). Con ello surge la posibilidad de realizar la búsqueda de genes de manera dirigida y sistemática que permitan el desarrollo de variedades que puedan ayudar a contrarrestar las mermas en la producción como en el caso de la antracnosis. La clonación de homólogos de genes de resistencia en papaya podría permitir el mejoramiento genético de este cultivo mediante el desarrollo de variedades cisgénicas. En los últimos años se han identificado genes que de manera natural confieren resistencia a enfermedades en las plantas. Estos genes podrían servir de referencia para detectar genes de interés biotecnológico en el genoma de papaya.

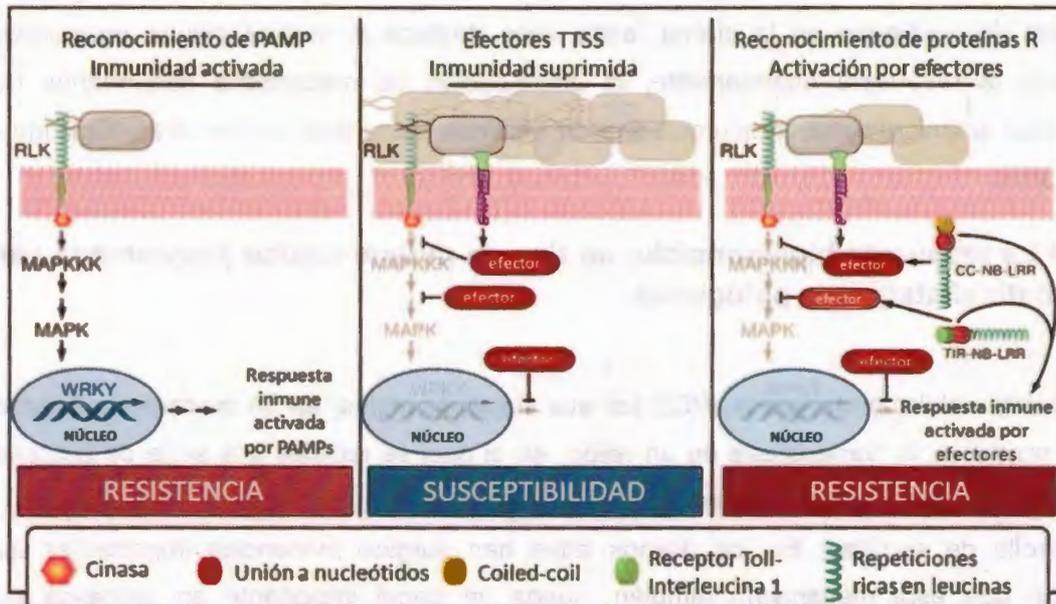
### 1.1.8 El sistema inmune de las plantas

Las plantas a diferencia de los animales, son organismos sésiles que carecen de un sistema circulatorio, de células móviles para la defensa y de un sistema inmune adaptativo. Por otra parte, están sujetas al cambio de condiciones ambientales, incluyendo el constante ataque de patógenos. Sin embargo, para contrarrestar el ataque de patógenos las plantas han desarrollado desde mecanismos de defensa que consisten en barreras físicas y químicas constitutivas que ayudan a reducir el daño causado, hasta potentes mecanismos moleculares inducibles de resistencia en cada célula y señales sistémicas provenientes del sitio de la infección (Camarena, 2009).

Se sabe que el sistema inmune de las plantas está constituido por una inmunidad innata que actúa de dos formas fundamentales: la primera está basada en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP por sus siglas en inglés), mediante receptores de reconocimiento de patógenos (PRR por sus siglas en inglés) que se localizan en la superficie de las células vegetales y se denomina inmunidad activada por PAMPs (PTI por sus siglas en inglés). Sin embargo, hay patógenos que producen efectores que inhiben la PTI, que también son reconocidos por las plantas mediante receptores denominados de resistencia (R), los cuales están conformados principalmente por la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucina con dominios de unión a nucleótidos (NB-LRR por sus siglas en inglés), las cuales en general desencadenan una muerte celular programada, también conocida como respuesta hipersensible en el sitio de ataque. A esta segunda barrera de defensa del sistema innato de la planta se le denomina inmunidad activada por efectores (ETI por sus siglas en inglés) (Jones y Dangl, 2006; He *et al.*, 2007; Boller y He, 2009).

Jones y Dangl en el año 2006, plantearon que la respuesta inmune en plantas podría ser representada en un modelo zig zag de tres fases (Figura 1.9): a) los PAMPs son reconocidos por los PRRs activando así la PTI, que puede detener la colonización del patógeno, b) Los patógenos por su lado liberan efectores en el hospedero que contribuyen a la virulencia inhibiendo así a PTI haciendo a la planta susceptible, c) a su vez como resultado de un proceso coevolutivo, la planta desarrolla proteínas de resistencia (R) que cuentan con dominios NB-LRR que reconocen los efectores activando así la ETI la cual es una respuesta acelerada y amplificadora de PTI, lo que conlleva a la

resistencia de la enfermedad y casi siempre, a una respuesta de muerte celular programada en el sitio de ataque. Generando así un ciclo coevolutivo continuo en el que los genes R y los efectores cambian a través de las poblaciones de hospederos y patógenos (Jones y Dangl, 2006; Bent y Mackey, 2007).



**Figura 1.9** Modelo de evolución de la resistencia contra microorganismos en plantas. a) Reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por receptores tipos cinasas (RLKs) que generan una cascada de señalización de cinasas para activar factores de transcripción tipo WRKY que activan la inmunidad dirigida por PAMPs; b) el patógeno desarrolla proteínas efectoras que suprimen la señalización por cinasas; c) el hospedero desarrolla proteínas R que reconocen los efectores y activan la respuesta inmune. Imagen tomada y modificada de Chisholm *et al.* (2006).

La especificidad en las interacciones planta patógeno va a depender tanto del genotipo de la planta como del patógeno, una manera de explicar dicha interacción es entendiendo el modelo gen-por-gen que es una forma de resistencia de las plantas a las enfermedades que es ampliamente explotada por los fitomejoradores, que denota la dependencia de la resistencia a la interacción específica de un gen R en la planta y un gen avirulento (avr) en el patógeno. Las interacciones planta patógeno son específicas entre patógenos con genes avr y genes R correspondientes a las plantas. Para ello la interacción va a depender de genes dominantes o recesivos que van a dar lugar a interacciones compatibles o incompatibles. El gran interés de este modelo es porque se reconoció que

la resistencia generalmente es controlada por un solo gen dominante. El primer gen avr indentificado fue del patógeno *Pseudomonas syringae* pv *glycinae* (Camarena, 2006).

Una vez que el patógeno ha sido reconocido, la planta activa una serie de mecanismos de defensa a través de la transducción de señales que principalmente es dirigida por proteínas cinasas. Estos mecanismos activos tienen como objetivo principal detener el avance del patógeno en la planta, entre ellos destaca la muerte celular programada durante la respuesta hipersensible, la acumulación de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, la acumulación de enzimas hidrolíticas entre otras (Collinge *et al.*, 1994).

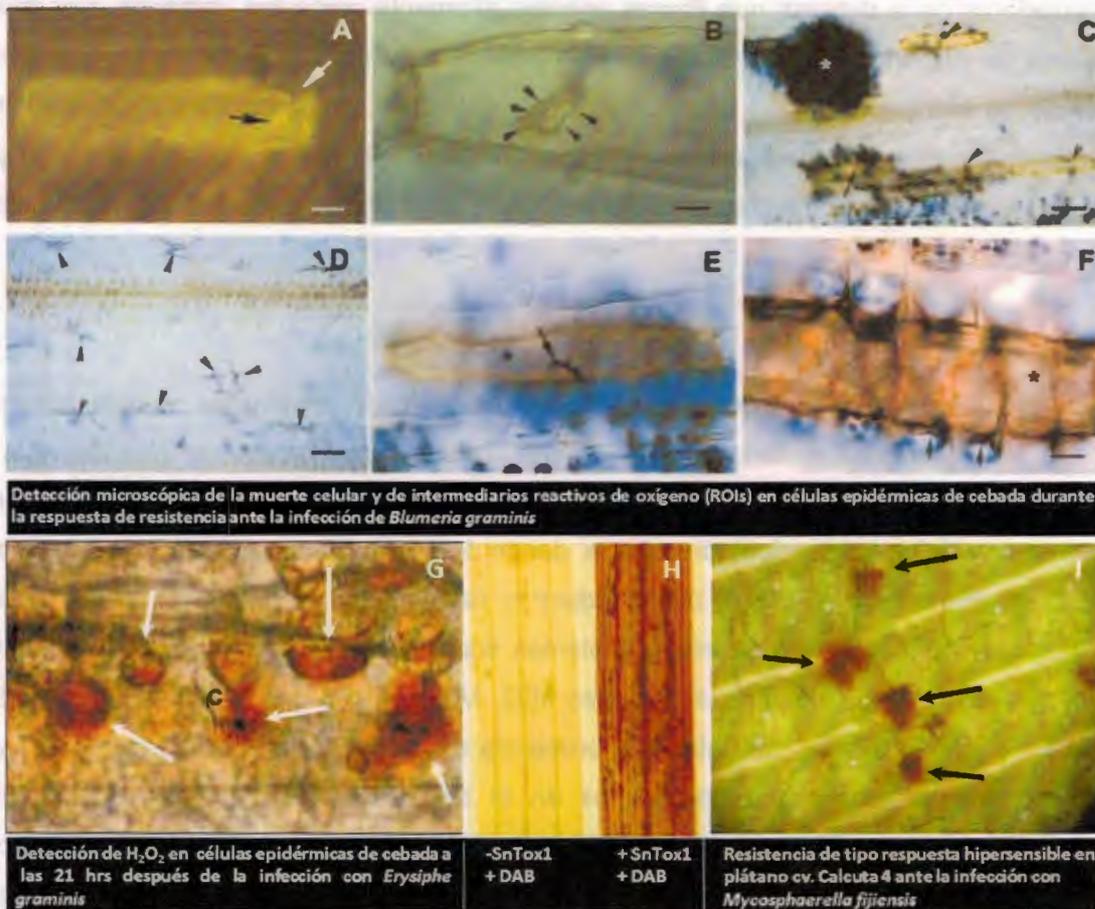
### **1.1.9 La respuesta hipersensible: un tipo de muerte celular programada para combatir el ataque de patógenos**

La muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés) es un mecanismo esencial para mantener la homeostasis de un tejido, en el cual se regulan una serie de procesos fisiológicos tales como la germinación, diferenciación, crecimiento, reproducción y desarrollo de semillas; En los últimos años han surgido evidencias importantes que indican que este mecanismo también juega un papel importante en procesos que involucran resistencia ante condiciones de estrés biótico (Pérez *et al.*, 2007). Estudios enfocados en entender la interacción planta-patógeno tipo incompatible, han demostrado que la mayoría de las veces ocurren cambios en el metabolismo de la planta que se manifiestan con la aparición de lesiones necróticas locales en el sitio de infección. Estas lesiones son el resultado de una muerte celular programada tipo respuesta hipersensible (HR, por sus siglas en inglés), la cual está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa incluyendo la acumulación de fitoalexinas, lignina, proteínas ricas en hidroxiprolina, sustancias reactivas de oxígeno y proteínas PR que activan otros mecanismos de amplio espectro (Madriz, 2002).

Entre las características de este tipo de muerte celular se da lugar a la contracción citoplasmática, condensación de la cromatina, hinchazón mitocondrial junto con otras características que son específicas de la planta, tales como la vacuolización y disrupción de cloroplastos en las etapas finales (Pérez *et al.*, 2007); Estudios recientes mencionan que los cloroplastos tienen un papel central en la defensa y la respuesta hipersensible en plantas. Principalmente, por que representan una fuente importante de moléculas

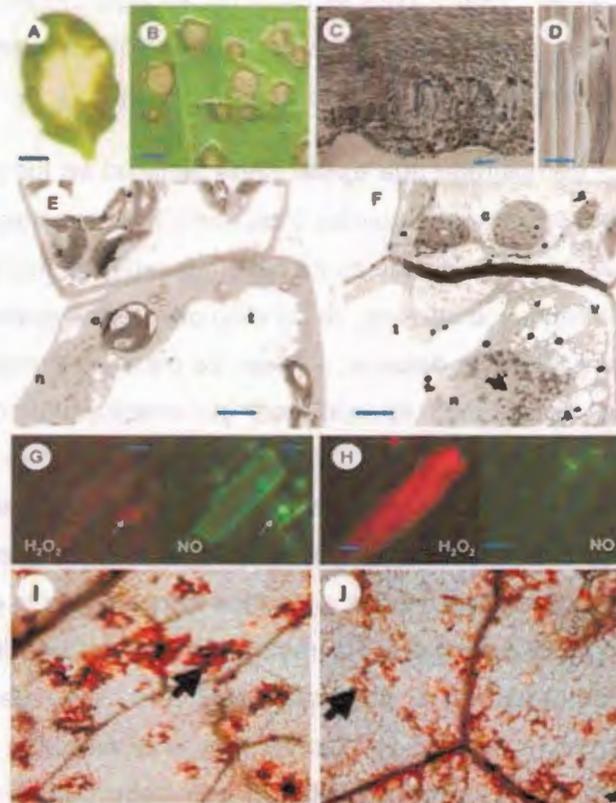
señalizadoras de la defensa que liberan agentes altamente oxidantes llamados especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), tales como el superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que activan en la célula un programa de suicidio celular organizado en el sitio de infección dando como resultado la muerte del área afectada y con ello restringiendo la diseminación del patógeno en la planta generando resistencia (Mur *et al.*, 2008).

En los últimos 10 años diversos estudios se han realizado en plantas modelo con el objetivo de observar el fenotipo de muerte celular tipo respuesta hipersensible. Hükelhoven *et al.* en el 2000 realizaron la detección microscópica de la muerte celular presente en células epidérmicas de cebada, donde demostraron que el gen de resistencia *Mla12* presente en el cv. Sultan-5 puede inducir un fenotipo de muerte celular programada tipo respuesta hipersensible cuando las plantas son inoculadas con el hongo *Blumeria graminis* a diferencia de las líneas mutantes M22, M66 y M100 que tienen el gen *Mla12* deletado; en dicho estudio, se detectó la presencia de compuestos de superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) localizados en el sitio de infección lo que impidió el crecimiento del hongo (Figura 1.10 A-F). Thordal *et al.*, (1997) reportaron que un fenotipo similar fue observado en cebada cuando es infectada con el hongo *Erysiphe graminis* (Figura 1.10 G). Recientemente, Liu *et al.*, (2012) lograron inducir la respuesta hipersensible en hojas trigo (*Triticum aestivum*) inoculadas con un aislado de la molécula efectora SnTox1 presente en el hongo *Stagonospora nodorum* (Figura 1.10 H). De igual manera, este fenotipo de respuesta hipersensible también ha sido observado en plantas de plátano silvestre (*Musa acuminata* ssp. *Burmannicoides* Calcuta 4) inoculadas con el hongo *M. fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra (Figura 1.10 I).



**Figura 1. 10** Respuesta hipersensible presente en plantas monocotiledóneas. A) Imagen de epifluorescencia del sitio de interacción donde la célula huésped penetrada sufrió la respuesta hipersensible observándose la acumulación de compuestos fenólicos (flechas). Barra=20µm. B) Acercamiento del sitio de interacción donde una célula es penetrada genera la respuesta hipersensible, la coloración marrón DAB indica la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (flecha negra). Barra=8µm. C) Doble tinción de hojas de Sultan-5 (cultivar resistente), se observa que el desarrollo del hongo (flechas) fue impedido por la respuesta hipersensible generada. Los polímeros marrones de la tinción DAB en las células muertas y la coloración azul oscuro obtenida de la tinción formazan fueron visibles en los sitios de la respuesta hipersensible. Barra=80µm. D) Doble tinción de hojas de la línea M66 (cultivar susceptible), se observa el desarrollo de la hinfa secundaria del hongo (flechas) sin presencia de la respuesta hipersensible. El sitio de la interacción no mostró ningún fenotipo para las tinciones de DAB y formazan. Barra=80µm. E) Una célula epidérmica de hojas del cv. Sultan-5 induciendo la respuesta hipersensible, el desarrollo del hongo se ve impedido después de la penetración de la hinfa secundaria (flecha). La célula penetrada (estrella) fue teñida completamente de color marrón por la tinción DAB. Barra= 25µm. F) Acercamiento de una célula individual (estrella) mostrando la respuesta hipersensible, se puede observar que la célula se teñió completamente con el DAB (flechas). Barra=12µm. G) Células epidérmicas de cebada que presentan la respuesta hipersensible (flechas) después de ser infectadas con el hongo *Erysiphe graminis*: H) Inducción del fenotipo de respuesta hipersensible hojas de trigo inoculadas con la molécula SnTox1 del hongo *Stagonospora nodorum*, la coloración marrón es el resultado de la tinción DAB I) Fenotipo de resistencia tipo respuesta hipersensible (flechas) en hojas de plátano Calcuta 4 al día 5 después de la infección con el hongo *M. fijiensis* (foto tomada por Peraza Echeverría S. y Peraza Echeverría L.) (Hückelhoven *et al.*, 2000; Thordal *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2012).

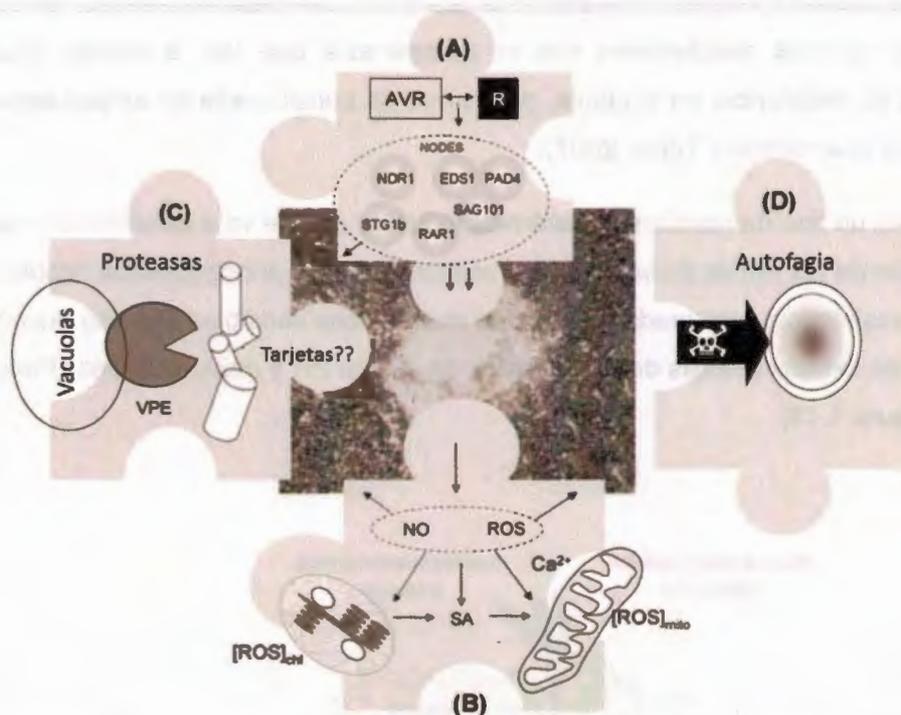
Por otra parte el fenotipo de muerte celular tipo respuesta hipersensible en plantas dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum* han demostrado de manera visual el fenotipo de la respuesta hipersensible cuando son infectadas con la bacteria *Pseudomonas syringae* y el Virus del mosaico del tabaco (Mur et al., 2008) (Figura 1.11).



**Figura 1. 11** Respuesta hipersensible presente en diversas plantas dicotiledóneas. A) Una HR en *Arabidopsis thaliana* 24 hrs en respuesta de la infiltración con  $1 \times 10^6$  células/ml de la bacteria patógena *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000, Barra=1 cm, B) El Virus del mosaico del tabaco (TMV) induce la HR formando lesiones en *Nicotiana tabacum* cv. Samsun 72 hrs después de la inoculación, Barra=0.5 cm, C) Imagen por microscopía electrónica de barrido (SEM) de lesiones en tabaco generadas por el TMV 72 hrs después de la inoculación, Barra=100 $\mu$ m, D) Imagen SEM de una célula colapsada de cebada a 30 hrs después de haber sido inoculada con el hongo *Blumeria graminis*(*Bgh*) , Barra=10  $\mu$ m, Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de células de hoja de tabaco E) no infetadas y F) infectadas 48 hrs después de ser inoculadas con el TMV donde se puede apreciar la pérdida de turgencia de la célula (t), que es un fenotipo característico de la HR, cloroplastos (c), núcleo (n), vesículas grandes (v), Barra=5  $\mu$ m, G) y H) muestran imágenes simultáneas a las 12:30 hrs y 13:30 hrs seguidas de la inoculación con *Bgh*, donde el  $H_2O_2$  y el NO están asociados con la formación de papilas (flechas), un mecanismo para detener la penetración del hongo en la planta. Muestras teñidas con DAF-2DA y rojo amplex, Barra=10  $\mu$ m. I) y J) muestran hojas jóvenes y adultas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con *Pseudomonas syringae*, la tinción DAB fue realizada a las 6 horas después de la inoculación. La reacción de peroxidación indica la presencia de  $H_2O_2$  en las hojas con una coloración rojiza (flechas). (Zeier, 2005; Mur et al., 2008).

Diversos reportes en plantas modelo han evaluado la reacción de peroxidación como indicador de la respuesta hipersensible utilizando el compuesto orgánico DAB (3,3-diaminobenzidina) que es capaz de reaccionar con el  $H_2O_2$  endógeno de la planta e inducir la formación de precipitados con una coloración que puede variar desde rojizo a café oscuro (Thordal *et al.*, 1997), para el caso de especies monocotiledóneas se ha observado una coloración marrón-café oscuro (Figura 10), mientras que en especies dicotiledóneas la coloración tiende a ser rojiza-marrón (Figura 11)

Estudios recientes han demostrado que existe cierta similitud en los procesos de muerte celular entre mamíferos (apoptosis) y plantas (respuesta hipersensible). La interacción de proteínas de avirulencia (avr) con proteínas de resistencia (R) da inicio a la HR y también a un gran número de defensas asociadas, se ha visto que ciertos genes son utilizados por diferentes genes R para iniciar la defensa; a través de estos mecanismos se conduce la producción de ROS en donde las mitocondrias y cloroplastos tienen un papel esencial para inducir la respuesta de defensa (Mur *et al.*, 2008). Por otra parte Nishimura *et al.*, en el 2005 identificaron enzimas de procesamiento vacuolar (VPE por sus siglas en inglés) en plantas conocidas como caspasas, la deficiencia de VPE previene la muerte celular durante la HR de capas celulares limitadas en la fase temprana de la embriogénesis, este mecanismo juega un papel esencial en la regulación del sistema lítico de las plantas durante los procesos de defensa y el desarrollo, VPE esta localizada en las vacuolas, a diferencia de las caspasas presentes en mamíferos que se localizan en el citosol, por lo tanto es posible que las plantas pudieran haber desarrollado una estrategia para regular el suicidio celular mediado por vacuolas y VPE. Finalmente el proceso que limita la propagación de la HR a un sitio específico de la planta es la autofagia, la contención de muerte de las células alrededor de la periferia de la lesión ha sido asociada a la formación de autofagosomas que presumiblemente contienen factores que desencadenan la muerte celular (Hofius *et al.*, 2009)(Figura 1.12).



**Figura 1.12** Mecanismos de defensa involucrados en la respuesta hipersensible. a) Reconocimiento del patógeno mediante proteínas de resistencia, b) Generación de moléculas de señalización ROS, NO en los cloroplastos y mitocondrias, c) Activación de la actividad de proteasas en la célula que mantienen la regulación del sistema lítico y d) Inducción de procesos de autofagia en las células cercanas al sitio de la respuesta hipersensible. Imagen tomada y modificada de Mur *et al.* (2008).

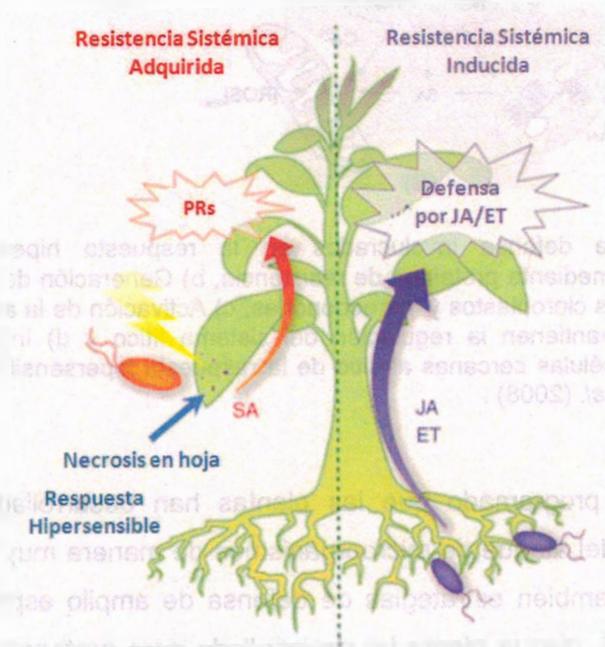
La HR es un mecanismo programado que las plantas han desarrollado como una estrategia para defenderse del ataque de microorganismos de manera muy localizada en el sitio de ataque, existen también estrategias de defensa de amplio espectro que son activadas después de la HR, que la planta ha desarrollado para protegerse de manera sistémica ante futuros ataques de patógenos.

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

Otro tipo de resistencia inducible es la resistencia sistémica adquirida conocida como (SAR por sus siglas en inglés). Los eventos que conducen a la resistencia sistémica comienzan localmente debido a una RH en donde la producción de ácido salicílico (SA) aumenta activando la señalización de SAR (Pieterse *et al.*, 2009). En las células más alejadas que no han sido infectadas, la primera respuesta de defensa es la síntesis de

proteínas de defensa relacionadas con la patogénesis que van a activar diferentes mecanismos de resistencia en la célula, por lo que es considerada de amplio espectro y larga duración (Camarena y Torre, 2007).

Existe también un tipo de resistencia sistémica inducida que se va a desarrollar a partir de la colonización de las raíces de la planta por microorganismos principalmente rizobacterias. Este tipo de resistencia esta mediada por vías metabólicas sensibles al ácido jasmónico y al etileno y son independientes de la expresión de genes PR y ácido salicílico (Pieterse *et al.*, 2009)(Figura 1.13).



**Figura 1.13** Representación esquemática de las diferentes respuestas a patógenos de las plantas. La respuesta hipersensible genera necrosis en la zona afectada, seguida de la producción de ácido salicílico (SA) que es una molécula esencial para la activación del SAR para la producción de PR y finalmente ISR que es activada por microorganismos benéficos y que viaja a través del sistema vascular de la planta para activar de manera sistémica la inmunidad en la planta. Imagen tomada y modificada de Pieterse *et al.*(2009).

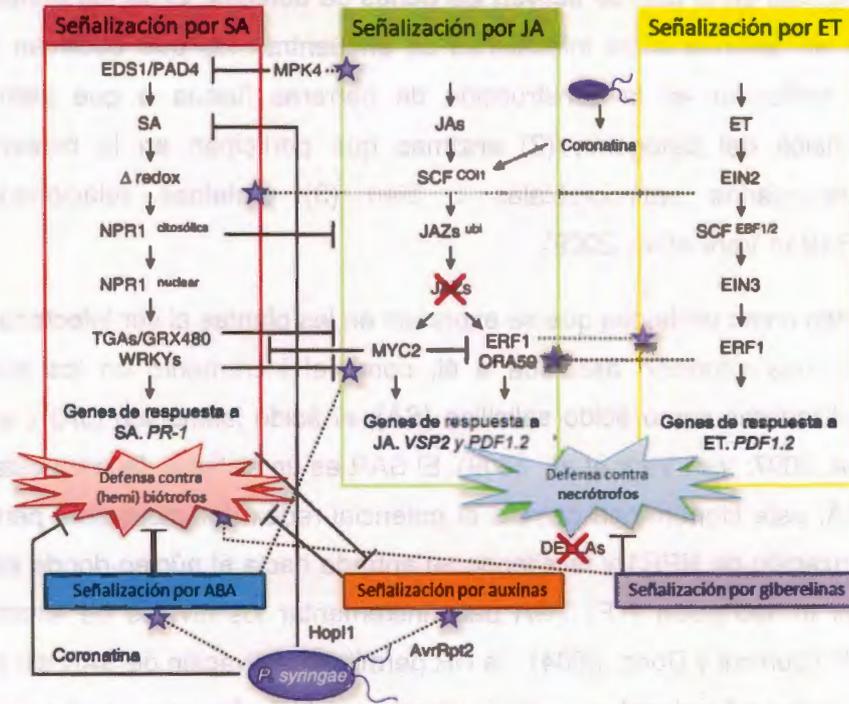
### 1.1.11 Rutas de señalización en los mecanismos de defensa de plantas

En los últimos años, los estudios de expresión realizados en *Arabidopsis thaliana* han mostrado que la diferencia entre las plantas susceptibles y resistentes, se encuentra en la

velocidad y magnitud en la cual se activen los genes de defensa. Entre los genes que se pueden activar en defensa a las infecciones se encuentran los que codifican para (1) proteínas que participan en la construcción de barreras físicas o que permiten un confinamiento físico del patógeno; (2) enzimas que participen en la biosíntesis de metabolitos secundarios antimicrobiales o bien (3) proteínas relacionadas con patogénesis PR (Van Verk *et al.*, 2009).

Las PR se definen como proteínas que se expresan en las plantas al ser infectadas por un patógeno o por una situación asociada a él, como el incremento en los niveles de hormonas señalizadoras como ácido salicílico (SA), el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (Camarena, 2007; Van Verk *et al.*, 2009). El SAR es un sistema de respuesta que se activa con el SA, esta fitohormona cambia el potencial redox del citoplasma permitiendo así la monomerización de NPR1 y facilitando su entrada hacia el núcleo donde interactúa con factores de transcripción (TF) TGA para incrementar los niveles de expresión de varios genes PR (Durrant y Dong, 2004). La HR permite la activación de SAR sin embargo esta respuesta solo es funcional para microorganismos biótrofos, y no en los necrótofos (Durrant y Dong, 2004).

En el caso de microorganismos necrótofos se activan dos rutas que actúan de manera sinérgica activando genes PR que codifican para las proteínas  $\beta$ -1,3- glucanasas (PR-2), quitinasas básicas (PR-3), proteínas tipo Hevein (PR-4) o bien proteínas defensinas (PDFs por sus siglas en inglés) que ayudan a las plantas a defenderse de microorganismos fúngicos. Dichas rutas, son activadas por señales de ET y JA actuando de manera antagónica a la ruta de SA, por lo que existen mecanismos de regulación que permiten la conexión entre ambas rutas (Pieterse *et al.*, 2009) (Figura 1.14).



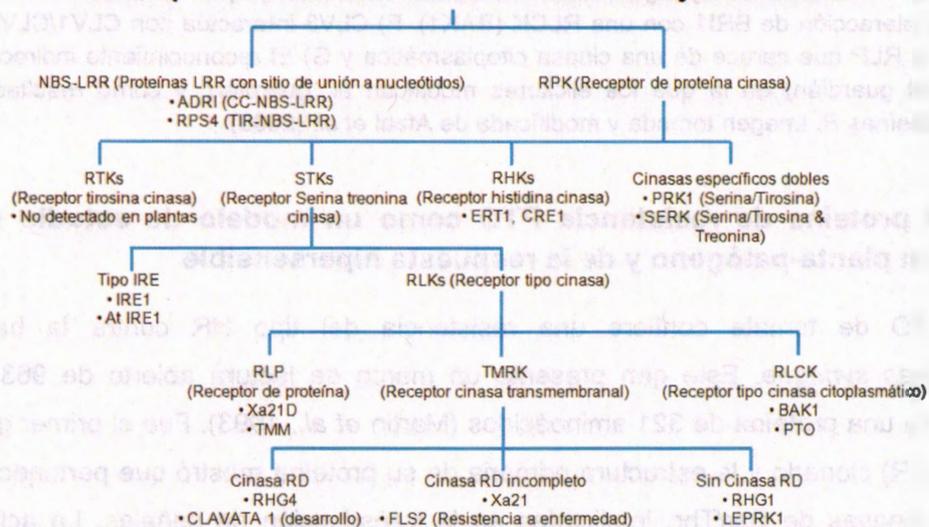
**Figura 1.14** Interacción entre las diferentes rutas de señalización reguladas por fitohormonas durante la respuesta de las plantas al ataque de patógenos. Se ha visto que patógenos como *P. syringae* producen proteínas efectoras (Coronatina, Hop11 y AvrRpt2) que suprimen la respuesta de defensa de las plantas. Las rutas de señalización dependientes de SA, JA ó ET representan los principales mecanismos bioquímicos para activar los genes de defensa. Las líneas negras representan efectos negativos, mientras que las líneas punteadas con estrellas representan efectos positivos. Imagen tomada y modificada de Pieterse *et al.* (2009).

Las plantas son hospederos de una amplia gama de patógenos, por esa razón han desarrollado diversas estrategias para defenderse de diferentes poblaciones de ellos. Los receptores tipo cinasa (RLK por sus siglas en inglés) son una familia de genes en plantas que tiene un papel central durante en el reconocimiento de patógenos (Figura 1.15), esto ha permitido una evolución acelerada de los dominios involucrados en la recepción de señales, que actúan como receptores tanto de la superficie celular como citoplasmáticos interactuando con los dominios de los receptores ricos en leucina (LRR por sus siglas en inglés) de un diverso grupo de proteínas activando de esta forma los mecanismos de defensa (Afzal *et al.*, 2008 )(Figura 1.16) .

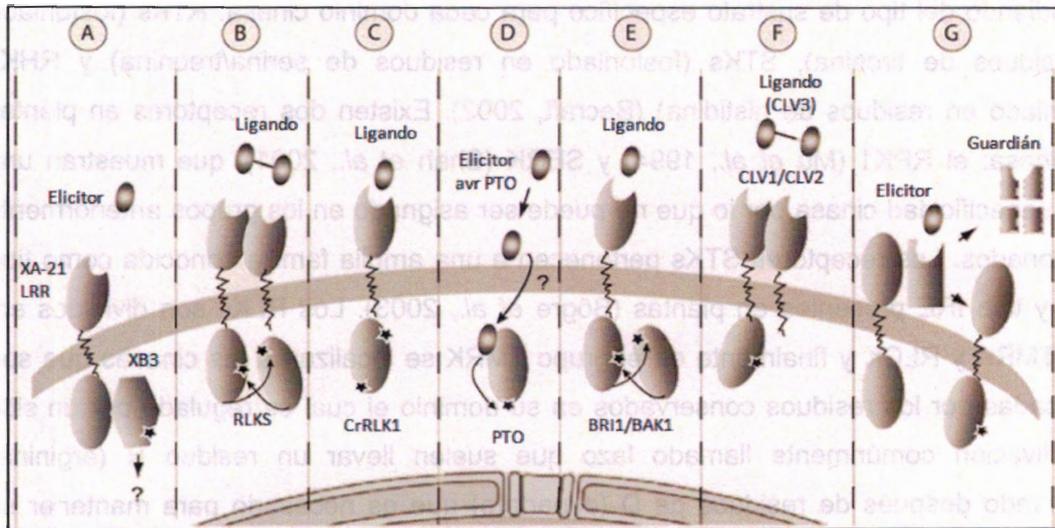
Las proteínas involucradas en el desarrollo y resistencia a enfermedad en plantas (Figura 1.15) contienen receptores LRR que pueden dividirse en dos categorías: los tipo NBS-LRR (De Young and Innes, 2006) y los RPKs. Que a su vez se divide en tres subclases

dependiendo del tipo de sustrato específico para cada dominio cinasa: RTKs (fosforilado en residuos de tirosina), STKs (fosforilado en residuos de serina/treonina) y RHKs (fosforilado en residuos de histidina) (Becraft, 2002). Existen dos receptores en plantas tipo cinasa: el RPK1 (Mu *et al.*, 1994) y SERK (Shah *et al.*, 2001), que muestran una doble especificidad cinasa por lo que no puede ser asignado en los grupos anteriormente mencionados. Los receptores STKs pertenecen a una amplia familia conocida como tipo RLKs y tipo IRE presentes en plantas (Bögge *et al.*, 2003). Los RLKs son divididos en: RLP, TMRK y RLCK y finalmente en el grupo TMRK se localizan a las cinasas que son clasificadas por los residuos conservados en su dominio el cual es regulado por un sitio de activación comúnmente llamado lazo que suelen llevar un residuo R (arginina) conservado después de residuos de D (aspartato) que es necesario para mantener su actividad catalítica del subdominio VI. Las cinasas que están reguladas por este mecanismo se conocen como cinasas RD RD (que contienen ambos residuos), RD incompleto (que no contienen arginina) y sin RD (no tienen ambos residuos) (Dardick and Ronald, 2006).

**Clase de proteínas involucradas en el desarrollo y enfermedad**



**Figura 1.15** Clasificación de la familia de receptores de proteínas cinasa (RPKs) involucrados en el desarrollo y resistencia a enfermedades en plantas. Imagen tomada y modificada de Afzal *et al.* (2008).



**Figura 1.16** Modelos para el reconocimiento receptor-ligando de receptores tipo cinasa en plantas. A) Xbe3 XB3 es requerido para estabilizar a XA21. Ante la infección por patógenos, XB3 es fosforilada por XA21. Esto sirve como una señal de defensa. B) En RLKs de *Arabidopsis thaliana* se muestra que la fosforilación ocurre después de la formación del heterodímero. C) CrRLK1 de *Catharanthus* sp. muestra una autofosforilación en ausencia de una oligomerización. D) PTO una cinasa Ser/Thr citoplasmática está involucrada en la resistencia a *Pseudomonas syringae* AvrPTO. E) La señalización por brasinoesteroides involucra la interacción de BRI1 con una RLCK (BAK1). F) CLV3 interactúa con CLV1/CLV2. CLV2 es una RLP que carece de una cinasa citoplasmática y G) El reconocimiento indirecto (hipótesis del guardián) en la que los elicitores modifican al "guardián" y como resultado activan a proteínas R. Imagen tomada y modificada de Afzal *et al.* (2008).

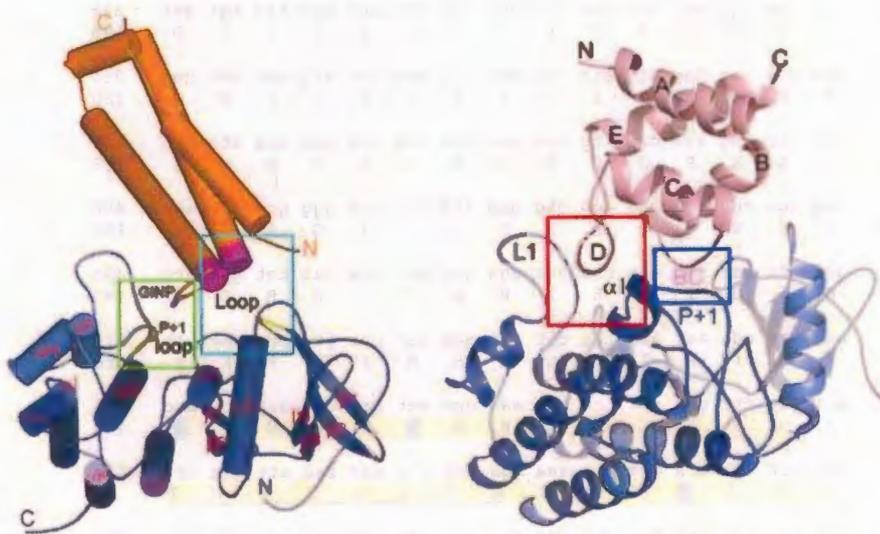
### 1.1.12 La proteína de resistencia PTO como un modelo de estudio de la interacción planta-patógeno y de la respuesta hipersensible

El gen *PTO* de tomate confiere una resistencia del tipo HR contra la bacteria *Pseudomonas syringae*. Este gen presenta un marco de lectura abierto de 963 pb y codifica para una proteína de 321 aminoácidos (Martin *et al.*, 1993). Fue el primer gen de resistencia (R) clonado y la estructura primaria de su proteína mostró que pertenece a la familia de cinasas de Ser/Thr, implicadas en la transducción de señales. La actividad cinasa de PTO se basa en un sitio de activación en la posición 182-211 (Sessa *et al.*, 2000). Esta región comprende elementos regulatorios incluyendo el sitio lazo P+1 que reconoce a su sustrato y cambiando la conformación activa de la proteína (Rathjen *et al.*, 1999). El grupo de Sessa *et al.*, 2000, identificó los residuos de autofosforilación del sitio de activación de PTO (Figura 1.17).

1	atg gga agc aag tat tct aag gca aca aat tcc ata aat gat gct	45
1	M G S K Y S K A T N S I N D A	15
46	tta agc tcg agt tat ctc gtt cct ttt gaa agt tat cga gtt cct	90
16	L S S S Y L V P F E S Y R V P	30
91	tta gta gat ttg gag gaa gca act aat aat ttt gat cac aag ttt	135
31	L V D L E E A T N N F D H K F	45
136	tta att gga cat ggt gtc ttt ggg aag gtt tac aag ggt gtt ttg	180
46	L I G H G V F G K V Y K G V L	60
181	cgt gat gga gca aag gtg gcc ctg aaa agg cgt aca cct gag tcc	225
61	R D G A K V A L K R R T P E S	75
226	tca caa ggt att gaa gag ttc gaa aca gaa att gag act ctc tca	270
76	S Q G I E E F E T E I E T L S	90
271	ttt tgc aga cat ccg cat ctg gtt tca ttg ata gga ttc tgt gat	315
91	F C R H P H L V S L I G F C D	105
316	gaa aga aat gag atg att cta att tat aaa tac atg gag aat ggg	360
106	E R N E M I L I Y K Y M E N G	120
361	aac ctc aag aga cat ttg tat gga tca gat cta ccc aca atg agc	405
121	N L K R H L Y G S D L P T M S	135
406	atg agc tgg gag cag agg ctg gag ata tgc ata ggg gca gcc aga	450
136	M S W E O R L E I C I G A A R	150
451	ggt cta cac tac ctt cat act aga gca att ata cat cgt gat gtc	495
151	G L H Y L H T R A I I H R D V	165
496	aag tct ata aac ata ttg ctt gat gag aat ttt gtg cca aaa att	540
166	K S I N I L L D E N F V P K I	180
541	act gat ttt gga ata tcc aag aaa ggg act gag ctt gat caa acc	585
181	T <b>D F G I S K K G</b> <b>H</b> <b>E L D Q</b> <b>I</b>	195
586	cat ctt agc aca gta gtg aaa gga act ctc ggc tac att gac cct	630
196	<b>H L S</b> <b>H</b> <b>V V K G T L G Y I D P</b>	210
631	gaa tat ttt ata aag gga cga ctc act gaa aaa tct gat gtt tat	675
211	<b>E</b> Y F I K G R L T E K S D V Y	225
676	tct ttc ggt gtt gtt tta ttc gaa gtt ctt tgt gct agg tct gcc	720
226	S F G V V L F E V L C A R S A	240
721	ata gtt caa tct ctt cca agg gag atg gtt aat tta gct gaa tgg	765
241	I V Q S L P R E M V N L A E W	255
766	gca gtg gag tcg cat aat aat gga cag ttg gaa caa atc gta gat	810
256	A V E S H N N G Q L E Q I V D	270
811	ccc aat ctt gca gat aaa ata aga cca gag tcc ctc agg aag ttt	855
271	P N L A D K I R P E S L R K F	285
856	gga gat aca gcg gta aaa tgc tta gct ttg tct agt gaa gat agg	900
286	G D T A V K C L A L S S E D R	300
901	cca tca atg ggt gat gtg ttg tgg aaa ctg gag tat gca ctt cgt	945
301	P S M G D V L W K L E Y A L R	315
946	ctc caa gag tct gtt att taa	966
316	L Q E S V I *	321

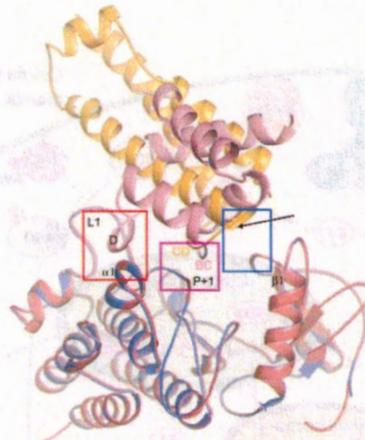
**Figura 1.17** Mapa físico de la secuencia de nucleótidos traducida de *PTO*. En amarillo se ubica el sitio de activación de la proteína, la secuencia subrayada señala la región lazo P+1 y los sitios de autofosforilación son indicados con el color turquesa (Genbank No. de accesoión U02271, Martin *et al.*, 1993).

Recientemente se demostró de una manera muy detallada la interacción de PTO con proteínas efectoras de *P. syringae* pv *tomate* (*Pst*), las cuales van a formar complejos nombrados AvrPTO-PTO y AvrPTOB-PTO (Figura 1.18). Xing *et al.* (2007) demostraron la interacción entre la molécula efectora AvrPTO-PTO se da en el sitio lazo P+1 de PTO, dos años más tarde Dong *et al.* (2009) determinaron la interacción del complejo AvrPTOB-PTO y que el residuo T199 es autofosforilado siendo esencial para mantener la conformación activada de PTO y se de la interacción (Dong *et al.*, 2009).



**Figura 1.18** Estructura general de los complejos de PTO y sus efectoras. a) Complejo AvrPTO-PTO donde la región lazo P+1 (verde) y Lazo  $\beta$ -1 (turquesa) de PTO se une al motivo GINP del AvrPTO, b) Complejo AvrPTOB-PTO donde la región  $\alpha$  hélice (rojo) y el lazo P+1 (azul) de PTO se unen al motivo AVAF donde BC representan las hélices B y C del AvrPTOB. (Xing *et al.* 2007; Dong *et al.*, 2009)

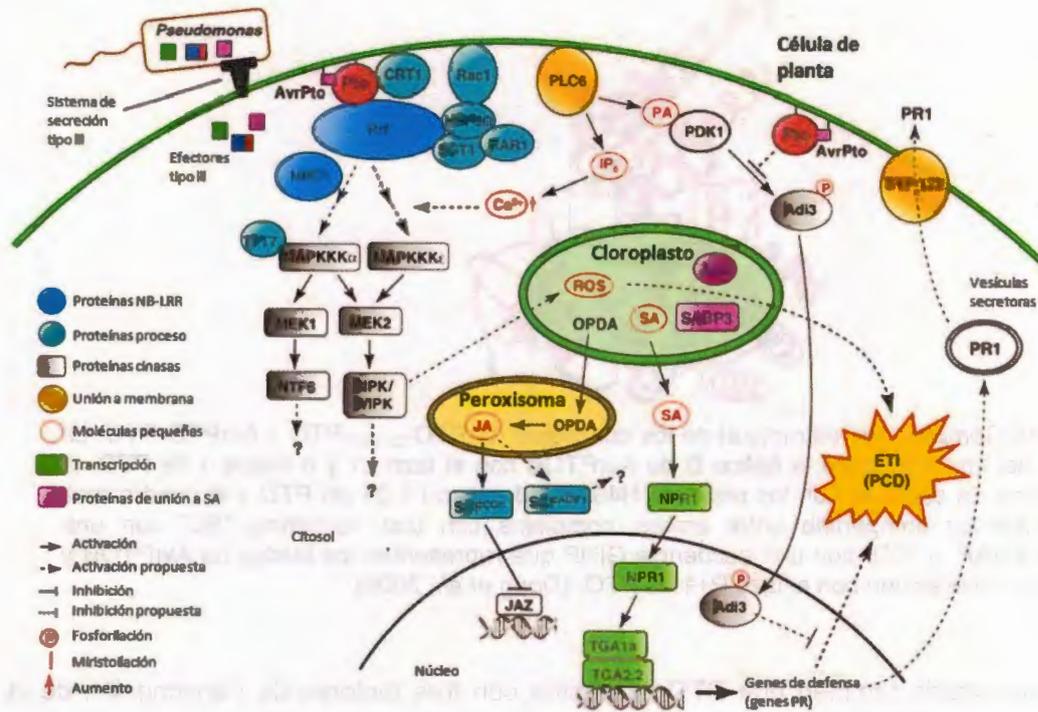
La sobreposición de las estructuras tridimensionales de AvrPTO y AvrPTOB comparten una interfaz de unión llamada lazo P+1 donde diferentes efectoras pueden competir por la interacción con PTO. (Figura 1.19).



**Figura 1.19** Comparación estructural de los complejos AvrPTO<sub>121-201</sub>-PTO y AvrPTO-PTO. La interfaz 1 del contacto entre la hélice D de AvrPTO<sub>B</sub> con el lazo L1 y  $\alpha$  hélice 1 de PTO, la interfaz única de contacto con los residuos H49/V51 del lazo L1  $\beta$ 1 en PTO y el cuadro rosa indica la interfaz compartida entre ambos complejos con una secuencia "BC" con una secuencia AVAF y "CD" con una secuencia GINP que representan los bucles de AvrPTO<sub>B</sub> y AvrPTO, que interactúan con el lazo P+1 de PTO. (Dong *et al.*, 2009).

Se ha demostrado también que PTO interactúa con tres factores de transcripción de la familia ERF llamados Pti4, Pti5 y Pti6 (Zhou *et al.*, 1997). Estos factores de transcripción se unen a secuencias GCC de promotores que se encuentran en varios genes de defensa identificados en la planta. PTO fosforila a Pti4 aumentando así su afinidad de unión al promotor del gen de defensa PR-1 (Gu *et al.*, 2000).

Cerca de 25 genes involucrados en la transducción de señales de PTO han sido identificados en las últimas dos décadas. Las proteínas de estos genes han permitido elucidar la manera en que PTO detecta a las proteínas efectoras de la bacteria *P. syringae* y como esta detección desencadena la activación de la respuesta de resistencia en la planta (Chang *et al.*, 2010) (Figura 1.20).

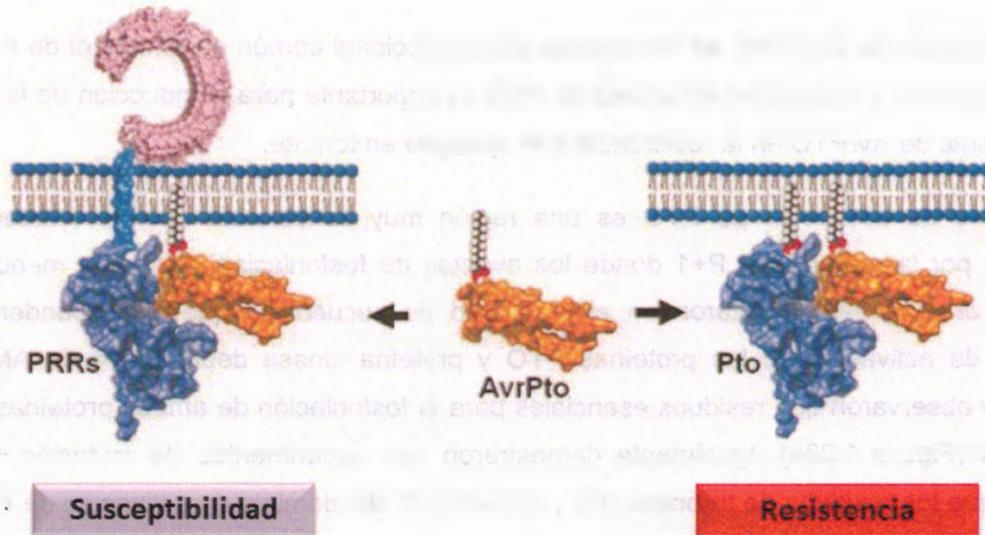


**Figura 1.20** Ruta de activación de PTO (círculo rojo) a partir de estudios de pérdida de función. *P. syringae* introduce proteínas efectoras en el citosol de la célula a través de un sistema de secreción tipo III. Pto reconoce directamente AvrPto y activa el ETI mediante la interacción con Pfr, esta respuesta se genera por la activación de la cascada de MAPKKK que inducen la producción de ROS en el cloroplasto para generar la HR, como efecto de la HR se generará el aumento de SA que va a ser liberado al citosol, produciendo un cambio en el potencial REDOX de la célula causando la disociación de dímeros de NPR1, esto le permitirá a NPR1 entrar al núcleo e interactuar con factores de transcripción del tipo TGA, los cuales a su vez promueven la transcripción de genes de defensa, cuyas proteínas pueden ser secretadas para defender a la célula. Imagen tomada y modificada de Chang *et al.*, (2010).

### 1.1.13 Evolución de PTO

La inhibición de la PTI con proteínas efectoras puede ser reactivada por la ETI utilizando a PTO. Inicialmente se propuso el modelo del guardián para generar la resistencia a enfermedades la cual consiste en que las proteínas de resistencia de las plantas actúan monitoreando a los patógenos, sin embargo sus efectores blancos al ser evolutivamente inestables lo harían inespecífico, de ahí surgió el modelo decoy que se basa que una proteína de resistencia sea utilizada como carnada para engañar a las proteínas efectoras y al interactuar se active la cascada de señalización (Van der *et al.*, 2008; Collier y Moffett, 2009).

Este modelo puede ser utilizado para PTO ya que la interacción entre Avr-PTO-FLS2 en la cual efectores de *P. syringae* bloquean la acción de la proteína de membrana FLS2 es muy similar a la interacción de AvrPTO-PTO, por tal razón se podría utilizar a PTO como carnada para que interactúe con el efector AvrPTO (Figura 1.21) y al fosforilarse PTO active a la proteína de resistencia Prf de la familia NBS-LRR produciendo la activación de la HR o muerte celular programada en el sitio de ataque, este tipo de interacción es llamada gen-por-gen (Rathjen *et al.*, 1999; Zong *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2009).



**Figura 1.21** Modelo decoy para la inducción de ETI. Las plantas son susceptibles debido a que la unión de AvrPTO a proteínas de resistencia (PRRs) inhibe el PTI (izquierda). En el caso de las plantas resistentes, la proteína de resistencia PTO ha evolucionado de tal forma que su estructura es similar al dominio de cinasa de las PRRs, propiciando que AvrPTO se pueda unir a PTO activando de esta forma el ETI (Zong *et al.*, 2008).

#### 1.1.14 Sobreexpresión de PTO en plantas transgénicas

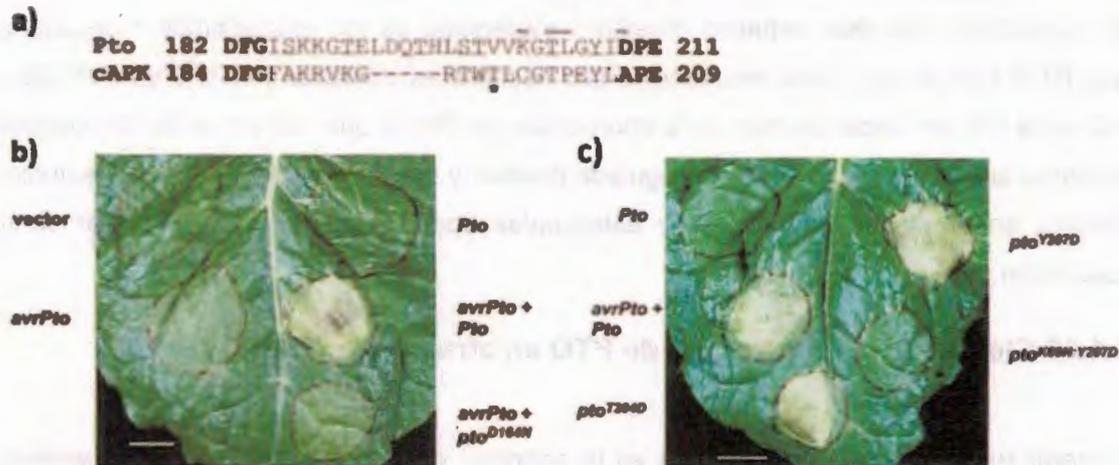
Se han realizado estudios de sobreexpresión del gen PTO en tomate utilizando el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, en los cuales las plantas transgénicas desarrollaron resistencia contra las bacterias *P. syringae* pv. *Tomato* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; al igual que contra el hongo *Cladosporium fulvum* (Tang *et al.*, 1999). Para determinar si la sobreexpresión de PTO aumenta la resistencia de manera no específica se inocularon plantas de tomate con la cepa virulenta T1 de *P. syringae* y evaluaron la resistencia comparando los síntomas de la enfermedad en plantas transgénicas y no transgénicas. Donde pudo observarse los síntomas de la enfermedad

en las plantas susceptibles y resistentes, Por otra parte, las plantas transgénicas (11-12 y 48-2) disminuyeron los síntomas de la enfermedad y estos se correlacionó con el grado de crecimiento de bacterias en esas hojas. Al igual se inocularon plantas de tomate con *X. campestris* pv. *versicatoria*, las líneas transgénicas (11-12 y 13-8) presentan una disminución de las lesiones en comparación con las no transgénicas (Tang *et al.*, 1999).

### 1.1.15 Genes mutantes de PTO que activan la muerte celular

La fosforilación de proteínas es un proceso postraduccional común en el control de rutas de señalización. La actividad de cinasa de PTO es importante para la inducción de la HR dependiente de AvrPTO en la resistencia a *P. syringae* en tomate.

El dominio de activación de PTO es una región muy conservada que se encuentra regulada por la región lazo P+1 donde los eventos de fosforilación ocurren a menudo. Rathjen *et al.* (1999) realizaron un alineamiento de secuencias que corresponden al dominio de activación de las proteínas PTO y proteína cinasa dependiente de AMPc (cAPK) y observaron que residuos esenciales para la fosforilación de ambas proteínas se conserva (Figura 1.23a). Igualmente demostraron con experimentos de mutación sitio dirigida que los residuos de treonina 204 y tirosina 207 del dominio de activación de PTO correspondientes al lazo P+1 al ser sustituidos estratégicamente por aspartato son capaces de reducir la carga negativa induciendo la activación constitutiva de la proteína lo que genera la respuesta hipersensible en ausencia del patógeno *P. syringae*. Hojas de *Nicotiana benthamiana* fueron transformadas con los constructos por separado AvrPTO, PTO, AvrPTO-PTO o AvrPTO-PTO ( $pto^{Y207D}$ ,  $pto^{T204D}$ ), donde demostraron por una lado que la HR se presentaba cuando se coexpresaban los genes *avrPTO* y *PTO* juntos a diferencia de cuando lo realizaron por separado (Figura 1.22b). Los resultados obtenidos de la expresión transitoria de los genes  $pto^{Y207D}$ ,  $pto^{T204D}$  indico que es posible inducir la HR en ausencia del gen AvrPTO. También evaluaron el efecto de dobles mutantes ( $pto^{K59N:Y209D}$ ) en donde observaron que la HR se veía abatida (Rathjen *et al.*, 1999) (Figura 1.22c).



**Figura 1.22** Evaluación de constructos de PTO en combinación con AvrPTO mediante expresión transitoria con *Agrobacterium tumefaciens*. a) Alineamiento de secuencias del dominio de activación de PTO y cAPK, los motivos de las secuencias conservadas se remarcan en negritas, el sitio de activación de la fosforilación en cAPK Thr197 (asterisco). Los residuos que contribuyen a la unión de AVRPTO están subrayados. b) La activación de la RH es específica de PTO silvestre al detectar a AvrPTO, a diferencia de los controles AvrPTO y PTO separados. c) Inducción de la HR con las construcciones mutantes *pto*<sup>T204D</sup> y *pto*<sup>Y207D</sup> expresadas de manera independiente, dobles mutantes en el sitio lazo P+1 abaten la RH. Imagen tomada y modificada de Rathjen *et al.* (1999).

Por otra parte, analizando la función de genes homólogos de la familia de PTO en comparación con PTO de tomate, se demostró que la expresión temporal en *N. benthamiana* de las versiones mutantes generadas de los genes *pPth3*, *efen*, *pPth3* y *ePth5* en los residuos de treonina 204 y tirosina 207 correspondientes a la región lazo P+1 de PTO presentan la respuesta hipersensible en ausencia del patógeno en comparación con las WT (Chang *et al.*, 2002).

La muerte celular tipo HR se da como resultado de la interacción de PTO con la molécula efectora AvrPTO, Vries *et al* en el 2006 demostraron que la interacción de PTO con AvrPTO se da a nivel de la pared celular y para ello requieren un motivo de miristoilación que se ubica en los residuos 1-10 de PTO, los autores observaron que mutaciones realizadas en el residuo de glicina en la posición dos de PTO (G2) compromete la interacción con AvrPTO inhibiendo la HR en *N. benthamiana*.

Estudios recientes evaluaron de manera muy fina la HR causada por el complejo Avr-PTO, haciendo uso del RNA de interferencia silenciaron la expresión del gen Prf y observaron que la HR del complejo es dependiente de la interacción PTO-Prf (Dong *et al.*, 2009).

En conclusión, diversos estudios muestran evidencias de los mecanismos moleculares que PTO lleva a cabo para reconocer a dos secuencias efectoras AvrPTO y AvrPTOB e inducir la HR son dependientes de la interacción con Prf, lo que aun no se ha demostrado es como la interacción PTO-Prf es regulada positiva y negativamente. Por lo que estudios futuros, en particular bioquímicos y estructurales son necesarios para entender cierta regulación.

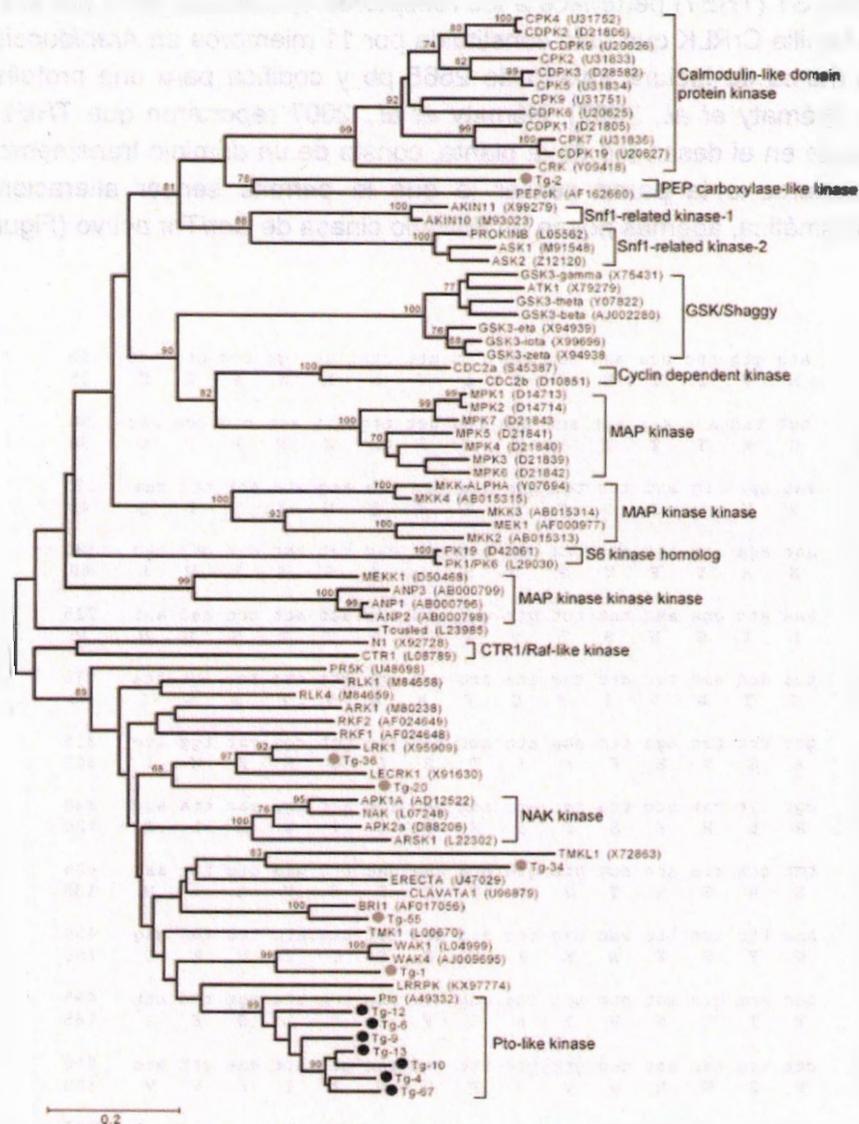
#### 1.1.16 Clonación de homólogos de PTO en otras especies de plantas

Generar resistencia a enfermedades es la prioridad en los programas de mejoramiento genético, por tal motivo múltiples investigaciones han sido desarrolladas para realizar la búsqueda de homólogos de genes de resistencia de diferente clases incluyendo a la clase de cinasas, sin embargo los resultados hasta el momento han sido limitados al estudio de secuencias y dominios característicos de genes R.

Deng and Gmitter en el (2003) emplearon la PCR degenerada para identificar secuencias de candidatos de genes de resistencia (RGC por sus siglas en inglés) presentes en cultivos de naranja híbrido *Citrus grandis* x *P. trifoliata* para evaluar una posible resistencia ante la enfermedad de cancrrosis de los cítricos. Los autores reportan haber obtenido 29 secuencias de la clase RGC que poseen alta similaridad al dominio cinasa del gen de resistencia Xa21 en arroz. En otro estudio la técnica de PCR degenerada fue aplicada para identificar regiones conservadas de la familia de proteínas cinasas Ser/Thr (STK por sus siglas en inglés) en tres diferentes cultivos de fresa (*Fragaria vesca*, *Fragaria chiloensis* y *Potentilla tucumanensis*), el reporte menciona haber identificado siete diferentes clases de STK, donde los alineamientos de sus secuencias de aminoácidos reveló que se conservan los subdominios característicos y los residuos esenciales que son cruciales para la función de PTO, por lo que las secuencias son reportadas como secuencias tipo PTO (Martínez *et al.*, 2008).

Recientes estudios realizados en plantas de plátano cultivar Tuu Gia que presenta resistencia al hongo *Mycosphaerella fijiensis* de tipo HR, fueron enfocados a realizar la búsqueda de genes tipo PTO como una alternativa para generar resistencia en el cultivar Gran Enano que es susceptible al hongo. Este estudio se basó en el uso de oligos degenerados diseñados de tal manera que conservan los subdominios característicos de STKs presentes en plantas con gran afinidad a la proteína PTO de tomate; se reportan 13

secuencias con alta similitud a STKs, de las cuales únicamente siete secuencias fueron clasificadas como candidatos de genes de resistencia tipo PTO (PTO-RGCs) (Peraza Echeverría *et al.*, 2007) (Figura 1.23).



**Figura 1. 23** Árbol filogenético de Neigbor-joining basado en un alineamiento ClustalX de STKs de *Arabidopsis thaliana*, la proteína de resistencia PTO de tomate y Pto-RGCs y otras secuencias tipo STK en plátano. Los nombres de las secuencias poseen los números de acceso otorgados por GenBank, como se puede observar las secuencias PTO-RGCs (círculos negros) se agrupan en un clado junto a PTO. El árbol fue creado con 1000 bootstraps. (Peraza-Echeverría *et al.*, 2007)

### 1.1.17 El gen *THESEUS1* en el desarrollo y su posible papel en la defensa contra patógenos y muerte celular

El gen *THESEUS1* (*THE1*) pertenece a los receptores tipo cinasa (RLK por sus siglas en inglés) de la familia CrRLK que está constituida por 11 miembros en *Arabidopsis thaliana*. Presenta un marco de lectura abierto de 2565 pb y codifica para una proteína de 855 aminoácidos (Hématy *et al.*, 2007). Hématy *et al.*, 2007 reportaron que *THE1* juega un papel importante en el desarrollo de la planta, consta de un dominio transmembranal que le permite anclarse a la pared celular lo que le permite sensar alteraciones en la membrana plasmática, además posee un dominio cinasa de Ser/Thr activo (Figura 1.24).

```

1   atg gtg ttc aca aaa tca tta ctt gtt ctt ctt tgg ttc ctc tct 45
1   M  V  F  T  K  S  L  L  V  L  L  W  F  L  S  15

46  tgt tac act act act act tca tca gct ttg ttt aat ccg cca gac 90
16  C  Y  T  T  T  T  S  S  A  L  F  N  P  P  D  30

91  aat tac ttg atc tct tgt ggc tca tca caa aac ata act ttc caa 135
31  N  Y  L  I  S  C  G  S  S  Q  N  I  T  F  Q  45

136 aac aga atc ttt gtt cca gat tca ctc cac tct tct ctt gta ctc 180
46  N  R  I  F  V  P  D  S  L  H  S  S  L  V  L  60

181 aaa atc gga aac tct tct gtt gca aca tca act act tcc aac aat 225
61  K  I  G  N  S  S  V  A  T  S  T  T  S  N  N  75

226 tca acc aat tcc atc tac caa acc gct cgt gtt ttc tcc agt tta 270
76  S  T  N  S  I  Y  Q  T  A  R  V  F  S  S  L  90

271 gct tct tac aga ttc aaa atc act tct tta ggt cga cat tgg atc 315
91  A  S  Y  R  F  K  I  T  S  L  G  R  H  W  I  105

316 cgt ctt cat ttc tca cct atc aac aac tct act tgg aac tta acc 360
106 R  L  H  F  S  P  I  N  N  S  T  W  N  L  T  120

361 tct gct tca atc act gtc gta aca gaa gac ttc gtg ctc ttg aac 405
121 S  A  S  I  T  V  V  T  E  D  F  V  L  L  N  135

406 aac ttc tcc ttc aac aac ttc aac ggt tct tac atc ttc aaa gag 450
136 N  F  S  F  N  N  F  N  G  S  Y  I  F  K  E  150

451 tac aca gtc aat gtc act tca gag ttc ttg act tta agt ttc att 495
151 Y  T  V  N  V  T  S  E  F  L  T  L  S  F  I  165

496 cct tca aac aat tcg gtg gtc ttt gtc aac gct att gaa gtt gtc 540
166 P  S  N  N  S  V  V  F  V  N  A  I  E  V  V  180

541 tct gtt ccg gat aat ctt atc cct gat caa gct ttg gcg tta aac 585
181 S  V  P  D  N  L  I  P  D  Q  A  L  A  L  N  195

586 cct tca aca cca ttt agt ggt ctc tct ctg ctt gca ttt gaa aca 630
196 P  S  T  P  F  S  G  L  S  L  L  A  F  E  T  210

631 gtc tac aga tta aat atg gga gga cca ttg ttg act tct caa aac 675
211 V  Y  R  L  N  M  G  G  P  L  L  T  S  Q  N  225

676 gat aca ttg ggg aga caa tgg gat aat gat gca gag tat ctt cat 720
226 D  T  L  G  R  Q  W  D  N  D  A  E  Y  L  H  240

721 gtg aac agc tct gtt ctt gtt gta acg gcg aat cct tct tcg att 765
241 V  N  S  S  V  L  V  V  T  A  N  P  S  S  I  255

```

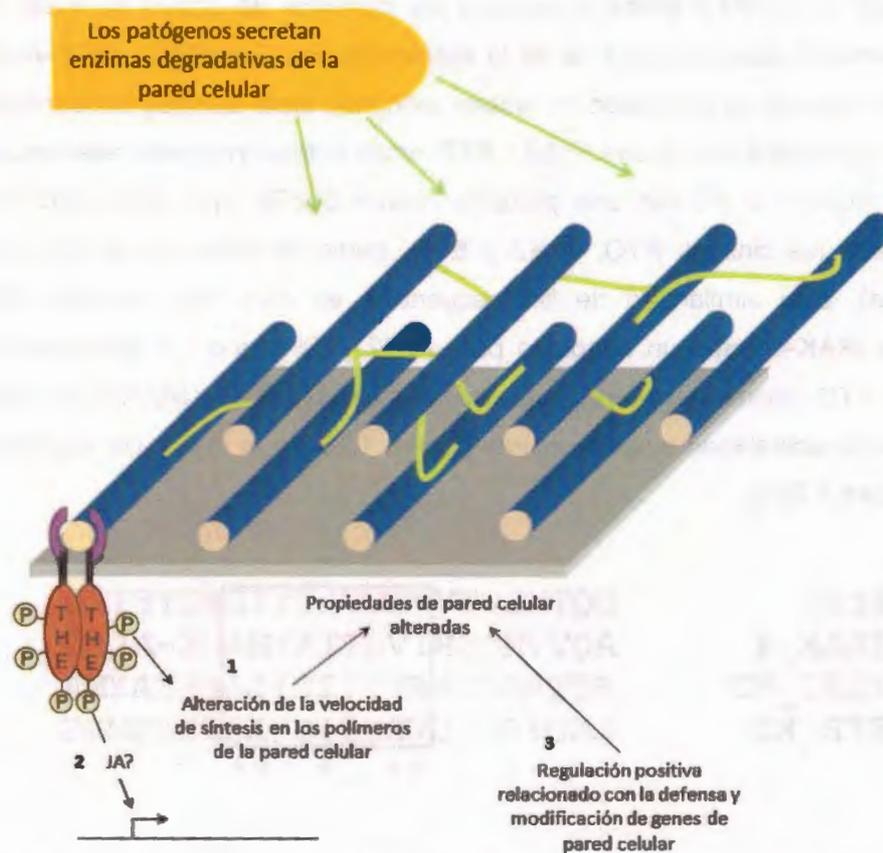
766	aag tac tct cct tct gtg act caa gaa aca gct cct aac atg gtt	810
256	K Y S P S V T Q E T A P N M V	270
811	tat gca act gct gat aca atg ggt gat gct aat gtt gcg agt cca	855
271	Y A T A D T M G D A N V A S P	285
856	agt ttt aat gtt act tgg gtt ctt cct gtt gat cca gac ttc agg	900
286	S F N V T W V L P V D P D F R	300
901	tac ttt gtt cgt gtt cat ttc tgt gat att gtg agt caa gct ttg	945
301	Y F V R V H F C D I V S Q A L	315
946	aac acg ctt gtt ttc aat ctt tat gtg aat gat gat ctt gct ctt	990
316	N T L V F N L Y V N D D L A L	330
991	gga agt ctt gat ctc tct acg ttg act aat ggt ctt aaa gtt cct	1035
331	G S L D L S T L T N G L K V P	345
1036	tac ttt aag gat ttt atc tcc aat ggt tct gtt gaa tct tcc ggt	1080
346	Y F K D F I S N G S V E S S G	360
1081	gtt tta acc gtt agc gtt gga cct gat tca caa gct gat atc act	1125
361	V L T V S V G P D S Q A D I T	375
1126	aat gcg act atg aat ggg tta gag gtt ttg aag att agt aac gaa	1170
376	N A T M N G L E V L K I S N E	390
1171	gct aag agc tta agt ggt gtt tct tcg gtt aag tcg tta ctt ccg	1215
391	A K S L S G V S S V K S L L P	405
1216	gga gga tca ggt tct aag agc aag aag aag gca gtg atc att ggt	1260
406	G G S G S K S K K K A V I I G	420
1261	tct ttg gtt ggt gcg gtt aca ttg att ctg ctg att gct gtt tgt	1305
421	S L V G A V T L I L L I A V C	435
1306	tgc tat tgc tgt ttg gtt gct tca agg aag cag agg tcg acg agt	1350
436	C Y C C L V A S R K Q R S T S	450
1351	cct caa gaa ggc ggt aat gga cat ccg tgg ttg cca tta cct tta	1395
451	P Q E G G N G H P W L P L P L	465
1396	tat gga ctc tct cag act ctt act aaa tca acc gct tct cac aag	1440
466	Y G L S Q T L T K S T A S H K	480
1441	agt gcc aca gct agt tgc att tca tta gct tct act cat ctt gga	1485
481	S A T A S C I S L A S T H L G	495
1486	cgt tgc ttt atg ttt caa gaa atc atg gac gct act aat aag ttc	1530
496	R C F M F Q E I M D A T N K F	510
1531	gat gag agt tcg ttg ctt ggg gtt ggt gga ttt ggc cgc gtt tat	1575
511	D E S S L L G V G G F G R V Y	525
1576	aaa gga act tta gaa gac ggg act aaa gtc gcg gtt aaa aga ggt	1620
526	K G T L E D G T K V A V K R G	540
1621	aac ccg aga tca gaa caa ggt atg gct gag ttc aga aca gag att	1665
541	N P R S E Q G M A E F R T E I	555
1666	gaa atg ctg tca aaa ctc aga cat cga cat ctc gtc tct ctt atc	1710
556	E M L S K L R H R H L V S L I	570
1711	ggt tac tgc gac gag agg tct gaa atg ata ctg gtc tat gag tac	1755
571	G Y C D E R S E M I L V Y E Y	585
1756	atg gcg aat gga ccg ttg agg agt cat cta tat gga gct gat ctt	1800
586	M A N G P L R S H L Y G A D L	600
1801	cct cca ttg tct tgg aaa caa aga ctc gag att tgc atc ggt gca	1845
601	P P L S W K Q R L E I C I G A	615
1846	gcg aga gga tta cat tat cta cac acc ggt gca tcg cag agc att	1890
616	A R G L H Y L H T G A S Q S I	630

1891	ata cac cgt gat gtt aaa acc acg aat atc tta ctc gac gag aat	1935
631	I H R D V K T T N I L L D E N	645
1936	cta gtc gcc aaa gtt gca gac ttt gga cta tcc aaa acc ggc cct	1980
646	L V A K V A	660
1981	tcg ctc gat caa aca cac gtg agc acg gcg gtt aaa gga agc ttt	2025
661		675
2026	ggt tat cta gac ccg gaa tac ttc agg aga cag cag tta aca gag	2070
676	F R R Q Q L T E	690
2071	aaa tca gac gtt tat tcg ttt ggt gtt gta cta atg gaa gta ctc	2115
691	K S D V Y S F G V V L M E V L	705
2116	tgt tgt aga ccg gct tta aac ccg gta tta cct aga gaa caa gtg	2160
706	C C R P A L N P V L P R E Q V	720
2161	aac ata gcg gaa tgg gca atg gcg tgg cag aaa aag ggt ctg cta	2205
721	N I A E W A M A W Q K K G L L	735
2206	gat caa atc atg gac agt aac tta acc ggg aag gtg aac cct gcc	2250
736	D Q I M D S N L T G K V N P A	750
2251	tcg ttg aag aaa ttt gga gaa acc gca gag aaa tgt tta gcg gaa	2295
751	S L K K F G E T A E K C L A E	765
2296	tac ggt gtg gac ccg cct tct atg gga gat gta ttg tgg aat ttg	2340
766	Y G V D R P S M G D V L W N L	780
2341	gag tac gcg tta cag cta gaa gaa aca tct tcg gct ttg atg gag	2385
781	E Y A L Q L E E T S S A L M E	795
2386	cct gat gac aat agt aca aac cac att cca ggg att cca atg gcg	2430
796	P D D N S T N H I P G I P M A	810
2431	cca atg gaa ccg ttt gat aac agt atg agt ata atc gat aga gga	2475
811	P M E P F D N S M S I I D R G	825
2476	gga gta aat tcg ggg acc ggg act gat gat gat gcg gaa gac gcg	2520
826	G V N S G T G T D D D A E D A	840
2521	act act agt gcg gtg ttt tcg cag ctt gtt cat cct cgt gga agg	2565
841	T T S A V F S Q L V H P R G R	

**Figura 1. 24** Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del gen *THE1* de *Arabidopsis thaliana*. Consta de undominio transmembranal (gris) seguido de un dominio cinasa tipo PTO (amarillo). Conserva un dominio de activación de PTO (turqueza), que consiste en los residuos de treonina esenciales para la autofosforilación de la proteína (rojo) y su región lazo P+1 (subrayado) que es de gran importancia para la interacción de la proteína (Genbank No. de accesión NP 200249.1, Hématy *et al.*, 2007).

La pared celular en plantas esta compuesta principalmente por celulosa y hemicelulosa de manera organizada, de modo que ante el ataque de un patógeno este equilibrio se ve afectado. Por una parte se especula que THE1 puede sensar los cambios en la pared celular y activar rutas de señalización involucradas en la síntesis de polímeros para reparar el daño ocasionado y se sugiere por otra parte que se podrían estar activando ciertas rutas de señalización que involucren a fitohormonas como el ácido jasmónico que

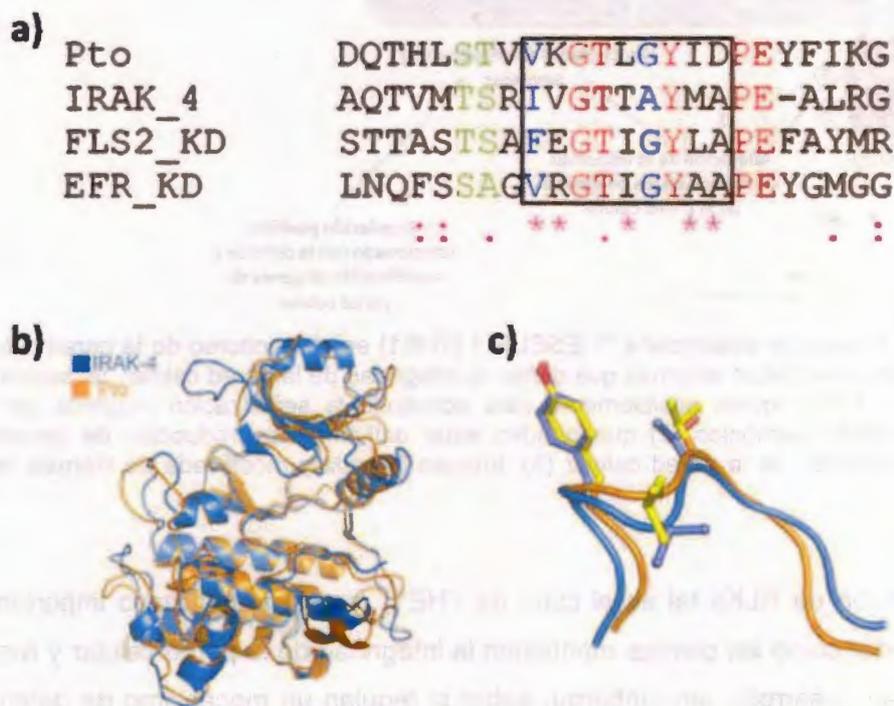
podiera jugar un papel en la defensa contra ataque por patógenos (Hématy *et al.*, 2007) (Figura 1.25.)



**Figura 1. 25** Papel que desempeña THESEUS 1 (THE1) en el monitoreo de la pared celular. 1) Los patógenos secretan enzimas que dañan la integridad de la pared celular, tal suceso es detectado por THE1, quien posiblemente este activando la señalización mediada por las hormona de ácido jasmónico (2) que pueden estar activando la producción de genes de defensa y reparación de la pared celular (3). Imagen tomada y modificada de Hématy *et al.* (2007).

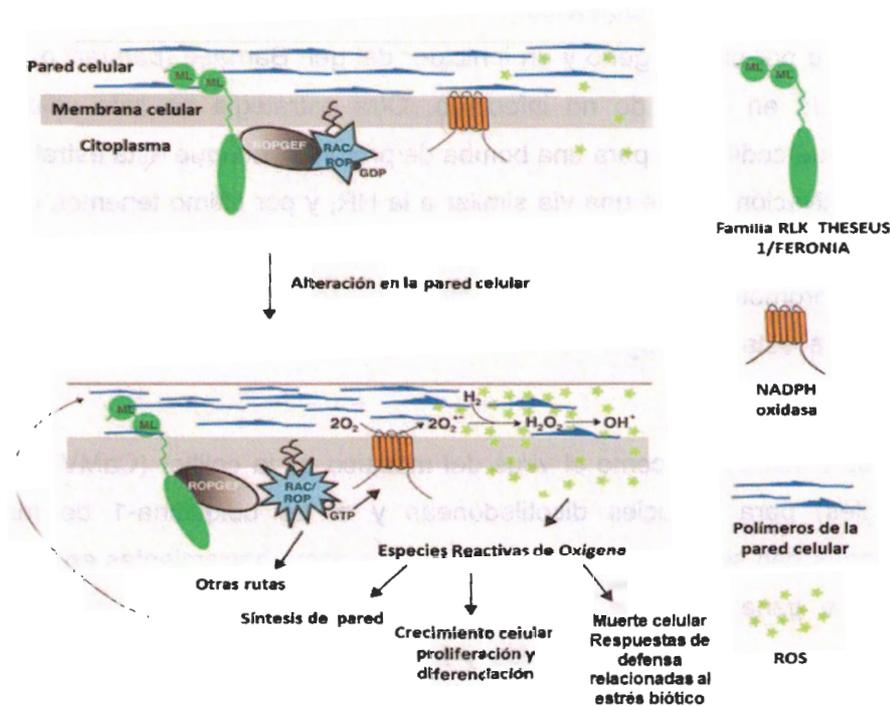
La identificación de RLKs tal es el caso de THE1, representa un paso importante para poder entender como las plantas mantienen la integridad de la pared celular y regulan de esta forma su desarrollo, sin embargo, saber si regulan un mecanismo de defensa ante posibles ataque ante patógenos es aun desconocido. Xiang y colaboradores en el 2008, demostraron que la molécula efectora AvrPTO de *P. syringae* interactúa físicamente con los dominios de cinasa de los receptores FLS2 (sensible a flagelina y EFR (receptor del factor de elongación Tu) de *A. thaliana*, dando las primeras bases de que estos receptores pueden estar involucrados en una mecanismo de defensa y activen la

respuesta inmune en la planta, a diferencia de la proteína cinasa Ser/Thr PKS3 involucrada en respuesta a salinidad. De igual manera observaron que la mutación Y89D en la molécula de AvrPTO inhibe la unión a los dominios de cinasa de FLS2 y EFR. Además observaron que para que se de la interacción FLS2-AvrPTO y PTO-AvrPTO la secuencia del dominio de activación de ambas proteínas debe ser muy conservada. Para determinar si los receptores cinasa FLS2 y EFR están estructuralmente relacionados con PTO, ellos utilizaron a IRAK-4 una proteína cinasa Ser/Thr que esta estrechamente relacionada con las cinasas PTO, FLS2 y EFR, particularmente en el sitio lazo P+1 (Figura 1.26a), esta similitud de las secuencias en este sitio permitió utilizar la estructura de IRAK-4 como un templado para FLS2 y EFR que fue comparado con la estructura de PTO, donde se observó que estas dos cinasas PTO y IRAK-4 son altamente similares cuando sobrelapan sus estructuras (Figura 1.26b) y la región correspondiente al lazo P+1 (Figura 1.26c):



**Figura 1. 26** La relación de receptores cinasa y PTO. a) Alineamiento múltiple de la región lazo P+1 (recuadro) de FLS2, EFR de *A. thaliana*, IRAK-4 de humano y PTO de tomate. b) Superposición de la estructura tridimensional de PTO con IRAK-4, se puede observar que son altamente similares. c) Comparación de la región del lazo P+1 de PTO con IRAK-4, los tres residuos del lazo P+1 de PTO y IRAK-4 son mostrados en amarillo (Xiang *et al.*, 2008) .

Recientemente Cheug y Wu en el 2011 propusieron que la interacción THESEUS1/FERONIA es esencial para mantener la integridad de la pared celular de la planta, sin embargo plantean que estas proteínas podrían estar involucradas en otro tipo de respuesta. FERONIA interactúa con el complejo RAC/ROP y participa en la regulación de la respuesta ante estrés biótico y abiótico mediado por la presencia de ROS involucrados en el crecimiento y desarrollo de la planta, por otra parte podrían jugar un papel esencial en la regulación de la defensa ante patógenos mediante la muerte celular programada (Figura 1.27).



**Figura 1.27** Mecanismo de la posible función de la familia LRK THESEUS1/FERONIA. El modelo es resultado de estudios realizados en *Arabidopsis thaliana*. THESEUS1 es activado a partir de alteraciones generadas en la pared celular y su interacción con otras moléculas como la NADPH inducen la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y finalmente la activación de diversas rutas de señalización que pueden conducir a la muerte celular y a respuestas de defensa al estrés biótico. Imagen tomada y modificada de Cheung y Wu (2011).

THESEUS1 es una proteína que posee un dominio de cinasa que presenta homología con el dominio de cinasa de la proteína de resistencia PTO de tomate por lo que resulta interesante determinar si realmente esta proteína está involucrada en la muerte celular como es el caso de PTO, y evaluar si esta muerte celular es del tipo respuesta hipersensible para generar resistencia a patógenos biótrosos o hemibiótrosos.

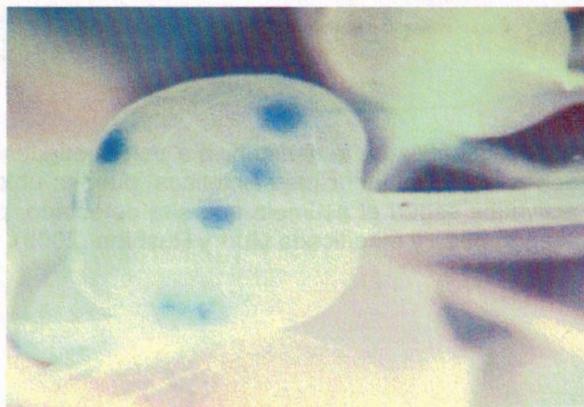
### 1.1.18 Estrategias de ingeniería genética para desarrollar resistencia a patógenos en plantas mediante la inducción de la muerte celular programada

La respuesta hipersensible (HR) es un mecanismo de muerte celular programado que se plantea como una estrategia para generar la resistencia de plantas ante agentes patógenos. Varios estudios se han enfocado en poder generar la HR de manera artificial. Mourgues y colaboradores en 1998 propusieron diferentes sistemas basados en dos componentes para generar resistencia: sistema de genes R y avr donde expresan un gen de resistencia bajo el control de un promotor inducible, el sistema de genes Barnase y basta expresando un gene ribonucleasa bacteriano (Barnase) bajo el control de un promotor inducible por un patógeno y un inhibidor del gen Barnase (barstar) para reducir el fondo generado en un tejido no infectado. Otra estrategia ha sido utilizar genes bacterianos *bO* que codifiquen para una bomba de protones, aunque esta estrategia no es muy clara, su activación induce una vía similar a la HR, y por último tenemos un sistema basado en el uso de proteínas cinasas mutantes que induzcan la HR (ejemplo PTO) bajo el control de un promotor inducible por un patógeno específico (Rathjen *et al.*, 1999). Un factor esencial de esta estrategia es identificar o diseñar un promotor inducible a un patógeno específico.

Los promotores constitutivos como el virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S por sus siglas en inglés) para especies dicotiledóneas y el de ubiquitina-1 de maíz para monocotiledóneas han sido frecuentemente utilizados como herramientas en los ensayos de expresión de genes en diversas plantas. Con esos promotores se han logrado sobreexpresar genes en diferentes tejidos y fases de desarrollo de las plantas con el objetivo de evaluar la pérdida o ganancia de función. Sin embargo, ciertos genes al ser sobreexpresados constitutivamente por la célula generan cambios que se manifiestan en malformaciones en la planta y en algunos casos el silenciamiento de los genes estudiados (Vaucheret *et al.*, 1998). Por tal motivo, una estrategia para generar plantas resistentes a patógenos que no muestren estas anomalías en el desarrollo es mediante el uso de promotores inducibles que se activen en respuesta a factores bióticos ó abióticos de manera específica. Hasta el momento el número de promotores inducibles estudiados es limitado, Hahn & Strittmatter en el 2004 reportaron que el promotor del gen de defensa *Pgst1* aislado de papa mostró una activación transcripcional local en respuesta a diferentes tipos de interacciones con microorganismos. Un ejemplo fue la transformación temporal de cultivares de manzana en donde se utilizó el promotor *Gst1* de papa

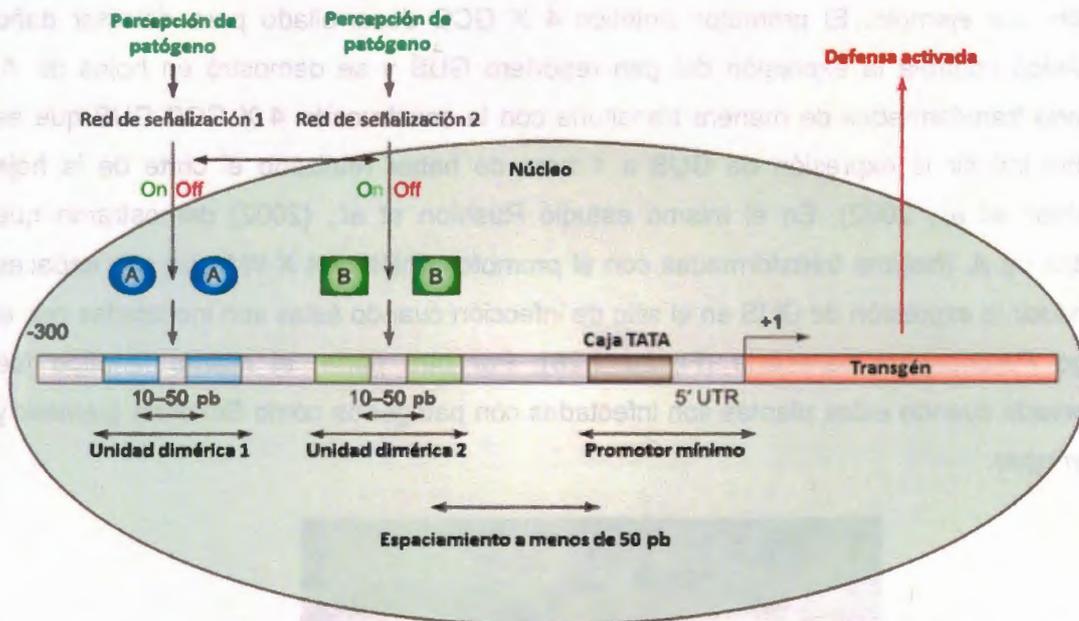
fusionado al gen reportero *iudA*, los resultados mostraron que el promotor es activo ante la presencia del hongo *Venturia inaequalis* y la bacteria *Erwinia amylovora*. Estos resultados fueron comparados con líneas que expresaban el gen *uidA* fusionado al promotor CaMV35S, los autores reportan una menor expresión en el promotor inducible, sin embargo demostraron que el uso de promotores de otras especies pueden ser activo en otras plantas (Malnoy *et al.*, 2006).

Actualmente son pocos los promotores inducibles a patógenos que han sido identificados, sin embargo representan una gran alternativa para desarrollar estrategias de resistencia ante patógenos específicos. El desarrollo de promotores sintéticos inducibles es otra opción, por ejemplo: El promotor sintético 4 X GCC desarrollado para detectar daño mecánico controla la expresión del gen reportero GUS y se demostró en hojas de *A. thaliana* transformadas de manera transitoria con la construcción 4 X GCC-GUS que es posible inducir la expresión de GUS a 1 hora de haber realizado el corte de la hoja (Rushton *et al.*, 2002). En el mismo estudio Rushton *et al.*, (2002) demostraron que plantas de *A. thaliana* transformadas con el promotor sintético 4 X W1 que son capaces de inducir la expresión de GUS en el sitio de infección cuando estas son inoculadas con el hongo *Peronospora parasítica* (Figura 1.28); Por otra parte, el mismo fenotipo fue observado cuando estas plantas son infectadas con patógenos como *Blumeria graminis* y *P. syringae*.



**Figura 1. 28** Expresión inducible del gen reportero *uidA* en hojas de *A. thaliana* inoculadas con *Peronospora parasítica* pv *Cala2*. La expresión local del gen reportero *uidA* estuvo dirigida por el promotor sintético 4 X W1, las manchas azules representan el sitio de inoculación de *P. parasítica*. (Rushton *et al.*, 2002).

En los últimos años se han comenzado a desarrollar nuevas estrategias para poder generar resistencia ante estreses bióticos ó abióticos. Gurr y Rushton en el 2005 hacen énfasis en el uso de promotores sintéticos inducibles, como una alternativa para generar la resistencia a patógenos. Estos autores proponen que es posible generar un sistema basado en varios promotores inducible que expresen al gen de interés dependiendo las condiciones de estrés presentes, esto se refiere a un sistema inducible que pueda detectar a diferentes patógenos (Figura 1.29).



**Figura 1. 29** Uso de la ingeniería genética en la resistencia a enfermedades. Los sistemas de resistencia que contengan dos promotores inducibles sintéticos, pueden ubicarse a distancias de 50 pb, que puedan ser activados según el estímulo que sea detectado, pudiendo ser ante estrés biótico o abiótico. Imagen tomada y modificada Gurr y Rushton (2005).

---

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Los cultivos de plátano y papaya tienen problemas de enfermedades provocadas por virus, bacterias, hongos o nematodos. Como ejemplo de estas enfermedades está la Sigatoka negra que afecta al cultivo de plátano y la antracnosis que afecta al cultivo de papaya, y que en México ocasionan pérdidas que van desde un 40% hasta un 100% de la producción anual.

Para su control se hace un uso intensivo y extensivo de pesticidas, lo que incrementa el riesgo de perturbar al ambiente y provocar daños a la salud humana, además de representar una inversión de aproximadamente un 50% de las ganancias obtenidas por cada cultivo. Este escenario pone de manifiesto la necesidad de realizar más investigación que permita descubrir aquellos genes involucrados en la resistencia a estas enfermedades y que sean útiles para la generación de nuevas variedades de plátano y papaya genéticamente resistentes que no requieran el uso de pesticidas o en su caso reducir de manera significativa el uso de los mismos.

La disponibilidad de la secuencia genómica de plátano y papaya ha abierto la posibilidad de la identificación, caracterización y utilización de manera sistemática de genes con el potencial de conferir resistencia a las enfermedades de estos cultivos. Entre estos genes candidatos está *THESEUS1*, el cual se ha postulado que funciona como un sensor de perturbaciones de la pared celular que podría estar involucrado en la muerte celular programada y resistencia a patógenos, por lo que este gen es un caso interesante para estudiar en plátano y papaya. El conocimiento generado en esta investigación podría asistir en un futuro a la generación de nuevas variedades de plátano y papaya resistentes a las enfermedades que afectan la producción de plátano y papaya. De tal forma este tipo de investigación responde a las recomendaciones de la FAO (2010) para hacer frente a los retos de seguridad alimentaria que afrontan los países en desarrollo.

### **1.3 HIPÓTESIS**

Los dominios de cinasa de secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya comparten una estructura similar con la proteína de resistencia PTO y están involucrados en la muerte celular.

### **1.4 OBJETIVOS**

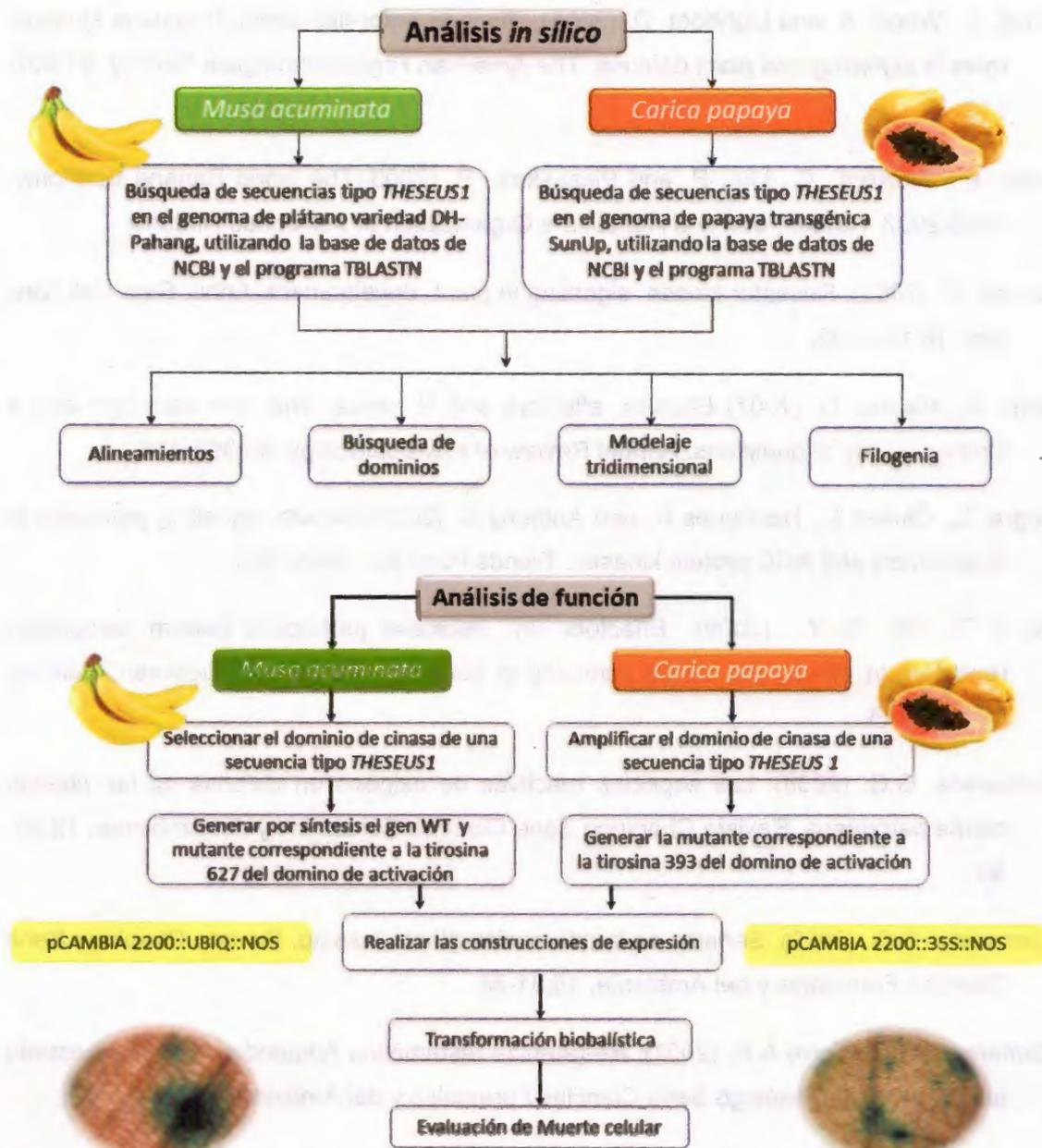
#### **1.4.1 General**

Caracterizar la estructura, filogenia y función de genes tipo *THESEUS1* en los cultivos tropicales de plátano y papaya.

#### **1.4.2 Particulares**

- a) Caracterizar *in silico* la estructura y filogenia de genes tipo *THESEUS1* en plátano y papaya.
- b) Evaluar la función del dominio de cinasa de genes tipo *THESEUS1* de plátano y papaya en la muerte celular.

1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



---

## 1.6 BIBLIOGRAFÍA

- Afzal. A., Wood. A. and Lightfoot. D. (2008). Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *The American Phytopathological Society*. 21:507-517.
- Arias. P., Dankers., C., Liu., P. and Pikauskas., P. (2003). *The world Banana Economy, 1985-2002*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Becraft. P. (2002). Receptor kinase signaling in plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18:163-192.
- Bent. A., Mackey D. (2007) Elicitors, effectors and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology*. 45:399-436.
- Bögre. L., Ökrész L., Henriques R. and Anthony R. (2003). Growth signalling pathways in *Arabidopsis* and AGC protein kinases. *Trends Plant Sci.* 8:424-431.
- Boller. T., He S. Y. (2009) Effectors in microbial pathogens pattern recognition receptors in plants and innate immunity in plants: An arms race between. *Science* 324: 742-44.
- Camarena. G.G. (2006). Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 12:25-30
- Camarena. G.G. (2009). Señales en la interacción planta insecto. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 15:81-85.
- Camarena. G.G., Torre A.R. (2007). Resistencia Sistemática Adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 13:157-162.
- Canchignia. M. H., Sigeha. S. L., Toaquiza. S. J., Ramos. G. L., Saucedo. A. S., Carranza. P. M. and Cevallos. F. o. (2008). Alternativas para la propagación in vitro de plátano variedad maqueño (*Musa balbisiana* AAB). *Ciencia y Tecnología*. 1:43-48.
- Chang. S. and Martin G. (2010). Effector- triggered immunity mediated by the PTO kinase. *Cell*. 20:1-9.

- Cheung A. and Wu. H. (2011). THESEUS1, FERONIA and relatives: a family of cell wall-sensing receptor kinases?. *Current Opinion in Plant Biology*. 14:632-641.
- Chinchilla. D., Zipfel. C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., Jones J., Felix G. and Boller T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448:497–500.
- 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.
- Churchill. C.A. (2010). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*. 1-22.
- Claridades Agropecuarias (1999). Papaya un Mercado en expansión. Claridades Agropecuarias. México. Marzo. Pp 3-24.
- Collier. S. and Moffett. P. (2009). NB-LRRs work a "bait and switch" on pathogens. *Cell*. 10:521-529.
- Collinge, DB; Gregersen, P; Thordal-Christensen, H. (1994). The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. in *Mechanisms of plant growth and improved productivity, Modern approaches*. Basra, AS. Ed. New York, Marcel Dekker. p. 391-433.
- Crane., H.J. y Balerdi, F.C. (1998). Los plátanos en Florida. University of Florida. pp. 11.
- Cronauer. S.S. & A.D. Krikorian. 1988. Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana *Musa ornata* Roxb. *Plant Cell Rep* 7:23-25.
- Dardick. C. and Ronald P. (2006). Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLoS Pathog*. 2:1-15.
- De Langhe., E. (1996). Banana and plantain: The earliest fruit crops?. In *INIBAP Annual Report 1995*. Montpellier, France, INIBAP. pp. 6-8.
- De Young. B., and Innes R. (2006). Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. *Nat. Immunol*. 7:1243-1249.

- Deng. Z. and Gmitter. F. (2003). Cloning and characterization of receptor kinase class disease resistance gene candidates in Citrus. *Theor Appl Genet.* 108:53-61.
- Dheda. D., F. Dumortier, B. Panis, D. Vuylsteke & E. De Langhe.(1991). Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* spp. ABB group). *Fruits* 46:125-135.
- Dong. J., Xiao F., Fan. F., Gu. L., Cang. H., Martin. G. y Chai. J. (2009). Crystal Structure of the Complex between *Pseudomonas* Effector AvrPTOB and the Tomato PTO Kinase Reveals Both a Shared and a Unique Interface Compared with AvrPTO-PTO. *The Plant Cell.* 21:1846-1859.
- Durrant. W.E., Dong X. (2004) Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology.* 42:185-209.
- D'Hont. A., Denoeud F., Aury J., Baurens F., Carreel F., Garsmeur O., Noel B., Bocs S., Droc G., Rouard M., Da C., Jabbari K., Cardi C., Poulain J., Souquet M., Labadie K., Jourda C., Lenggellé J., Rodier M., Alberti A., Bernard M., Correa M., Ayyampalayam S., Mckain M., Leebens J., Burgess D., Freeling M., Mbéguié D., Chabannes M., Wicker T., Panaud O., Barbosa J., Hribova E., Heslop P., Habas R., Rivallan R., Francois P., Poiron C., Kilian A., Burthia D., Jenny C., Bakry F., Brown S., Guignon V., Kema G., Dita M., Waalwijk C., Joseph S., Dievart A., Jaillon O., Leclercq J., Argout X., Lyons E., Almeida A., Jeridi M., Dolezel J., Roux N., Risterucci A., Weissenbach J., Ruiz M., Glaszmann J., Quériér F., Yahiaoui N. and Wincker P. (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature.* 488: 213-219.
- Escalant. J.V. & C. Teisson. 1989. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. *Plant Cell Rep* 7:181-186.
- Escalant. J.V., C. Teisson & F.X. Côte. 1994. Amplified Somatic Embryogenesis from male flowers of triploid Banana and plantain cultivars (*Musa* sp). *In Vitro Cell Biol Devpmt.* 30:181-186.
- Gonsalves D. (1998). Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Annual Review of Phytopathology.* 36:415-437.

- González. A.G., Cruz V.R., Ayala Z.J., Robles S.M., Ruíz C.S., Tejedor E.W., Álvarez P.E. (2007). Efecto de tratamiento con antioxidantes sobre la vida de anaquel de frutos tropicales mínimamente procesados: Cambios fisiológicos y bioquímicos. In: procesado mínimo de frutas. Editorial Instituto canario de Investigaciones Agrarias. pp 37-54.
- Guo. H., Ye H., Li L and Yin Y. (2009). A family of receptor-like kinases are regulated by BES1 and involved in plant growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*. 4:784-786.
- Gurr. S. and Rushton P. (2005). Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it?. *TRENDS in Biotechnology*. 23:283-290.
- Guzmán. D.G. (1998). Guía para el cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.). La Uruca San Jose, Costa Rica. pp.10-14.
- Guzmán. R.E., Gómez A.R., Pohlan H. Álvares R.J., Pat F.J., Geissen V. (2008). La producción de papaya en Tabasco y los retos del desarrollo sustentable. *El Cotidiano*. 23:99-106.
- Grapin A., J. Schwendiman & C. Teisson. (1996). Somatic embryogenesis in planta in banana. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*.32:66-71
- Grapin A., J.L. Ortiz, R. Domergue, J. Babeau, S. Monmarson, J.V. Escalant, C. Teisson & F.X. Côte. (1998). Obtención de callos embriogénicos, iniciación y regeneración de suspensiones celulares embriogénicas a partir de flores inmaduras masculinas y femeninas de *Musa*. *INFOMUSA* 7(1):13-15.
- Hahn. K. and trittmatter G. (1994) Pathogen defence gene *prp1-1* from potato encodes an auxin responsive glutathione S-transferase. *Eur. J. Biochem*. 222:619-626.
- Heath. M.C. (2000) .Hypersensitive response-related death.*Plant Molecular Biology* 44:321D334.
- He P.S., Sheen J. (2007). Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions.*Cellular Microorganismology* 9: 1385-96

- Heese. A., Hann D., Gimenez S., Jones A., He K., Li J., Schroeder J., Peck S. and Rathjen J. (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:12217–12222.
- Hématy. K., Sado P., Tuinen A., Rochange S., Desnos T., Balzergue S., Pelletier S., Renou J. and Höfte H. (2007). A receptor-like kinase mediates the response of *Arabidopsis* cells to the inhibition of cellulose synthesis. *Current Biology*. 17:922-931.
- Hofius. D., Schultz T., Joensen J., Tsitsigiannis D., Petersen N., Mattsson O., Jorgensen L., Jones J., Mundy J. and Petersen M. (2009). Autophagic Components Contribute to Hypersensitive Cell Death in *Arabidopsis*. *Cell*. 137:773-783.
- Hückelhoven. R., Fodor. J., Trujillo. M. and Kogel. K. (2000). Barley Mla and Rar mutants compromised in the hypersensitive cell death response against *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* are modified in their ability to accumulate reactive oxygen intermediates at sites of fungal invasion. *Planta*. 212:16-24.
- Jiménez D.J. (2002). Manual Práctico para el Cultivo de la Papaya Hawaiana. EARTH 1ª edición.pp.3.
- Jones D. (2000). Diseases of Banana, Abacá and Enset. CAB international. pp.7-8.
- Jones, J.D., Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- Jordan M., Velez D., Armijos R. (2009). Biotechnologies applicable to the development of some Caricaceae species cultivated in the Andean Region: advances and problems. *Revista Colombiana de Ciencias Hostícolas*. 3:9-17.
- Kemmerling B., Schwedt A., Rodriguez P., Mazzotta S., Frank M., Qamar S., Mengiste T., Betsuyaku S., Parker J., Müssing C., Thomma B., Albrecht C., Vries S., Hirt H. and Nürnberger T. (2007). The BRI1-Associated Kinase 1, BAK1, Has a Brassinolide-Independent Role in Plant Cell-Death Control. *Current Biology*. 17:1116-1122.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R.A., Lamb, C. (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Liu. Z., Zhang. Z., Faris. J., Oliver. R., Syme. R., McDonald. M., McDonald. B., Solomon. P., Lu. S., Shelver. W., Xu. S. and Friesen. T. (2012). The Cysteine Rich Necrotrophic

Effector SnTox1 Produced by *Stagonospora nodorum* Triggers Susceptibility of Wheat Lines Harboring *Snn1*. Plos Pathogens. 8:1-24.

Madriz K.(2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas. 63:22-32.

Manshardt. R., Drew R.A. (1998). Biotechnology of papaya.*Acta Horticulturae*.461:65-73.

Marcelino L., Gonzáles V., Ríos D. (2004). El cultivo de plátano en Panamá. Impresora Pacífico. pp.21-21.

Martín-Prevel, P. (1979). La Fisiología de la Platanera en Relación con las Prácticas de Cultivo. Colegio Oficial de Ingenieros Agrónomo de Madrid Santa Cruz de Tenerife. pp.98.

Martin. G., Brommonschenkel S., Chunwongse J., Frary A., Ganai W., Spivey R., Wu T., Earle E. and Tanksley S. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato.Science. 262:1432-1436.

Martínez. M., Castagnaro A. and Díaz R. (2008). Genetic Diversity of Pto-Like Serine/Threonine kinase disease resistance gene in cultivated and wild strawberries. J Mol Evol. 67:211-221.

Marshall. D. S. (1956).The settlement of Polynesia. Scientific Amer. (1195): 59-72.

Ma S.S. 1991 Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture of banana.Pp. 181-188 In Proceedings of Symposium on Tissue culture of horticultural crops, Taipei, Taiwan, 8-9 March 1988.

Merchán V.V. (2002). Manejo integrado de plagas del plátano y el banano. Memorias XV en Cartagena de Indias Colombia. 353-361.

Malnoy M., Reynoird J., Borejsza E. and Aldwinckle H. (2006).Activation of the pathogen inducible *Gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apples (*Malus x domestica*).Transgenic research. 15:83-93.

Ming R., Hou S., Feng Y., Yu Q., Dionne L.A., Saw J.H., Senin P., Wang W., Ly B.V., Lewis K.L., Salzberg S.L. Feng L., Jones M.R., Skelton R.L., Murray J.E., Chen C., Qian W., Shen J., Du P., Eustice M., Tong E., Tang H., Lyons E., Paull R.E., Michael

- T.P., Wall K., Rice D.W., Albert H., Wang M.L., Zhu Y.J., Schatz M., Nagarajan N., Acob R.A., Guan P., Blas A., Wai C.M., Ackerman C.M., Ren Y., Liu C., Wang J., Na J.K., Shakirov E.V., Haas B., Thimmapuram J., Nelson D., Wang X., Bowers J.E., Gschwend A.R., Delche A.L., Singh R., Suzuky J.Y., Tripathi S., Neupane K., Wei H., Irikura B., Paidi M., Jiang N., Zhang W., Presting G., Windsor A., Navajas P.R., Torres M.J., Feltus F.A., Porter B., Li Y., Burroughs A.M., Luo M.C. Liu L., Christopher D.A., Mount S.M., Moore P.H., Sugimura T., Jiang J., Schuler M.A., Friedman V., Mitchell O.T., Shippen D.E., dePamphilis C.W., Palmer J.D., freeling M., Paterson A.H., Gonsalves D., Wang L., Alam M. (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*. 452:991-996.
- Mourgues F., Brisset M. and Chevreau E. (1998). Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Trends Biotechnology*. 16:203-210.
- Mu J., Lee H. and Kao T. (1994). Characterization of a pollen expressed receptor-like kinase gene of *Petunia inflata* and the activity of its encoded kinase. *Plant Cell* 6:709-721.
- Mur L., Kenton P., Lloyd A., Ougham H. and Prats E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. *Journal of Experimental Botany*. 59:501-520.
- Nicholson. R.L.; Hammerschmidt, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 30: 369-389.
- Nishimura. I., Hatsugai N., Nakaune S., Kuroyanagi M. and Nishimura M. (2005). Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Current Opinion in Plant Biology*. 8:404-408.
- Novak. F.J., R. Afza, M. Van Duren, M. Perea-Dallos, B.V. Confer & T. Xiolang. 1989. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). *Bio/Technology* 46:125-135.
- Palencia. G.E., Gómez, S.R. y Martín, S.J. (2006). Manejo Sostenible del Cultivo de Plátano. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. pp. 8-10.
- Paxton. J.D. 1981 .Phytoalexins a working redefenition. *Phytopathology* Z.101:106-109.

- Peraza Echeverría S., James A., Canto B. y Castillo E. (2007). Structural and phylogenetic analysis of Pto-type disease resistance gene candidates in banana. *Mol Genet Genomics*. 278:443-453.
- Pérez. Y., Galindo I. y Arvelo F. (2007). La muerte celular programada en las plantas: ¿es semejante a la "apoptosis" en animales?. *INTERCIENCIA*. 32: 812-819.
- Pieterse C.M., León R.A., Van der Ent S., Van W.S. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5:103-316.
- Plan Rector del Sistema Nacional del Plátano. (2010). SAGARPA. México.
- Plan Rector del Sistema Nacional de Papaya (2006). SAGARPA. México
- Poghosyan A., Zehfuss G., Jiménez M. (2005). Papaya Diseases: Ecology and Control. *Encyclopedia of Pest Management*. 1:1-5.
- Rathjen. J., Chang J., Staskawicz B and Michelmore R. (1999). Constitutively active PTO induces a Pfr-dependent hypersensitive response in the absence of avrPTO. *The EMBO Journal*. 18:3232-3240.
- Reynolds. P.K. (1927). *The banana: Its History, Cultivation and Place Among Staple Foods*. Cambridge, MA, Houghton Mifflin. p. 13-38.
- Rodríguez. M., Morales J., Chavarría J. (1985). Producción de Plátanos (Musa AAB, ABB). *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza*. p.2-7.
- Rushton. P., Reinstädler A., Lipka V., Lippok B. and Somssich E. (2002). Synthetic Plant Promoters Containing Defined Regulatory Elements Provide Novel Insights into Pathogen- and Wound-Induced Signaling. *The Plant Cell*. 14:749-762.
- SAGARPA (2009). Estudio de oportunidades de mercado e inteligencia comercial internacional de Papaya Mexicana e identificación de necesidades de infraestructura logística.
- Sancho B.E., Baraona C.M. (1998). Piña y Papaya fruticultura especial 3. *Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica*.p.47-50.

- Schoofs H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. PhD thesis, KULeuven, Belgium. 257pp.
- Sessa G., Ascenzo D. y Martin G. (2000). Thr38 y Ser198 are PTO autophosphorylation sites required for the Avr-PTO-mediated hypersensitive response. *EMBO Journal*. 19:2257-2269.
- Simmonds, N.W. Shepherd, K. (1955). The taxonomy and origins of cultivated bananas. *Journal of the Linnean Society of London Botany*. 55:302-312.
- Simmonds, N.W. (1987). Bananas. Longman Group UK Ltd. Third edition pp.2-5.
- Simmonds, N.W. (1995). Bananas in evolution of Crop Plants. 2 ed. Smart, J; Simmonds, N.W. Ed. Essex, England, Longman Scientific and Technical. pp. 370-375.
- Subramanyam. K., Subramanyam. K., Sailaja. K. V., Srinivasulu. M. and Lakshmidivi. K. (2011) Highly efficient Agrobacterium-mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration. 30: 425-436.
- Shah K., Vervoort J. and de Vries S. (2001). Role of threonines in the Arabidopsis thaliana somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. *J. Biol. Chem*. 276:41263-41269.
- Strosse H., Domergue R., Panis B., Vicent J., Cote F. (2003). Suspensiones de células embriogénicas de banana y plátano. Promusa. pp.8-32.
- Tang X., Xie M., Kim Y., Zhou J., Klessin D. and Martin G. (1999). Overexpression of PTO activates defense responses and confers broad resistance. *The Plant Cell*. 11: 13-29.
- Teixeria da Silva J.A., Rashid Z., Tan N.D., Sivakumar D., Gera A., Teixeira S.M. y Tennant P. (2007) Papaya (*Carica papaya* L.) Biology and Biotechnology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*. 1:47-63.
- Thordal H., Zhang Z., Wei Y. and Collinge D. (1997). Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*. 11:1187-1194.

- Van. Loon, LC; Van Kammen, RT. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsun NN". Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40:199-211.
- Van. der R. and Kamoun S. (2008). From Guard to Decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors. *The Plant Cell*. 20: 2009-2017.
- Van. Verk M.C., Gatz C., Linthorst H. (2009). Transcriptional Regulation of Plant Defense Responses. *Advances in Botanical Research*. 51:397-348.
- Vaucheret. H., Béclin C., Elmayer T., Feuerbach F., Godon C., Morel J., Mourrain P., Palauqui J. and Vernhettes S. (1998). Transgene induced gene silencing in plants. *The plant journal*. 16:651-659.
- Vries. J., Andriotis V., Wu A. and Rathjen J. (2006). Tomato Pto encodes a functional N-myristoylation motif that is required for signal transduction in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*. 45:31-45.
- Xiang. T., Zong. N., Zou. Y., Wu. Y., Zhang. J., Xing. W., Li. Y., Tang. X., Zhu. L., Chai. J. and Zhou. J. (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current Biology*. 18:74-80.
- Xing. W., Zou Y., Liu Q., Liu J., Luo X., Huang Q., Chen S., Zhu L., Bi R., Hao Q., Wu J., Zhou J. and Chai J. (2007). The structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein AvrPTO. *Nature*. 449:243-248.
- Zavala. L.M., Tun S.J., Alejo C., Ruíz S.E., Gutiérrez A., Vázquez C.M., Méndez G.R. (2005). Control Postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (penz) sacc.a fungicidas organosintéticos. *Revista Chapingo*. 11: 251-255.
- Zong. N., Xiang T., Zou Y., Chia J. and Zhou J. (2008). Blocking and triggering of plant immunity by *Pseudomonas syringae* effector AvrPTO. *Plant Signaling & Behavior*. 3:583-585.



---

---

## CAPÍTULO II

### CARACTERIZACIÓN *IN SILICO* DE SECUENCIAS TIPO *THESEUS1* EN LOS CULTIVOS DE PLÁTANO Y PAPAYA

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

El plátano y la papaya son cultivos tropicales altamente apreciados en todo el mundo por su contenido nutricional, energético y medicinal. Además su producción y comercialización representan una importante fuente de empleos y divisas para los países productores. No obstante ambos monocultivos son muy susceptibles a enfermedades ocasionadas por virus, bacterias, hongos y nematodos. Ejemplo de estas enfermedades son la Sigatoka negra ocasionada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* que afecta al plátano y la antracnosis ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloesporioides* que afecta a la papaya. Hasta el momento el método más efectivo para el control de estos patógenos es el uso de pesticidas, sin embargo la aplicación intensiva y extensiva de estos productos químicos es costoso y pone en riesgo al ambiente y a trabajadores que laboran en las plantaciones y contaminación del ambiente.

Una solución ideal a estas problemáticas sería el desarrollo de nuevas variedades genéticamente resistentes a estas enfermedades. No obstante el conocimiento que se tiene de los genes involucrados en la resistencia contra patógenos en estos cultivos es muy limitado. Este escenario promete cambiar gracias a la reciente publicación de la secuencia genómica de papaya (Ming *et al.*, 2008) y de la secuencia genómica de plátano (D'Hont *et al.*, 2012). Esta información facilitará la caracterización sistemática de todos los genes de plátano y papaya involucrados en la resistencia a estrés biótico, lo que seguramente facilitará el mejoramiento genético de estos cultivos.

Las plantas cuentan con mecanismos moleculares muy sofisticados que les permiten ser inmunes al ataque de patógenos, sin embargo cuando estos mecanismos fallan el patógeno es capaz de invadir, colonizar y reproducirse en la planta huésped ocasionando los síntomas de una enfermedad (Agrios 2005). La planta cuenta con una respuesta de resistencia inducible a patógenos muy efectiva conocida como inmunidad activada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés). En el ETI la planta es capaz de detectar por medio de proteínas de resistencia (R) a moléculas del patógeno conocidas como efectoras. Este reconocimiento de moléculas efectoras por la proteína R puede ser directo

o indirecto y culmina generalmente en una muerte celular programada en el sitio de ataque conocida como respuesta hipersensible (HR por sus siglas en inglés: *Hypersensitive Response*). En la HR ocurre una acumulación de la fitohormona ácido salicílico (SA) que induce la activación de una segunda respuesta de resistencia conocida como resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés: *Systemic Acquired Resistance*). Esta respuesta de resistencia se propaga del sitio donde ocurrió la HR al resto de la planta, protegiéndola de ataques subsecuentes del mismo patógeno y otros patógenos potenciales, de tal forma el SAR, es una respuesta de resistencia de amplio espectro contra patógenos.

El gen *THESEUS1* codifica para un receptor de membrana involucrado en el desarrollo de la planta *Arabidopsis thaliana*, y estudios recientes han demostrado que su expresión está relacionada con la activación de aproximadamente 30 genes involucrados en respuesta a ataque de patógenos, (Hematy *et al.*, 2007;). Este gen codifica para una proteína de 855 aminoácidos y estructuralmente posee un dominio transmembranal, un dominio de cinasa serina/treonina y pertenece al grupo de receptores de cinasa (Afzal *et al.*, 2008; Hematy *et al.*, 2007).

Análisis comparativos realizados en nuestro laboratorio del dominio de cinasa de la proteína *THESEUS1* de *Arabidopsis* y de la proteína de resistencia PTO de tomate mostró un porcentaje de identidad alto. El gen *PTO* confiere resistencia en la planta de tomate mediante una muerte celular programada del tipo HR a una bacteria patógena de estilo hemibiótrofo (Pieterse *et al.*, 2009). Estos antecedentes hacen interesante el estudio de genes tipo *THESEUS1* y su evaluación para determinar su papel en la muerte celular programada y la resistencia a patógenos.

En el caso de plátano, recientemente se identificaron varias secuencias parciales de la familia de cinasas Ser/Thr similares a la proteína PTO (Peraza Echeverría *et al.*, 2007). La reciente publicación de la secuencia genómica de plátano (D'Hont *et al.*, 2012) permitió descubrir que estas secuencias presentan un alto porcentaje de identidad con receptores tipo cinasa (RLK por sus siglas en inglés) de la familia *THESEUS1*. En el caso de papaya no se cuenta con información de la existencia de secuencias tipo *THESEUS1* en su genoma. La disponibilidad de las secuencias genómicas de plátano y papaya permitirán estudiar con más detalle la similitud que comparte el dominio de cinasa de la secuencia *THESEUS1* con el dominio de cinasa de secuencias tipo PTO.

Por lo tanto, el objetivo del presente capítulo de investigación fue identificar y caracterizar *in silico* secuencias tipo *THESEUS1* en los genomas de plátano y papaya.

---

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Identificación de secuencias homólogas a *THESEUS1* en el genoma de plátano y papaya

Para identificar genes en plátano y papaya que codifiquen para proteínas tipo *THESEUS1*, se utilizó a la secuencia *THESEUS1* (número de accesoión At5g58340) de *A. thaliana* para rastrear en el genoma de plátano variedad “DH-Pahang” (D’Hont *et al.*, 2012) y en el genoma de papaya transgénica variedad “SunUp” (Ming *et al.*, 2008). La secuencia de aminoácidos de *THESEUS1* utilizada como referencia (query) fue sometida al programa TBLASTN (Gertz *et al.*, 2006) del sitio web NCBI (por sus siglas en inglés: National Center of Biotechnology Information) con el fin de encontrar secuencias homólogas en los genomas de plátano y papaya. Los parámetros considerados para la búsqueda de secuencias homólogas fue el ya preestablecido por el programa TBLASTN, considerando un valor E de 0, utilizando la base de datos que incluye el genoma completo (wsg por sus siglas en inglés) con una matriz BLOSUM62 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 2.2.2 Obtención de los marcos de lectura abierto y la determinación del porcentaje de identidad

Las secuencias obtenidas en el análisis BLAST en ambos genomas, fueron convertidas en formato FASTA con el programa en línea READSEQ (<http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/readseq/>). Para determinar los posibles marcos de lectura abierta (ORF por sus siglas en inglés: *Open Reading Frame*) se utilizó el programa FGENESH (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>, Salomov y Solovyev, 2000) utilizando como organismos modelos a *A. thaliana* y *Oryza sativa*. Se copiaron las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cada ORF correspondiente al alineamiento arrojado por el BLAST y se guardaron las secuencias en el programa EditSeq (Lasergene, Burland, 2000). Cada secuencia de nucleótidos fue traducida a aminoácidos por el programa Bioedit v. 7.0 (Hail, 1999). Por último se evaluó el porcentaje de identidad entre las secuencias de estudio y las secuencias previamente caracterizadas por el programa MegAlign v. 7.2. (Lasergene, Burland, 2000).

Las secuencias de aminoácidos de *THESEUS1* de plátano y papaya fueron analizadas en los programas PROSITE y SMART (Schultz *et al.*, 2000; Sigrist *et al.*, 2010) para predecir

los posibles dominios encontrados en nuestras secuencias, con el fin de identificar que las secuencias obtenidas contengan un dominio cinasa similar al de PTO de tomate.

SMART nos dió información más detallada en cuanto a ciertos motivos de N-miristoilación presentes en las secuencias de plátano y papaya, la cual es una característica importante del dominio de cinasa de PTO de tomate para su anclaje a membrana. De la misma forma se obtuvo el punto isoeléctrico (pI) y el tamaño de las proteínas con el programa en línea Compute pI/Mv tool (Gasteiger *et al.*, 2005).

### **2.2.3 Alineamiento múltiple de secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya**

El alineamiento múltiple se realizó con las secuencias de aminoácidos antes predichas mediante el algoritmo Clustal (Higgins y Shap, 1988). Para ello, cada una de las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya fueron alineadas por separado con la secuencia de THESEUS1 de *Arabidopsis thaliana* (Número de accesoión NP 200249.1) y PTO de tomate (No. de accesoión: U02271). Las secuencias que contenian los dominios cinasa de ambos genes conservados fueron seleccionadas para realizar un segundo alineamiento con el software Clustal X2 (Larkin *et al.*, 2007). Finalmente se realizó el sombreado de aminoácidos conservados con el programa BOXSHADE v. 3. 21 ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

### **2.2.4 Modelaje por homología de la estructura tridimensional de las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya**

Para evaluar si el dominio de cinasa de proteínas tipo THESEUS1 de plátano y papaya podrían presentar una conformación tridimensional similar a la estructura de PTO de tomate descrita por Dong *et al.* (2009), se realizó un modelaje por homología utilizando el programa Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/>, Arnold *et al.*, 2006). Este programa consiste en desarrollar un modelo tridimensional basándose en la homología de una secuencia cuya estructura tridimensional sea conocida por métodos de espectrometría o resonancia magnética nuclear (Bordoli *et al.*, 2009) de la base de datos del Protein Data Bank.

### **2.2.5 Análisis filogenético**

El análisis filogenético fue realizado utilizando el software MEGA v. 4 (Tamura *et al.*, 2007; Kimura *et al.*, 2008), para ello se utilizaron 83 secuencias de aminoácidos de la familia

receptores de cinasa reportadas por Peraza Echeverría *et al.* (2007) obtenidas por su número de accesoión en la base de datos del NCBI. Al análisis filogenético se añadieron las 17 secuencias de las ORF previamente caracterizados en plátano y las 9 secuencias caracterizadas en papaya (Cuadro 2.1). La historia evolutiva fue inferida utilizando el método de Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987).

### 2.2.6 Análisis de hidrofobicidad

Este análisis se realizó con el programa Protscale (<http://web.expasy.org/protscale/> Gasteiger *et al.*, 2005) para predecir las posibles regiones hidrofóbicas presentes en las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya. El programa consiste en evaluar la distribución que tienen los aminoácidos según sus características hidrofóbicas e hidrofílicas que Kyte and Doolittle en 1982 asignaron a cada aminoácido. El análisis se realizó utilizando una ventana número 19 que es utilizada para evaluar regiones hidrofóbicas y nos indica que se realizará un promedio de los valores asignados a cada residuo cada 19 aminoácidos. Los aminoácidos hidrofóbicos poseen valores negativos a diferencia de los hidrofílicos por lo tanto mientras más negativo sea el valor obtenido la probabilidad de que la región analizada sea hidrofóbica es mayor (Kyte y Doolittle, 1982).

### 2.2.7 Evaluación del dominio de activación en secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya

A partir del alineamiento múltiple con las 17 secuencias tipo THESEUS1 de plátano y las 9 secuencias de papaya anteriormente mencionado, se ubicó el dominio de activación presente en la proteína PTO de tomate, donde posteriormente con el programa Bioedit fue delimitado este dominio y las secuencias se guardaron en formato FASTA, para ser analizadas con el programa WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>, Crooks *et al.*, 2004). El programa determina que aminoácidos se conservan más en este dominio ilustrándolos con letras grandes (más conservado) y pequeñas (menos conservado).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Identificación de secuencias homólogas a *THESEUS1* en plátano y papaya

El análisis BLAST realizado con la secuencia de *THESEUS1* de *Arabidopsis*, nos permitió identificar 17 contigs en el genoma de plátano que coincidieron con las secuencias parciales previamente reportadas por Peraza Echeverría *et al.*, en el 2007 (Cuadro 2.1). Con respecto al genoma de papaya se identificaron 9 contigs que presentaron una alta similitud con la secuencia de estudio (Cuadro 2.2). Según los parámetros tomados para el análisis el contig CAIC01023627 de plátano y el ABIM01036697 de papaya fueron las secuencias que alinearon con un mayor número de aminoácidos con la secuencia de *THESEUS1* de *A. thaliana*.

**Cuadro 2.1** Resultados de la búsqueda de secuencias homólogas a THESEUS1 en el genoma de *M. acuminata* variedad DH-Pahang, utilizando el programa TBLASTN. Se reportan los 17 resultados que cumplen con las características de secuencias tipo THESEUS1

Número de accesoión del GenBank	Nombre asignado	Longitud del alineamiento TBLASN (No. de aminoácidos)	% de identidad	% de similitud	Valor E	Puntaje
CAIC01023627.1	<i>MaTHE1</i>	567	68	87	0	1056
CAIC01021578.1	<i>MaTHE2</i>	563	67	81	0	1060
CAIC01007379.1	<i>MaTHE3</i>	417	53	68	0	780
CAIC01023523.1	<i>MaTHE4</i>	422	54	68	0	785
CAIC01021951.1	<i>MaTHE5</i>	415	54	69	0	786
CAIC01023934.1	<i>MaTHE6</i>	426	53	69	0	775
CAIC01022797.1	<i>MaTHE7</i>	422	51	63	0	758
CAIC01023612.1	<i>MaTHE8</i>	423	50	63	0	751
CAIC01021572.1	<i>MaTHE9</i>	417	50	66	0	731
CAIC01021054.1	<i>MaTHE10</i>	416	49	65	0	721
CAIC01023114.1	<i>MaTHE11</i>	397	47	63	0	713
CAIC01021568.1	<i>MaTHE12</i>	380	47	64	0	660
CAIC01022190.1	<i>MaTHE13</i>	403	46	61	0	654
CAIC01023149.1	<i>MaTHE14</i>	383	44	61	0	625
CAIC01022472.1	<i>MaTHE15</i>	358	44	60	0	622
CAIC01023252.1	<i>MaTHE16</i>	378	44	59	0	610
CAIC01022919.1	<i>MaTHE17</i>	371	44	59	0	602

Datos obtenidos de la base de datos WGS en NCBI Organismo *Musa acuminata* (taxid:4641)

**Cuadro 2. 2** Resultados de la búsqueda de secuencias homólogas a THESEUS1 en el genoma de *C. papaya* cv SunUp utilizando el programa TBLASTN. Se reportan los nueve resultados que cumplen con las características de secuencias tipo THESEUS1.

Número de accesoión del GenBank	Nombre asignado	Longitud del alineamiento TBLASN (No. de aminoácidos)	% de identidad	% de similitud	Valor E	Puntaje
ABIM01036697.1	<i>CpTHE1</i>	478	81	87	0	901
ABIM01001029.1	<i>CpTHE2</i>	443	51	66	0	770
ABIM01003156.1	<i>CpTHE3</i>	376	44	60	0	600
ABIM01015963.1	<i>CpTHE4</i>	329	45	61	4e <sup>-159</sup>	522
ABIM01004624.1	<i>CpTHE5</i>	320	40	56	1e <sup>-154</sup>	508
ABIM01025881.1	<i>CpTHE6</i>	263	51	66	1e <sup>-153</sup>	476
ABIM01017762.1	<i>CpTHE7</i>	237	67	80	2e <sup>-148</sup>	490
ABIM01032389.1	<i>CpTHE8</i>	324	40	56	1e <sup>-147</sup>	484
ABIM01004409.1	<i>CpTHE9</i>	226	73	83	2e <sup>-143</sup>	477

Datos obtenidos de la base de datos WGS en NCBI  
Organismo Carica papaya (taxid:3649)

### 2.3.2 Obtención de los marcos de lectura abiertos y determinación del porcentaje de identidad

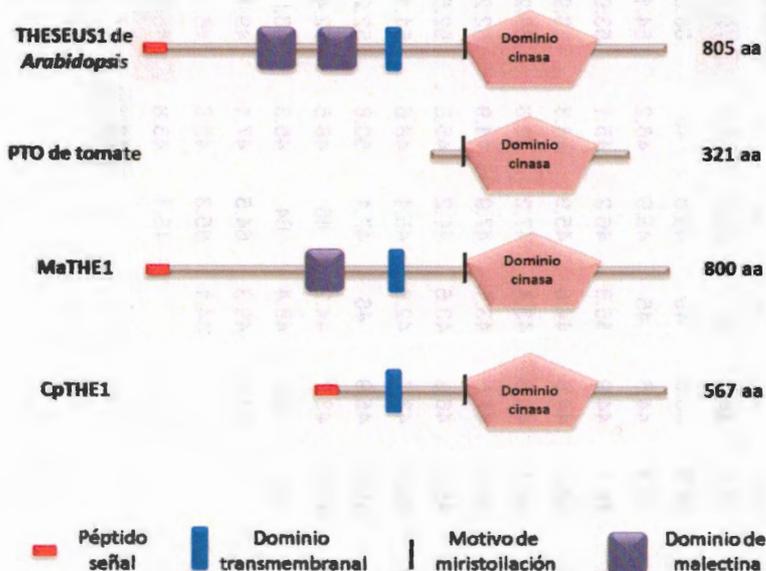
Se encontró que todos los ORFs predichos de las diecisiete secuencias tipo *THESEUS1* de plátano y las nueve secuencias de papaya contienen los once dominios cinasas de PTO de tomate en la región C-terminal (Figuras 2.2 y 2.3). De manera interesante todas las secuencias presentan el dominio transmembranal en la región N-terminal

característico del gen *THESEUS1* de *Arabidopsis*. La longitud de las secuencias encontradas fue diferente desde 486 aa hasta 1136 aa (Cuadro 2.3).

**Cuadro 2.3** Tamaño de las secuencias tipo *THESEUS1* de plátano y papaya.

Nombre	Longitud de nucleótidos (ORF)	Longitud de aminoácidos
<i>MaTHE1</i>	2400	800
<i>MaTHE2</i>	2205	735
<i>MaTHE3</i>	2190	730
<i>MaTHE4</i>	2190	730
<i>MaTHE5</i>	2241	747
<i>MaTHE6</i>	2256	752
<i>MaTHE7</i>	2418	806
<i>MaTHE8</i>	2004	668
<i>MaTHE9</i>	2268	756
<i>MaTHE10</i>	2172	724
<i>MaTHE11</i>	2199	733
<i>MaTHE12</i>	2232	744
<i>MaTHE13</i>	2211	737
<i>MaTHE14</i>	2100	700
<i>MaTHE15</i>	2205	735
<i>MaTHE16</i>	2382	794
<i>MaTHE17</i>	2169	723
<i>CpTHE1</i>	1701	567
<i>CpTHE2</i>	2520	840
<i>CpTHE3</i>	2592	864
<i>CpTHE4</i>	2172	724
<i>CpTHE5</i>	3408	1136
<i>CpTHE6</i>	1458	486
<i>CpTHE7</i>	2481	827
<i>CpTHE8</i>	2529	843
<i>CpTHE9</i>	2721	907

FGENESH (Salomov y Solovyev, 2000)



**Figura 2.1 Dominios presentes en las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya.** Las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya poseen los dominios característicos de un receptor de membrana tipo cinasa: péptido señal (rojo), dominio transmembranal (azul), dominio de unión a malectina (morado), dominio coiled-coil (verde) y un dominio cinasa Ser/Thr (rosa) tipo PTO.

Los datos obtenidos del análisis de dominios realizado en las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya mostraron que dichas secuencias poseen los dominios característicos de un receptor de membrana tipo cinasa (Figura 2.1). Se observó que las diecisiete secuencias de plátano y las nueve secuencias de papaya conservan el dominio de cinasa Ser/Thr de la proteína PTO de tomate (Martin *et al.*, 1993) y que poseen al igual un motivo de miristoilación que Vries *et al.*, 2006 demostró que le da la habilidad de anclarse a la membrana de la célula.

Los porcentajes de identidad entre las secuencias tipo THESEUS1 de este estudio y la secuencia de THESEUS1 de *Arabidopsis* (amarillo) fluctuó de 45.2% (MaTHE15) a 72.1% (MaTHE1) en plátano (Cuadro 2.4) y de 38.1% (CpTHE5) a 85.5% (CpTHE1) en papaya (Cuadro 2.5). Mientras que los porcentajes de identidad entre las secuencias tipo THESEUS1 (verde) variaron de 42.4% (MaTHE16 vs MaTHE17) a 90.9% (MaTHE1 vs MaTHE2) en plátano (Cuadro 2.4) y de 32.4 % (CpTHE5 vs CpTHE8) a 64.5% (CpTHE4 vs CpTHE6) en papaya (Cuadro 2.5).

**Cuadro 2. 4** Porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos de THESEUS1 de *Arabidopsis thaliana* y PTO de tomate con las diecisiete secuencias tipo THESEUS1 de plátano.

THE-Ma	MaTHE 1	MaTHE 2	MaTHE 3	MaTHE 4	MaTHE 5	MaTHE 6	MaTHE 7	MaTHE 8	MaTHE 9	MaTHE 10	MaTHE 11	MaTHE 12	MaTHE 13	MaTHE 14	MaTHE 15	MaTHE 16	MaTHE 17	THESEUS 1	PTO
MaTHE1		90.9	53.8	54	53.1	55.2	53.6	52.7	50.9	52.8	53.6	50.5	51.5	49.2	47.1	48.9	45.6	72.1	61.3
MaTHE2	...		56.4	56.4	55.3	57.6	55.5	52.7	52.9	54.6	55.9	50.9	50.9	50.5	49	49.8	48	69.3	60.4
MaTHE3	...	...		85	89.2	60.9	62.2	52.4	48.2	51.6	49.2	48	48.3	44.6	45	45.9	46.2	54.1	58.8
MaTHE4	...	...	...		87	61	62.9	52.9	48.9	51.3	49.9	47.2	48.1	44.9	45.3	46.2	45.1	53.9	58.8
MaTHE5	...	...	...	...		59.6	61.4	53.1	48.7	52.1	49.3	47.6	48.1	44.6	44.6	45.9	44.3	53.9	58.8
MaTHE6	...	...	...	...	...		77.8	52	48.8	51.9	50.2	48.4	49.1	46.6	43.4	47.2	43.6	53.2	60.9
MaTHE7	...	...	...	...	...	...		50.9	47.9	50.4	52.4	47	48.1	47.5	43.1	47.9	44.9	52.2	59.7
MaTHE8	...	...	...	...	...	...	...		49.9	51.5	51.4	45.9	45.9	46.3	48.6	46.2	45.5	52.5	58.3
MaTHE9	...	...	...	...	...	...	...	...		80.2	80.4	45.3	45.5	43.7	42.6	45.1	48.6	51.1	66.5
MaTHE10	...	...	...	...	...	...	...	...	...		80.1	46.5	45.6	45.9	46	47.1	50.8	52.2	66.5
MaTHE11	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		47.4	46.6	43.7	44.2	46	48.5	52.4	65.5
MaTHE12	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		83	64	48.4	64	45.3	48.5	56.7
MaTHE13	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		64.6	49.3	64.5	47.1	49.4	56.4
MaTHE14	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		44.1	85.3	40.6	46.9	57.5
MaTHE15	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		45.1	43.8	45.2	57.4
MaTHE16	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		42.4	47.4	57.7
MaTHE17	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...		47.2	56.2
THESEUS1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	61.1
PTO	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Determinados con el programa MegAlign (Lasergene v. 7.2.1).

Identidad entre secuencias tipo THESEUS1 de plátano (azul), Identidad entre secuencias de plátano con THESEUS1 de *Arabidopsis* (naranja) y Identidad entre secuencias de plátano con PTO de tomate (amarillo).

**Cuadro 2.5** Porcentajes de identidad entre las secuencias de aminoácidos de THESEUS1 de *Arabidopsis thaliana* y PTO de tomate con las nueve secuencias tipo THESEUS1 de papaya.

THE-Cp	CpTHE1	CpTHE2	CpTHE3	CpTHE4	CpTHE5	CpTHE6	CpTHE7	CpTHE8	CpTHE9	THESEUS1	PTO
CpTHE1		61.3	52.3	57.6	43.7	54.7	57.3	46.6	54	85.5	59.9
CpTHE2	...		44.7	41.1	37.8	52.6	47.9	39.4	48.3	53.4	56.8
CpTHE3	...	...		55.3	46.6	67.7	40.9	37.2	42.1	43.3	57.4
CpTHE4	...	...	...		52	64.5	41.1	35.7	42.2	45.5	56
CpTHE5	...	...	...	...		50.3	37.1	32.4	36.5	38.1	52.9
CpTHE6	...	...	...	...	...		51.6	43.5	51.9	53.5	56.2
CpTHE7	...	...	...	...	...	...		45.8	46.7	49	60.2
CpTHE8	...	...	...	...	...	...	...		40.7	39.2	55.3
CpTHE9	...	...	...	...	...	...	...	...		48	59.7
THESEUS1	...	...	...	...	...	...	...	...	...		59.9
PTO	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	

Determinados con el programa MegAlign (Lasergene v. 7.2.1).

Identidad entre secuencias tipo THESEUS1 de papaya (azul), Identidad entre secuencias de papaya con THESEUS1 de *Arabidopsis* (naranja) y Identidad entre secuencias de papaya con PTO de tomate (amarillo).

THESEUS1 es una proteína tipo receptor de membrana de la familia ser/Thr que sensa la actividad en la pared celular (Hématy *et al.*, 2007). Recientemente se demostró que interactúa con otras proteínas RLKs FERONIA y HÉRCULES, este complejo está involucrado en la respuesta a brasinoesteroides (BRs) y su función principal es regular el crecimiento de la planta a través de la transducción de señales mediado por cinasas (Guo *et al.*, 2009) (Figura 1.29). Estudios enfocados en entender la señalización por BRs, observaron que la proteína cinasa BAK1 tiene la función de activar la muerte celular programada en *A. thaliana* en defensa ante los hongos *Alternaria brassicicola* y *Botrytis cinérea* (Chinchilla *et al.*, 2007). PTO por su parte es una proteína cinasa de Ser/Thr que genera resistencia contra la bacteria *P. syringae* induciendo la muerte celular de tipo respuesta hipersensible (Martin *et al.*, 1993). Las secuencias tipo THESEUS1 obtenidas en los genomas de plátano y papaya, presentaron un dominio transmembranal característico de THESEUS1, pero también comparten un dominio cinasa de serina/treonina que presenta una identidad de 61.3% (MaTHE1) y 59.9% (CpTHE1) con PTO (Cuadro 2.4 y 2.5). De manera interesante, al realizar el rastreo de secuencias tipo PTO en el genoma de plátano y papaya, las secuencias que más se parecieron a PTO fueron los dominios de cinasas de secuencias tipo THESEUS1 que poseen un dominio

transmembranal que PTO no tiene. En este caso los dominios de cinasa de las secuencias tipo THESEUS1 más parecidos a PTO fueron los correspondientes a las secuencias MaTHE1 y CpTHE1 de plátano y papaya respectivamente (Cuadros 2.4 y 2.5).

### 2.3.3 Alineamiento múltiple de secuencias de plátano y papaya

Teniendo como previo resultado que las secuencias tipo THESEUS1 encontradas en el genoma de plátano y papaya presentan similitud con PTO de tomate y continuando con el estudio *in silico* se realizó el alineamiento del dominio cinasa de las secuencias de aminoácidos tipo THESEUS1 para observar si poseen los subdominios de cinasas de PTO conservados. En el caso de plátano, las secuencias parciales de cinasa previamente reportadas por Peraza Echeverría *et al.*, (2007 y etiquetadas como del tipo PTO correspondieron a las secuencias del tipo THESEUS1 ya que presentaron un dominio transmembranal en la región amino terminal. Si bien ya se había reportado que estas secuencias presentaban los subdominios de PTO, se realizó el alineamiento con el dominio cinasa THESEUS1 de *A. thaliana* y se observó que estos subdominios se conservan (Figura 2.2). Por otra parte el alineamiento obtenido en papaya mostró que todas las secuencias con excepción de la CpTHE7 presentaron los once subdominios de cinasa muy conservados incluido THESEUS1 de *A. thaliana* (Figura 2.3). Lo interesante en el análisis de ambos genomas es que las secuencias tipo THESEUS1 conservan el dominio de activación y el residuo de tirosina (Y) localizado en la región lazo P+1, que en PTO demostró ser esencial para generar una muerte celular tipo respuesta hipersensible (Rathjen *et al.*, 1999). Si bien es claro que las secuencias tipo THESEUS1 obtenidas en este estudio presentan un dominio transmembranal, Zhen *et al.*, (2002); Xiang *et al.*, (2008) y DeFalco *et al.*, (2012) reportan que es posible demostrar la funcionalidad de dominios de cinasa de genes tipo RLK.

		I	II	III	IV
MaTHE10.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE9.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE11.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE6.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE7.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE5.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE4.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE3.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE2.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE1.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
THESEUS1_de_Arabidopsis	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE8.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE12.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE13.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE14.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE16.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE15.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
MaTHE17.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE
PTO_de_tomate.pro	1	AVGSGFGRVY	IKAVVRKQNE	NEEPTETL	LRLRHRHLVSLGVCDE

		V	Via
MaTHE10.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE9.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE11.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE6.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE7.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE5.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE4.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE3.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE1.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE2.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
THESEUS1_de_Arabidopsis	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE8.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE12.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE13.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE16.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE18.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE17.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
MaTHE20.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE
PTO_de_tomate.pro	60	KNEMLVYEVN	IKAVVRKQNE

Domínio de activación

Lazo P-1

		IX
MaTHE10.pro	117	RDVKTTHILL
MaTHE9.pro	117	RDVKTTHILL
MaTHE11.pro	117	RDVKTTHILL
MaTHE6.pro	118	RDVKTTHILL
MaTHE7.pro	118	RDVKTTHILL
MaTHE5.pro	117	RDVKTTHILL
MaTHE4.pro	117	RDVKTTHILL
MaTHE3.pro	117	RDVKTTHILL
MaTHE1.pro	117	RDVKTTHILL
MaTHE2.pro	117	RDVKTTHILL
THESEUS1_de_Arabidopsis	117	RDVKTTHILL
MaTHE8.pro	117	RDVKTTHILL
MaTHE12.pro	117	RDVKTTHILL
MaTHE13.pro	118	RDVKTTHILL
MaTHE16.pro	117	RDVKTTHILL
MaTHE18.pro	117	RDVKTTHILL
MaTHE17.pro	117	RDVKTTHILL

```

MaTHE20.pro      117  RDVRSITNILLLEEMAKVSCFGLSLEFYSFGEIHWLIVKGFEGYFDFEYFTKLSSE
PTO_de_tomate.pro 116  RDVRSIILLDENLPRKIDFECISKSTELLEQTHSTVVKSLSYDPEYFTGRLETKS
    
```

X

```

MaTHE10.pro      177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREMVNLAEWKQWQKRGLEQIDTRLAGSIREPSL
MaTHE9.pro       177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREMVNLAEWKQWQKRGLEQIDSRFAESIRFQSL
MaTHE11.pro      177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREMVNLAEWKQWQKRGLEQIDARAGSIREPSL
MaTHE6.pro       178  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKCHKGGLEKIIDPHLVGTTSSASL
MaTHE7.pro       178  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKCHKGGLEKIIDPHLVGTTSSASL
MaTHE5.pro       177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGSISKQSL
MaTHE4.pro       177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
MaTHE3.pro       177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
MaTHE1.pro       177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
MaTHE2.pro       177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
THESEUS1_de_Arabidopsis 177 DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
MaTHE8.pro       177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
MaTHE12.pro      177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
MaTHE13.pro      178  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
MaTHE16.pro      177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
MaTHE18.pro      177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
MaTHE17.pro      177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
MaTHE20.pro      177  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
PTO_de_tomate.pro 176  DVYSFGVVLLEVLCAEIVIDEITLPREOVNLAEWAKWKKGGLEKIIDPNLAGTINKQSL
    
```

XI

```

MaTHE10.pro      237  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE9.pro       237  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE11.pro      237  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE6.pro       238  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE7.pro       238  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE5.pro       237  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE4.pro       237  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE3.pro       237  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE1.pro       237  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE2.pro       237  KKEETAEKCLASGVDR
THESEUS1_de_Arabidopsis 237 KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE8.pro       237  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE12.pro      237  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE13.pro      238  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE16.pro      237  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE18.pro      237  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE17.pro      237  KKEETAEKCLASGVDR
MaTHE20.pro      237  KKEETAEKCLASGVDR
PTO_de_tomate.pro 236  KKEETAEKCLASGVDR
    
```

**Figura 2. 2** Alineamiento ClustaW de secuencias tipo THESEUS1 de plátano. La región alineada corresponde a los subdominios (en números romanos) de PTO de tomate, el dominio de activación y el sitio lazo P+1 (línea roja) están altamente conservados en las secuencias de THESEUS1 de plátano.

			I	II	III	IV	
CpTHE2.pro	1	GVGGFGKVKV	GG	GTKVAIKRNP	SSSEQG	NEFFQTEIEMLSKLRH	HLVSLIG
CpTHE6.pro	1	GVGGFGKVKV	GG	GTKVAIKRNP	SSSEQG	NEFFQTEIEMLSKLRH	HLVSLIG
CpTHE7.pro	1	GVGGFGKVKV	GG	GTKVAIKRNP	SSSEQG	NEFFQTEIEMLSKLRH	HLVSLIG
CpTHE9.pro	1	GVGGFGKVKV	GG	GTKVAIKRNP	SSSEQG	NEFFQTEIEMLSKLRH	HLVSLIG
CpTHE1.pro	1	GVGGFGKVKV	GG	GTKVAIKRNP	SSSEQG	NEFFQTEIEMLSKLRH	HLVSLIG
THESEUS1.pro	1	GVGGFGKVKV	GG	GTKVAIKRNP	SSSEQG	NEFFQTEIEMLSKLRH	HLVSLIG
CpTHE3.pro	1	GVGGFGKVKV	GG	GTKVAIKRNP	SSSEQG	NEFFQTEIEMLSKLRH	HLVSLIG
CpTHE4.pro	1	GVGGFGKVKV	GG	GTKVAIKRNP	SSSEQG	NEFFQTEIEMLSKLRH	HLVSLIG
CpTHE5.pro	1	GVGGFGKVKV	GG	GTKVAIKRNP	SSSEQG	NEFFQTEIEMLSKLRH	HLVSLIG
CpTHE8.pro	1	GVGGFGKVKV	GG	GTKVAIKRNP	SSSEQG	NEFFQTEIEMLSKLRH	HLVSLIG
PTO_de_tomate.pro	1	GVGGFGKVKV	GG	GTKVAIKRNP	SSSEQG	NEFFQTEIEMLSKLRH	HLVSLIG

		V		Vla	
CpTHE2.pro	60	QSEMILVY	YMAAGTLR	HLVYRGD	----KRFLS
CpTHE6.pro	60	NGEMCLAV	YMAAGTLR	HLVYRDK	----KRFHS
CpTHE7.pro	61	NCSEMILVY	YMAAGTLR	HLVYRQ	----KRFPL
CpTHE9.pro	61	DSEMILVY	YMSRGTLR	HLVYRQ	----NRSLE
CpTHE1.pro	60	RQEMILVY	YMAAGTLR	HLVYRDT	----KRFHS
THESEUS1.pro	60	RSEMILVY	YMAAGTLR	HLVYRDT	----LRFPL
CpTHE3.pro	60	RSEMILVY	YMAAGTLR	HLVYRDT	----LRFPL
CpTHE4.pro	60	QSEMILVY	YMAAGTLR	HLVYRDT	----LRFPL
CpTHE5.pro	60	QSEMILVY	YMAAGTLR	HLVYRDT	----LRFPL
CpTHE8.pro	60	GAEMILVY	YMAAGTLR	HLVYRDT	----LRFPL
PTO_de_tomate.pro	60	RNEMILVY	YMAAGTLR	HLVYRDT	----LRFPL

**Domínio de activação**

			Vib	VII	VIII	Lazo P+1
CpTHE2.pro	110	AKYI	IHRDVKT	TNILLDEN	AKVDFGLSK	GPNI
CpTHE6.pro	110	AKYI	IHRDVKT	TNILLDEN	AKVDFGLSK	GPNI
CpTHE7.pro	111	AKHT	IHRDVKT	TNILLDEN	AKVDFGLSK	GPNI
CpTHE9.pro	111	AKQI	IHRDVKT	TNILLDEN	AKVDFGLSK	GPNI
CpTHE1.pro	112	AAQGI	IHRDVKT	TNILLDEN	AKVDFGLSK	GPNI
THESEUS1.pro	110	AAQSI	IHRDVKT	TNILLDEN	AKVDFGLSK	GPNI
CpTHE3.pro	110	AAQSI	IHRDVKT	TNILLDEN	AKVDFGLSK	GPNI
CpTHE4.pro	110	AAVSI	IHRDVKT	TNILLDEN	AKVDFGLSK	GPNI
CpTHE5.pro	110	SAQGI	IHRDVKT	TNILLDEN	AKVDFGLSK	GPNI
CpTHE8.pro	118	SDGGI	IHRDVKT	TNILLDEN	AKVDFGLSK	GPNI
PTO_de_tomate.pro	111	--RAI	IHRDVKT	TNILLDEN	AKVDFGLSK	GPNI

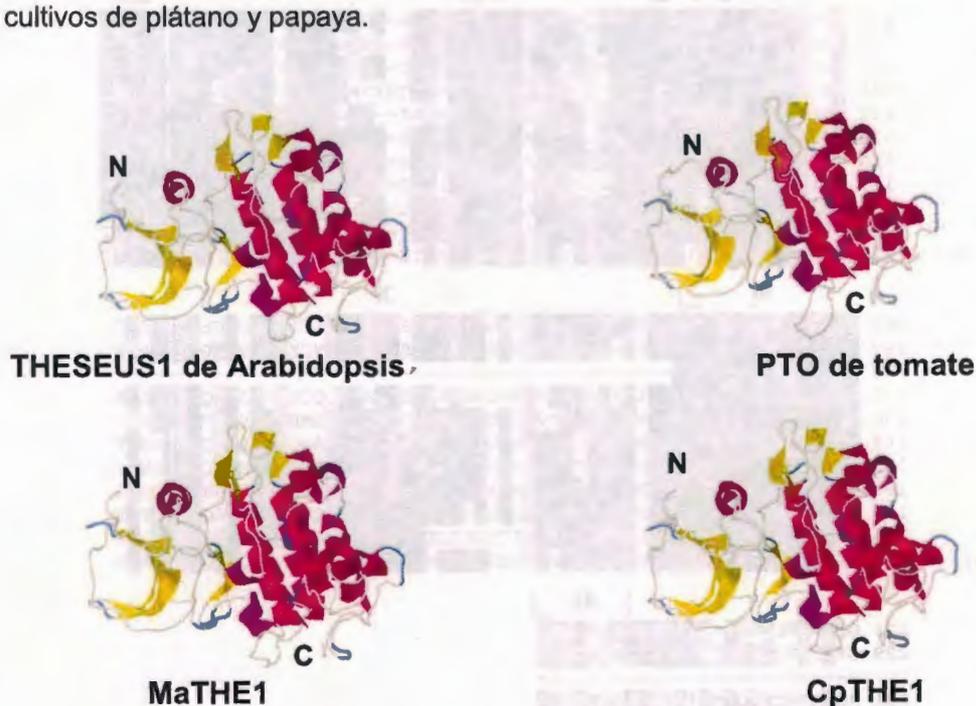
		IX		X
CpTHE2.pro	169	RQQLTEKSDVYSFGVVL	FEVLCARPA	NESLPEOVSLA
CpTHE6.pro	169	RQQLTEKSDVYSFGVVL	FEVLCARPA	NESLPEOVSLA
CpTHE7.pro	170	RQQLT	KSDVYSFGV	
CpTHE9.pro	171	RQQLTEKSDVYSFGVVL	FEVLCARPA	NESLPEOVSLA
CpTHE1.pro	170	RQQLTEKSDVYSFGVVL	FEVLCARPA	NESLPEOVSLA
THESEUS1.pro	169	RQQLTEKSDVYSFGVVL	FEVLCARPA	NESLPEOVSLA
CpTHE3.pro	169	RQQLTEKSDVYSFGVVL	FEVLCARPA	NESLPEOVSLA
CpTHE4.pro	169	RQQLTEKSDVYSFGVVL	FEVLCARPA	NESLPEOVSLA
CpTHE5.pro	169	RQQLT	KSDVYSFGV	
CpTHE8.pro	176	SEFTEKSDVYSFGVVL	FEVLCARPA	NESLPEOVSLA
PTO_de_tomate.pro	168	GRLTEKSDVYSFGVVL	FEVLCARPA	NESLPEOVSLA

		XI
CpTHE2.pro	229	GCINPECLKFKF
CpTHE6.pro	229	GKINPECLKFKF
CpTHE7.pro		
CpTHE9.pro	231	ROISSECFKQTEIAI
CpTHE1.pro	230	ETISHGSLKK
THESEUS1.pro	229	GKINPEASLKK
CpTHE3.pro	229	GKINPEASLKK
CpTHE4.pro	229	GS
CpTHE5.pro	229	SQIKPSSLKK
CpTHE8.pro	236	DEINPNSL
PTO_de_tomate.pro	228	DKIRPESL

**Figura 2. 3** Alineamiento ClustalW de secuencias tipo THESEUS1 de papaya. La región alineada corresponde a los subdominios (en números romanos) de PTO de tomate, el dominio de activación y el sitio lazo P+1 (línea roja) están altamente conservados en las secuencias de THESEUS1 y papaya.

### 2.3.4 Modelaje por homología de la estructura tridimensional de las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya

El resultado del modelaje tridimensional de las secuencias MaTHE1 de plátano y CpTHE1 de papaya más parecidas a THESEUS1 de *A. thaliana* predichas por el programa SWISS-MODEL, presentaron la estructura de 3  $\beta$ -plegadas y 4  $\alpha$ -hélices características de la proteína PTO de tomate. La estructura tridimensional es esencial en PTO para que se lleve a cabo la interacción entre las moléculas efectoras AvrPTO y AvrPTOB de *P. syringae* (Dong *et al.*, 2009). El resultado obtenido es de gran importancia puesto que en los genomas de plátano y papaya no se encontraron secuencias tipo PTO, sin embargo, el dominio de cinasa de secuencias tipo THESEUS1 resultan tener una alta similitud a PTO, sugiriendo que estas secuencias podrían tener una función similar a PTO en los cultivos de plátano y papaya.



**Figura 2. 4** Modelaje tridimensional de secuencias tipo *THESEUS1* de plátano y papaya. La predicción de estructura de THESEUS1 en comparación con PTO presenta conformaciones de  $\alpha$ -hélice (magenta) y  $\beta$ -plegada (amarillo) necesarias para la interacción de la proteína. Las secuencias MaTHE1 y CpTHE1 resultaron ser las más parecidas a THESEUS1 y a PTO.

### 2.3.5 Análisis filogenético

En el análisis filogenético se observó que las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya se agruparon en el clado de THESEUS1 de *Arabidopsis thaliana* (rosa), siendo las secuencias MaTHE1 (verde) y CpTHE1 (naranja) las más parecidas a THESEUS1 respectivamente. La familia de secuencias tipo PTO de la especie *Solanum* (rojo) se agruparon en un clado junto con PTO de tomate, como se puede observar este análisis muestra una relación con PTO de tomate en comparación con las secuencias tipo THESEUS encontradas en los genomas de plátano y papaya, sugiriendo que PTO comparte un ancestro común con las secuencias de estudio. Por otra parte la secuencias tipo THESEUS1 de otras especies monocotiledóneas y dicotiledóneas se agruparon con ambas secuencias, tanto, THESEUS1 como PTO respectivamente. En estudios realizados por Frederick *et al.*, 1998 donde evaluaron homólogos a PTO se demostró que mientras posean el dominio de activación de PTO mantendrán su función. Por lo tanto el dominio cinasa de las secuencias tipo THESEUS1 podría ser funcional y estar involucrado en un mecanismo de defensa ante patógenos similar al de PTO de tomate.



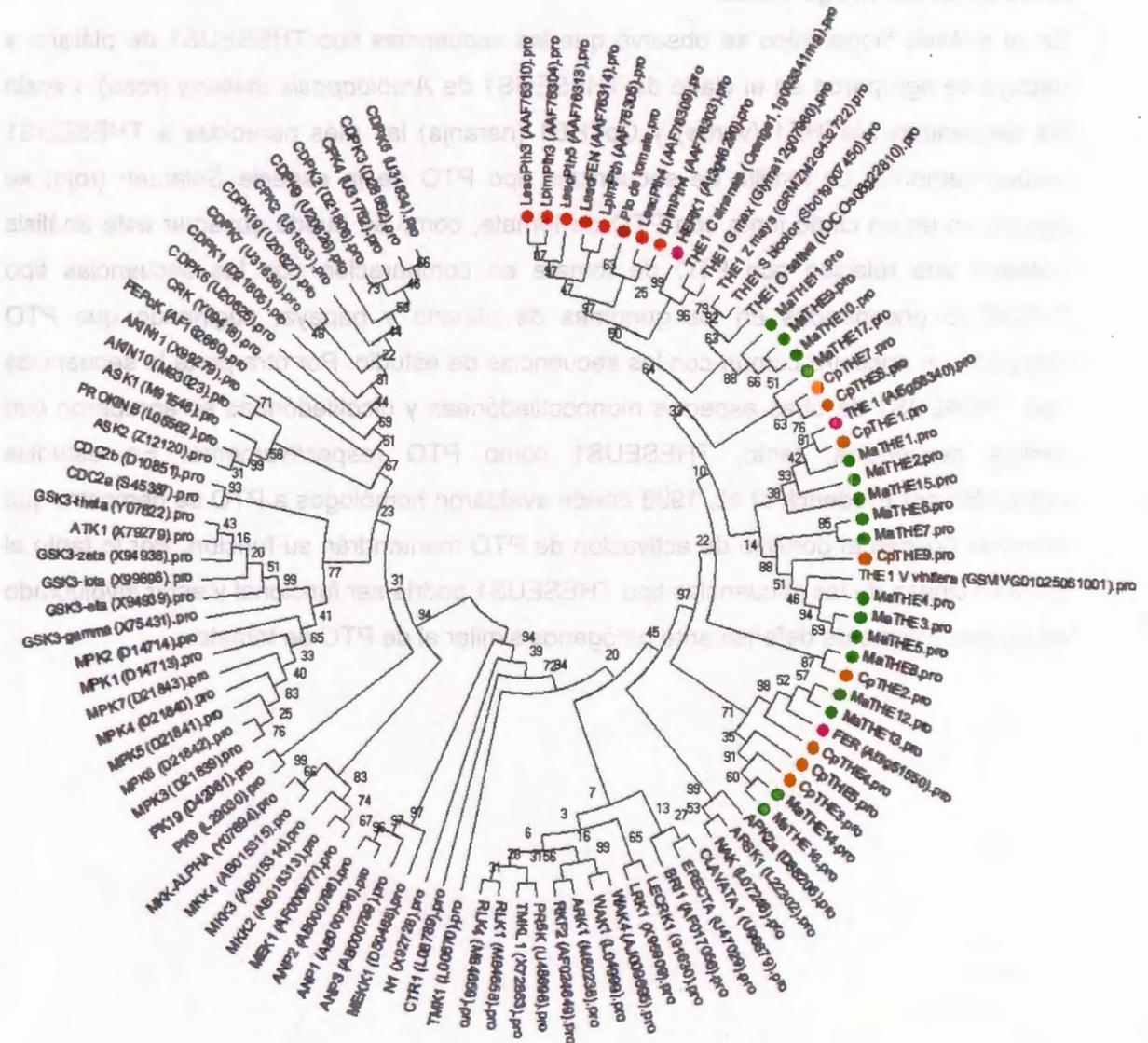


Figura 2. 5 Árbol filogenético Neighbor-Joining de la familia RLK. Basado en el alineamiento ClustalW de cinasas Ser/Thr con las 17 secuencias tipo THESEUS1 de plátano y 9 secuencias de papaya. La evolución de las secuencias fue inferida usando el método Neighbor-Joining a 1000 bootstrap según el mejor modelo Dayhoff con una distribución G de 0.87. Análisis realizado con el programa MEGA5.

### 2.3.6 Análisis de hidrofobicidad

Las predicciones de hidrofobicidad hechas por el programa SMART mostraron que, las secuencias tipo THESEUS1 de papaya y plátano presentaron un dominio transmembranal considerando los valores obtenidos en cada pico y tomando en cuenta la escala de medición establecida por Kyte & Doolittle (1982) con un valor máximo de 1.5 para las regiones transmembranales. THESEUS1 de *A. thaliana* presentó un valor máximo de 2.769, sugiriendo una alta probabilidad de presentar un dominio transmembranal. Los valores máximos y mínimos obtenidos de las secuencia en ambos genomas variaron entre 3.568 (MaTHE8) y 1.842 (MaTHE15) en plátano (Cuadro 2.6) y 3.263 (CpTHE7) y 1.700 (CpTHE6) en el caso de papaya (Cuadro 2.7).

**Cuadro 2. 6** Resultados del análisis de hidrofobicidad para las secuencias tipo THESEUS1 de plátano, utilizando el programa Protscale.

<b>Secuencia</b>	<b>Máximos</b>	<b>Mínimos</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Máximos</b>	<b>Mínimos</b>
<b>THESEUS1</b>	2.769	-1.789	<b>MaTHE9</b>	3.347	-1.726
<b>MaTHE1</b>	2.679	-1.605	<b>MaTHE10</b>	3.211	-1.795
<b>MaTHE2</b>	2.211	-1.542	<b>MaTHE11</b>	2.863	-1.626
<b>MaTHE3</b>	1.995	-2.005	<b>MaTHE12</b>	2.447	-2.095
<b>MaTHE4</b>	1.995	-1.889	<b>MaTHE13</b>	2.289	-2.084
<b>MaTHE5</b>	1.874	-2.116	<b>MaTHE14</b>	1.958	-1.805
<b>MaTHE6</b>	2.232	-1.921	<b>MaTHE15</b>	1.842	-1.868
<b>MaTHE7</b>	2.289	-2.132	<b>MaTHE16</b>	2.211	-1.600
<b>MaTHE8</b>	3.568	-1.421	<b>MaTHE17</b>	3.147	-1.905

Protscale (Gasteiger *et al.*, 2005)

**Cuadro 2. 7** Resultados del análisis de hidrofobicidad para las secuencias tipo THESEUS1 de papaya, utilizando el programa Protscale.

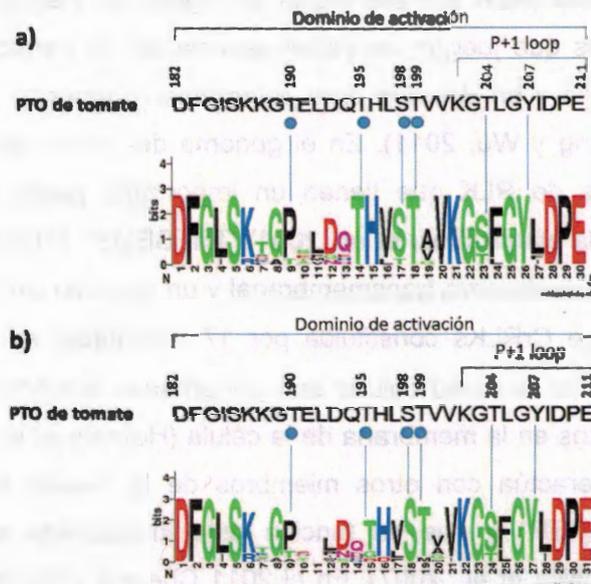
Secuencia	Máximos	Mínimos
CpTHE1	2.426	-1.547
CpTHE2	2.663	-1.547
CpTHE3	2.642	-1.863
CpTHE4	2.537	-2.274
CpTHE5	2.463	-2.700
CpTHE6	1.700	-1.842
CpTHE7	3.263	-2.011
CpTHE8	2.821	-1.979
CpTHE9	2.289	-2.032

Protscale (Gasteiger *et al.*, 2005)

### 2.3.7 Análisis del sitio de activación de secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya

El dominio de activación tiene un papel esencial en la función de PTO, se ha visto en otros estudios que homólogos de PTO de tomate pueden generar una respuesta hipersensible en ausencia del patógeno cuando mutan los residuos 204 y 207 respectivamente (Chang *et al.*, 2002). En este estudio se observó que aunque las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya no son de la misma longitud que PTO de tomate, presentan un dominio cinasa con alta identidad, el cual posee un subdominio de activación que conserva los residuos esenciales que PTO requiere para poder autofosforilarse (Figura 2.6a y Figura 2.6b). Es importante mencionar que el residuo de tirosina (Y) en la posición 207 de PTO actúa como regulador negativo de la muerte celular, al ser sustituido por el residuo de aspartato (D) reduce la carga negativa induciendo una activación constitutiva de la proteína lo que genera la respuesta hipersensible (Rathjen *et al.*, 1999). El residuo de tirosina se mantiene conservado en el subdominio de activación de las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya aunque por el tamaño de las secuencias no corresponde a la misma posición 207 que PTO de tomate sino a la posición 627 en plátano y a la 393 en papaya respectivamente, no

obstante es posible que las versiones mutantes de las secuencias de plátano y papaya desarrollen la respuesta hipersensible en ambos cultivos.



**Figura 2. 6** Representación de aminoácidos conservados en el dominio de activación de las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya. Los aminoácidos esenciales para la autofosforilación del dominio cinasa en PTO de tomate (círculos azules) se encuentran conservados en las secuencias de plátano (a) y papaya (b). Además el residuo de tirosina 207 presente en PTO de tomate corresponde al residuo de tirosina 627 y 393 en las secuencias de plátano MaTHE1 y papaya CpTHE1.

## 2.4 DISCUSIÓN

Los receptores tipo cinasa (RLK por sus siglas en inglés) en plantas comprenden una gran familia de proteínas que juegan un papel esencial en la transducción de señales involucradas en desarrollo y en defensa ante patógenos (Hammond and Parker 2003; Afzal *et al.*, 2008; Cheung y Wu, 2011). En el genoma de *Arabidopsis thaliana* existen cerca de 600 miembros de RLK que tienen un importante papel en el crecimiento, desarrollo y defensa de la planta (Shiu *et al.*, 2004). THESEUS1 (THE1) es una proteína de 855 aminoácidos con un dominio transmembranal y un dominio cinasa serina/treonina, pertenece a la familia de CrRLKs constituida por 17 miembros, se activa únicamente cuando las condiciones de la pared celular son perturbadas actuando como un sensor capaz de detectar defectos en la membrana de la célula (Hématy *et al.*, 2007); al igual se ha demostrado que interactúa con otros miembros de la familia RLK: HÉRCULES1 (HERK1) y FERONIA (FER) y que su función está involucrada en la respuesta a brasinoesteroides (Chinchilla *et al.*, 2007). En el 2011 Cheung y Wu demostraron que la interacción THE1/FER es esencial para mantener la integridad de la pared celular, por otra parte se observó que estos genes podrían estar involucrados en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la célula y tal efecto podría activar la cascada de señalización para inducir genes de defensa y la muerte celular programada (Figura 1.27).

En el presente estudio se planteó llevar a cabo la búsqueda de genes tipo *THESEUS1* en los genomas de plátano y papaya con el objetivo de estudiar su posible función en la muerte celular programada. En los resultados del análisis *in silico* del genoma de plátano las secuencias tipo THESEUS1 obtenidas correspondieron a las secuencias parciales del dominio de cinasa tipo PTO previamente reportadas por Peraza Echeverría *et al.*, (2007), sin embargo, se obtuvieron diecisiete secuencias que compartieron una identidad de 72.1% (MaTHE1) a un 45.2% (MaTHE15) con la proteína THESEUS1 (Hématy *et al.*, 2007) (Cuadro 2.4). En el genoma de papaya se encontraron nueve secuencias que compartieron un porcentaje de identidad de 85.5% (CpTHE1) a un 38.1% (CpTHE8) con la proteína THESEUS1 (Hématy *et al.*, 2007) (Cuadro 2.5). Las secuencias obtenidas en ambos genomas presentaron una longitud de aminoácidos similar a THESEUS1, no obstante, se observó que su dominio cinasa presenta alta identidad con la proteína de resistencia PTO de tomate (Martin *et al.*, 1993) de un 61.3% en la secuencia MaTHE1 de plátano (Cuadro 2.4) y un 59.9% en la secuencia CpTHE1 de papaya (Cuadro 2.5).

Recientemente Dong y colaboradores en el 2009 reportaron la estructura cristalográfica de la interacción de AvrPTO y AvrPTOB con PTO en donde observaron que la interacción se da por separado en dos interfaces, compartiendo una tercera interfase. El análisis tridimensional realizado a las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya demostró que la estructura tridimensional de estas secuencias es muy similar a PTO (Figura 2.4). Por otra parte la caracterización de dominios realizada mediante la base de datos Prosite predijo un motivo de miristoilación cercano al dominio de cinasa de las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya (Figura 2.1). Estos resultados son muy similares a los reportados por Vries y colaboradores en el 2006, donde localizan un motivo de miristoilación presente en PTO de tomate, el cual es un motivo esencial para que PTO pueda anclarse a la membrana de la célula y pueda realizar la función de sensar las moléculas efectoras AvrPto de *Pseudomonas syringae* activando la respuesta inmune de la planta para inducir la HR en el sitio de infección.

Ensayos enfocados en evaluar la función de PTO han utilizado técnicas de mutación sitio dirigida de residuos específicos ubicados en el dominio de activación de la proteína PTO, y han demostrado la forma como se lleva a cabo la interacción de AvrPTO y PTO en hojas de *Nicotiana benthamiana*, donde se ha observado que la interacción de ambas proteínas genera la HR (Rathjen *et al.*, 1999). No obstante estos autores observaron que para que AvrPTO induzca la HR requiere que PTO se mantenga en una conformación activa. Estos autores señalan la importancia de los residuos T204 y Y207 que están ubicados en el segmento conocido como lazo P+1, el cual consta de una secuencia consenso G (T/S) xx (Y/F) x APE de cinasas Ser/Thr (Hanks *et al.*, 1988). Rathjen *et al.*, (1999) demostraron que mutaciones realizadas en esta región inhiben la interacción con AvrPTO específicamente en la segunda y quinta posición de la secuencia consenso del lazo P+1. Para determinar la actividad *in vitro* de estos residuos se realizaron mutaciones puntuales en los sitios T204 y Y207 por el residuo de aspartato (D), debido a que puede mimetizar la carga negativa conferida para inducir una activación constitutiva de la proteína lo que induce finalmente la HR en hojas de *Nicotiana benthamiana* en ausencia del efector AvrPTO (Johnson *et al.*, 1996). Aunque PTO y THESEUS1 son proteínas estructuralmente diferentes, comparten un dominio cinasa serina/treonina muy conservado (Figura 2.1). En otros estudios se ha evaluado la función de genes homólogos de la familia PTO donde se demostró que mutaciones en los residuos T204D y Y207D presentes en el subdominio de activación de la proteína inducen una HR en ausencia del

patógeno en comparación con las secuencias silvestres (Figura 1.24) (Chang *et al.*, 2002). Este argumento es muy importante, debido a que el análisis filogenético realizado con varios miembros de la familia de receptores tipo cinasa y las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya obtenidas en este estudio demostraron que estas secuencias son homólogas a THESEUS1 de *Arabidopsis thaliana* y PTO de tomate (Figura 2.5). Además el alineamiento múltiple realizado en conjunto con la secuencia de PTO permitió observar que los dominios de cinasa de PTO se conservan en las secuencias de plátano y papaya (Figura 2.2 y 2.3). Así mismo, el análisis realizado en el dominio de activación de las secuencias de plátano MaTHE1-MaTHE17 y papaya CpTHE1-CpTHE9, permitió observar que conservan el residuo de tirosina 207 ubicado en la región lazo P+1 del dominio de activación de PTO (Figura 2.7).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en cuanto a la similitud de estructuras, homología con la proteína de resistencia PTO, la alta conservación de los dominios de activación, principalmente el residuo de tirosina 207, se propone un escenario en el que los dominios de cinasa de las secuencias tipo THESEUS1 puedan desarrollar una función similar a PTO, en cuanto a inducir un fenotipo de muerte celular tipo HR en ausencia del patógeno. Este escenario se podría comprobar empleando técnicas de mutagénesis sitio dirigida donde se puedan generar mutantes en la tirosina correspondiente a la tirosina 207 de PTO tal y como se ha reportado en trabajos previos (Rathjen *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2009).

El análisis *in silico* realizado en este capítulo de investigación fue fundamental para continuar el análisis funcional de las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya en el siguiente capítulo. Para este fin se procedió a seleccionar únicamente las secuencias más parecidas a THESEUS1 y a PTO, que fueron las secuencias *MaTHE1* en plátano y *CpTHE1* en papaya que comparten una identidad de 72.1% y 85.5% con THESEUS1 y 61.3% y 59.9% con PTO de tomate respectivamente, con la finalidad de caracterizar su dominio de cinasa de manera independiente para facilitar su análisis funcional. Varios estudios de este tipo se han realizado en otras plantas como por ejemplo: arroz, en donde se demostró que el dominio Ser/Thr del receptor Xa21 mantiene su capacidad de autofosforilación cuando es expresado de manera independiente en células de *E coli* (Liu *et al.*, 2004). Otro estudio realizado en soya indicó que el dominio de cinasa del receptor GmCaMK1 actúa como una proteína capaz de autofosforilarse independientemente a la

unión a calmodulina, identificándose los sitios de autofosforilación en el sitio de activación presentes en el subdominio cinasa VII y VIII (DeFalco *et al.*, 2010). En otro estudio se caracterizó en *A. thaliana* la fosforilación *in vitro* del dominio de cinasa del gen *THESEUS1*, demostrando que presenta un dominio de activación que se fosforila en el residuo de serina (Hématy *et al.*, 2007). Estos antecedentes demuestran que es posible caracterizar funcionalmente el dominio de cinasa de las secuencias tipo *THESEUS1* de plátano y papaya, tomando en cuenta que la caracterización *in silico* realizada mostró que estas secuencias poseen los 11 subdominios cinasa de PTO (Figura 2.2 y 2.3) y sus dominios de activación mantienen los residuos de autofosforilación conservados que hacen que el dominio se active en otras cinasas como PTO (Figura 2.7). De tal forma, estos resultados hacen posible que en el dominio de cinasa de las secuencias tipo *THESEUS1* se pueda realizar la sustitución del residuo de tirosina por el residuo aspartato en la posición 627 y 393 de las secuencias MaTHE1 de plátano y CpTHE1 de papaya, respectivamente, con el fin de evaluar su función en la muerte celular como se demostró en tabaco utilizando la secuencia de PTO (Dong *et al.*, 2009).

Todas la evidencias obtenidas en este capítulo sugieren que podría existir una relación funcional entre el dominio de cinasa de la proteína THE1 y la proteína PTO. Esto tiene cierta relación con lo reportado por Xiang y colaboradores en el 2008, donde demuestran que los dominios de cinasa de los receptores de cinasa FLS2 y EFR pueden detectar a patógenos bacterianos como *P. syringae* activando de esta forma la respuesta inmune innata de la planta (Figura 1.32). El hecho de que PTO sea estructuralmente muy parecido al dominio de cinasa de THE1 es intrigante, pudiese ser que originalmente PTO formó parte de la familia *THESEUS1* y durante su evolución perdió el dominio transmembranal. Otros autores hacen énfasis en que moléculas efectoras como AvrPTO han interactuado con receptores de cinasa inhibiendo su función, este argumento puede ser apoyado por el modelo “decoy”, en donde moléculas efectoras intentan bloquear la respuesta inmune, sin embargo PTO juega un papel esencial para engañar al patógeno simulando ser un receptor de membrana y una vez dada la interacción entre AvrPTO y PTO se activa mediante un proceso de fosforilación la proteína Prf desencadenando la respuesta inmune de la planta, que culmina en la muerte celular programada tipo respuesta hipersensible (Zong *et al.*, 2008). La pregunta sigue abierta, ¿perdió PTO un dominio transmembranal o no?. Se sabe que las proteínas ganan o pierden dominios, mediante procesos de duplicación de genes y rearrreglos, sin embargo, a pesar de que

estas nuevas proteínas cambien ganando o perdiendo dominios, éstos suelen presentar la función que desarrollaban anteriormente en su nueva conformación (Friedberg *et al.*, 2011).

Hasta el momento no existen reportes que demuestren el papel que podrían estar desarrollando la familia de THESEUS1 de *A. thaliana* en la resistencia a patógenos. Sin embargo, Cheung y Wu en el 2012, plantean las posibles funciones que podría tener este tipo de proteína en la respuesta al estrés biótico como puede ser la muerte celular programada.

En los resultados obtenidos en este capítulo se encontró que el dominio de cinasa de las secuencias tipo THESEUS1 presentan homología con PTO y además conservan un subdominio de activación que según reportes previamente mencionados es esencial para poder interactuar con proteínas efectoras y activar una muerte celular del tipo hipersensible (Chang *et al.*, 2002), por lo que se espera que el dominio de cinasa de las secuencias tipo THESEUS1 de los genomas de plátano y papaya presenten una función similar a la de PTO en la muerte celular programada.

**2.5 BIBLIOGRAFIA**

- Afzal. A., Wood A. and Lightfoot D. (2008). Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *The American Phytopathological Society*. 21:507-517
- Arnold. K., Bordoli L., Kopp J. y Schwede T. (2006). The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*. 22:195-201.
- Bjellqvist. B., Hughes G., Pasquali Ch., Paquet N., Ravier F., Sanchez J., Frutiger S. & Hochstrasser D. (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis*. 14:1023-1031.
- Bjellqvist B., Basse B., Olsen E. and Celis J. (1994). Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *Electrophoresis*. 15:529-539.
- Bordoli L., Kiefer F., Arnold K., Benkert P., Battey J. y Schwede T. (2009). Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nature Protocols*. 4:1-13.
- Burland. G. (2000). DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods in Molecular Biology Clifton*. 132:71-91.
- Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.M., and Brenner S.E. (2004) WebLogo: A sequence logo generator. *Genome Research*. 14:1188-1190.
- Chang J., Tai Y., Bernal A., Lavelle D., Stackawicz B. and Michelmore R. (2002). Functional Analyses of the Pto Resistance Gene Family in Tomato and the Identification of a Minor Resistance Determinant in a Susceptible Haplotype. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 15:281-291.
- Chang J., Tai Y., Bernal A., Lavelle D., Stackawicz B. and Michelmore R. (2002). Functional Analyses of the Pto Resistance Gene Family in Tomato and the

Identification of a Minor Resistance Determinant in a Susceptible Haplotype. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 15:281-291.

Chang S. and Martin G. (2010). Effector-triggered immunity mediated by the PTO kinase. *Cell*. 20:1-9.

Cheng W., Munkvold K., Gao H., Mathieu J., Schwizer S., Wang S., Yan Y., Wang J., Martin G. and Chai J. (2011). Structural analysis of *Pseudomonas syringae* AvrPtoB bound to host BAK1 reveals two similar kinase-interacting domains in a type III effector. *Cell Host & Microbe*. 10:616-626.

Cheung A. and Wu H. (2011). THESEUS1, FERONIA and relatives: a family of cell wall-sensing receptor kinases?. *Current Opinion in Plant Biology*. 14:632-641.

Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürbberger T., Jones J., Felix G. and Boller T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448:497–500.

DeFalco T., Chiasson D., Munro K., Kaiser B. and Snedden W. (2010). Characterization of GmCaMK1, a member of a soybean calmodulin-binding receptor-like kinase family. *FEBS Letters*. 584:4717-4724.

D'Hont A., Denoeud F., Aury J., Baurens F., Carreel F., Garsmeur O., Noel B., Bocs S., Droc G., Rouard M., Da C., Jabbari K., Cardi C., Poulain J., Souquet M., Labadie K., Jourda C., Lengellé J., Rodier M., Alberti A., Bernard M., Correa M., Ayyampalayam S., Mckain M., Leebens J., Burgess D., Freeling M., Mbéguié D., Chabannes M., Wicker T., Panaud O., Barbosa J., Hribova E., Heslop P., Habas R., Rivallan R., Francois P., Poirion C., Kilian A., Burthia D., Jenny C., Bakry F., Brown S., Guignon V., Kema G., Dita M., Waalwijk C., Joseph S., Dievart A., Jaillon O., Leclercq J., Argout X., Lyons E., Almeida A., Jeridi M., Dolezel J., Roux N., Risterucci A., Weissenbach J., Ruiz M., Glaszmann J., Quérier F., Yahiaoui N. and Wincker P. (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*. 488: 213-219.

Dong J., Xiao F., Fan F., Gu L., Cang H., Martin G. y Chai J. (2009). Crystal Structure of the Complex between *Pseudomonas* Effector AvrPTOB and the Tomato PTO Kinase

Reveals Both a Shared and a Unique Interface Compared with AvrPTO-PTO. The Plant Cell. 21:1846-1859.

Frederick R.D., Thilmony R.L., Sessa G. and Martin G.B. (1998). Recognition specificity for the bacterial avirulence protein AvrPTO is determined by Thr-204 in the activation loop of the tomato PTO kinase. Mol. Cell, 2, 241–245.

Friedberg F. (2011). Single and multiple CH (calponin homology) domain containing multidomain proteins in *Arabidopsis* and *Saccharomyces*: an inventory. Mol Biol Rep. 38:213-218.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R., Bairoch A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExpASY Server. Editorial John M. Walker. The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. pp. 571-607.

Gertz M., Yu K., Agarwala R., Schäffery A., y Altschul S. (2006). Composition based statistics and translated nucleotide searches: Improving the TBLASTN module of BLAST. BMC Biology. 4:1-14.

Hail T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acid Symp Ser. 41:95-98.

Hammond K. and Parker J. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. Current Opinions in Biotechnology 14, 177-193.

Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. (1988). The eukariotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and clasification. FASEB J. 9:576-596.

Hématy K., Sado P., Tuinen A., Rochange S., Desnos T., Balzergue S., Pelletier S., Renou J. and Höfte H. (2007). A receptor-like kinase mediates the response of *Arabidopsis* cells to the inhibition of cellulose synthesis. Current Biology. 17:922-931.

Higgins D. y Sharp P. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. Gene. 73:237-244.

- Johnson, L.N., Noble, M.D., and Owen, D.J. (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*. 85:149-158.
- Kyte J. & Doolittle R. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*. 157:105-132.
- Larkin M., Blackshields G., Brown N., Chenna R., McGettigan P., McWilliam H., Valentin F., Wallace I., Wilm A., Lopez R., Thompson J., Gibson T. y Higgins D. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23:2947-2948.
- Liu G., Pi L., Walkers J., Ronald P. and Song W. (2002). Biochemical Characterization of the kinase domain of the rice disease resistance receptor-like kinase Xa21. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:20264-20269.
- Martin G., Brommonschenkel S., Chunwongse J., Frary A., Ganai W., Spivey R., Wu T., Earle E. and Tanksley S. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*. 262:1432-1436.
- Ming R., Hou S., Feng Y., Yu Q., Dionne L.A., Saw J.H., Senin P., Wang W., Ly B.V., Lewis K.L., Salzberg S.L. Feng L., Jones M.R., Skelton R.L., Murray J.E., Chen C., Qian W., Shen J., Du P., Eustice M., Tong E., Tang H., Lyons E., Paull R.E., Michael T.P., Wall K., Rice D.W., Albert H., Wang M.L., Zhu Y.J., Schatz M., Nagarajan N., Acob R.A., Guan P., Blas A., Wai C.M., Ackerman C.M., Ren Y., Liu C., Wang J., Na J.K., Shakirov E.V., Haas B., Thimmapuram J., Nelson D., Wang X., Bowers J.E., Gschwend A.R., Delche A.L., Singh R., Suzuky J.Y., Tripathi S., Neupane K., Wei H., Irikura B., Paidi M., Jiang N., Zhang W., Presting G., Windsor A., Navajas P.R., Torres M.J., Feltus F.A., Porter B., Li Y., Burroughs A.M., Luo M.C. Liu L., Christopher D.A., Mount S.M., Moore P.H., Sugimura T., Jiang J., Schuler M.A., Friedman V., Mitchell O.T., Shippen D.E., dePamphilis C.W., Palmer J.D., freeling M., Paterson A.H., Gonsalves D., Wang L., Alam M. (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*. 452:991-996.
- Mysore K., Ascenzo M., He X. and Martin G. (2003). Overexpression of the Disease Resistance Gene Pto in Tomato induces Gene Expression Changes similar to Immune Responses in Human and Fluitfly. *Plant Physiology*. 132:1901-1912.

- Peraza S., James A., Canto B. y Castillo E. (2007). Structural and phylogenetic analysis of Pto-type disease resistance gene candidates in banana. *Mol Genet Genomics*. 278:443-453.
- Pieterse C.M., León R.A., Van der Ent S., Van W.S. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5:103-316.
- Rathjen J., Chang J., Staskawicz B and Michelmore R. (1999). Constitutively active *PTO* induces a Pfr-dependent hypersensitive response in the absence of *avrPTO*. *The EMBO Journal*. 18:3232-3240.
- Saitou N. y Nei M. (1987). The neighbor -joining method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.
- Salomov A. y Solovyev V. (2000). Ab initio gene finding in *Drosophila* genomic DNA .*Genome Research*. 10:516-522.
- Schallus T., Jaeckh C., Féher K., Palma A., Liu Y., Simpson J., Mackeen M., Stier G., Gibson T., Feizi T., Pieler T. and Muhle-Goll C. (2008). Malectin- a novel carbohydrate-binding protein of the endoplasmic reticulum, and a candidate player in the early steps of protein *N*-glycosylation.*Molecular Biology of the Cell*. 19:1404-1414.
- Schultz J., Copley R., Doerks T., Ponting C. and Bork P. (2000). SMART: A web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Researchs*. 28:231-234.
- Sigrist C., Cerutti L., de Castro E., Langendijk-Genevaux P., Bulliard V., Bairoch A., Hulo N. (2010) PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation.*Nucleic Acids Res*. 38:161-166.
- Shiu S., Karlowski W., Pan R., Tzeng Y., Mayer K. and Li W. (2004). *The Plant Cell*. 16:1220-1234.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. y Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24:1596-1599.

- Vries J., Andriotis V., Wu A. and Rathjen J. (2006). Tomato Pto encodes a functional N-myristoylation motif that is required for signal transduction in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*. 45:31-45.
- Xiang. T., Zong. N., Zou. Y., Wu. Y., Zhang. J., Xing. W., Li. Y., Tang. X., Zhu. L., Chai. J. and Zhou. J. (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current Biology*. 18:74-80.
- Xing. W., Zou. Y., Liu. Q., Liu. J., Luo. X., Huang. Q., She. C., Zhu. L., Bi. R., and Hao. Q. (2007). Structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein AvrPto. *Nature*. 449:243-247.
- Zong N., Xiang T., Zou Y., Chia J. and Zhou J. (2008). Blocking and triggering of plant immunity by *Pseudomonas syringae* effector AvrPTO. *Plant Signaling & Behavior*. 3:583-585.
- Zong N., Xiang T., Zou Y., Chia J. and Zhou J. (2008). Blocking and triggering of plant immunity by *Pseudomonas syringae* effector AvrPTO. *Plant Signaling & Behavior*. 3:583-585.

## CAPÍTULO III

### EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN DEL DOMINIO DE CINASA DE SECUENCIAS TIPO THESEUS1 DE PLÁTANO Y PAPAYA EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

México es un país altamente agrícola. Uno de los principales cultivos que ha tomado gran importancia en el mercado de exportación es el del plátano, un fruto considerado como el alimento básico por su alto contenido en vitaminas, fibra y carbohidratos principalmente. Es sin duda un alimento energético de bajo costo y dependiendo de la variedad puede proporcionar hasta un 10% de la dosis diaria recomendada por la FAO en la dieta de un adulto promedio. Por su bajo costo y siendo un alimento energético y nutritivo, es consumido mundialmente por familias de todos los niveles sociales (Canto y Castillo, 2011). Por su parte, la papaya variedad Maradol posee, a diferencia de otras variedades, un mejor sabor, textura y un alto contenido de nutrientes que resulta de interés para el consumidor, y además tiene una vida de anaquel más larga (Claridades Agropecuarias, 1999).

Sin embargo, ambos cultivos presentan enfermedades como la Sigatoka negra y la antracnosis que afectan la producción y calidad del fruto impidiendo de esta manera su comercialización, generando con ello grandes pérdidas a los productores (Churchill, 2010; Zavala-León *et al.*, 2005). Actualmente se tiene conocimiento de los mecanismos de defensa de las plantas contra patógenos biótrofos, hemibiótrofos y necrótrofos, esto abre la posibilidad de realizar la manipulación controlada de genes involucrados en la resistencia contra patógenos con el fin de generar nuevas variedades de plantas resistentes.

La proteína de resistencia PTO es considerada como un modelo de estudio en la interacción planta-patógeno. Es una proteína cinasa Ser/Thr de 321 aminoácidos que reconoce proteínas efectoras del patógeno hemibiótrofo *Pseudomonas syringae* y activa una cascada de señalización que conduce a una respuesta de resistencia tipo respuesta hipersensible en el sitio de ataque del patógeno (Martin *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 2009). De

manera interesante, mutaciones en el sitio de activación de la proteína PTO ocasionan una respuesta hipersensible en ausencia del patógeno (Rathjen *et al.*, 1999), por lo que resulta interesante estudiar este tipo de versiones mutantes de secuencias similares a PTO en cultivos agrícolas, tanto con fines de investigación básica como con fines de mejoramiento genético

En el capítulo II se identificaron genes tipo *THESEUS1* en los genomas de plátano y papaya, cuyos dominios de cinasa mostraron una alta similitud con el dominio cinasa de PTO. Esta similitud sugiere que el dominio de cinasa de secuencias tipo *THESEUS1* podrían tener una función en la muerte celular programada tipo respuesta hipersensible. El objetivo del presente capítulo de investigación fue evaluar la función de los dominios de cinasa de los genes *MaTHE1* de plátano y *CpTHE1* de papaya en la muerte celular programada realizando la expresión transitoria de estos genes en hojas de plátano y papaya respectivamente.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado para este trabajo consistió en hojas de papaya cv Maradol y hojas de plátano cv Enano Gigante y cv Tuu Gia. Las plantas de plátano y papaya fueron cultivadas en contenedores de unicelel en sustrato de una mezcla comercial de peat moss y agrolita, mantenidas a una temperatura de  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e intensidad lumínica de ( $75\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ) con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad las lámparas empleadas fueron Philips T5HO. Las muestras de hoja fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso en la extracción de ácidos nucleicos.

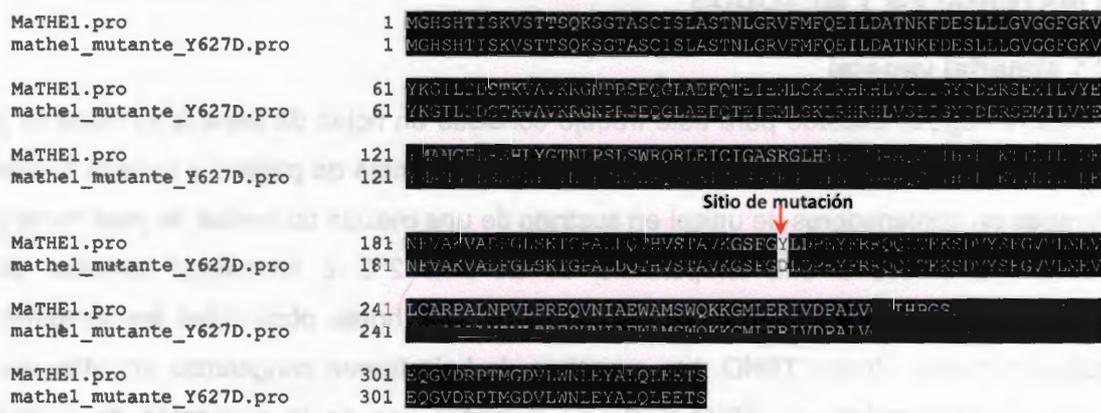
### 3.2.2 Síntesis química de la secuencia MaTHE1 de plátano

En el estudio *in silico* se seleccionó la secuencia más parecida a THESEUS1 y PTO, la cual fue MaTHE1. Se realizó un alineamiento entre esta secuencia con la obtenida parcialmente de la variedad Tuu Gia reportada por Peraza-Echeverría en el 2007 (Figura 3.1).

TgTHE13.pro	1	-----	36
MaTHE1_silico.pro	1	MSHLLHIVKPKNTLAKVLRPSVAVLQVNTNLSRPPMLFADATNHEIANGIIVLRLQK	
TgTHE13.pro	9	YKGTLDGKVAVKRGNPRSEQGLAEFQTRTEPMISKLRHRRLVSLTGYCDPRSEMTIVYE	
MaTHE1_silico.pro	61	YKGTLDGKVAVKRGNPRSEQGLAEFQTRTEPMISKLRHRRLVSLTGYCDPRSEMTIVYE	
TgTHE13.pro	69	YIANGPLRSHLYGTNIPSLSWRQRLEICTIGASRGLHYLHTGAAQSTIHRDYKTTNIMLDE	
MaTHE1_silico.pro	121	YIANGPLRSHLYGTNIPSLSWRQRLEICTIGASRGLHYLHTGAAQSTIHRDYKTTNIMLDE	
TgTHE13.pro	129	NEVAKVADPGLSKTGPALDQTHVSTAVKGSFGYLDPRYFRQQILTEKSDVYSFGVVMEM	
MaTHE1_silico.pro	181	NEVAKVADPGLSKTGPALDQTHVSTAVKGSFGYLDPRYFRQQILTEKSDVYSFGVVMEM	
TgTHE13.pro	189	LCARPALNPVLPREQVNIAEWAMSWQKKGMLERIVDPALVGIHPGSLRKYGDIAEKCLA	
MaTHE1_silico.pro	241	LCARPALNPVLPREQVNIAEWAMSWQKKGMLERIVDPALVGIHPGSLRKYGDIAEKCLA	
TgTHE13.pro	249	EQGVDRPTMGDVLWNLEYALQLEETS	
MaTHE1_silico.pro	301	EQGVDRPTMGDVLWNLEYALQLEETS	

**Figura 3. 1** Alineamiento de la ORF de MaTHE1 predicho *in silico* de plátano variedad DH-Pahang y la secuencia parcial TgTHE13 obtenida de plátano variedad Tuu Gia. Se pueden observar pocos polimorfismos al ser de variedades diferentes, aunque no existen cambios en el dominio de activación.

Para la versión mutante *mathe1*<sup>Y627D</sup> únicamente se modificó el residuo de tirosina ubicado en la posición 627 (Figura 3.2), una vez completado se mandaron a sintetizar los genes MaTHE1 WT y su versión mutante *mathe1*<sup>Y627D</sup> a la empresa GENEART.



**Figura 3. 2** Alineamiento del dominio cinasa MaTHE1 y *mathel*<sup>Y627D</sup> de plátano. La flecha roja indica el cambio del residuo tirosina (Y) por aspartato (D).

### 3.2.3 Extracción de ácidos nucleicos de papaya

#### ADN

El ADN fue extraído utilizando el estuche comercial Illustra Nucleon Phytopure Genomic DNA Extraction (General Electric). Entre 200 y 250 mg de tejido se maceraron en un mortero con nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo, se agregaron 600 µl del reactivo 1 más 10 µl de β-mercaptoetanol y se homogenizó. Seguido se añadieron 200 µl del reactivo 2 y homogenizó. Las muestras fueron incubadas a 65°C por 8 minutos con agitación en lapsos de 2 minutos. Posteriormente fueron enfriadas en hielo por 20 minutos. Transcurrido el tiempo se agregaron 500 µl de cloroformo frío (-20°C) más 100 µl de Nucleon Phytopure Resin, se mezcló por 10 minutos y centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se recolectó en un tubo nuevo, se le agregó un volumen de isopropanol frío (-20°C) e incubó en hielo 10 minutos. Se precipitó el ADN centrifugando a 14000 rpm por 5 minutos, la pastilla fue lavada con 500 µl de etanol al 70% frío (-20°C) se dejó secar a temperatura ambiente. La muestra fue resuspendida en 60 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura, las trazas de ARN fueron degradadas con 1 µl de RNasa A (1 mg/µl) incubando a 37°C por 30 minutos. Finalmente las muestras fueron conservadas a -20°C.

## ARN

El ARN total fue aislado con el amortiguador Tripure Isolation Reagent (ROCHE). Se pesaron entre 100 y 200 mg de tejido de hoja y fueron macerados en un mortero con nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml y se agregaron 900  $\mu$ l de Tripure Isolation Reagent y 24  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se incubaron las muestras a 65°C por 10 minutos mezclando en vórtex en lapsos de 2 minutos. Posteriormente, para separar los ácidos nucleicos del material proteico se agregaron 900  $\mu$ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó con el vórtex y se centrifugaron las muestras a 14000 rpm por 5 minutos. Se recolectó el sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo, seguidamente se agregaron 800  $\mu$ l de isopropanol frío (-20°C) y 50  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M, se mezcló perfectamente e incubó en hielo por 10 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 800  $\mu$ l de etanol al 70%, de la misma manera se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. Se secó la pastilla a temperatura ambiente. Después se resuspendió la pastilla en 40  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultrapura (Invitrogen), tomando únicamente 19  $\mu$ l a los cuales se agregaron 10  $\mu$ l de DNasa (RQ1 Rnase-Free DNase 1 ug/ $\mu$ l; Promega) más 4  $\mu$ l de amortiguador de DNasa (RQ1 DNase 10X Reaction Buffer; Promega) más 1  $\mu$ l de inhibidor de RNasas (RNase OUT 40U/ $\mu$ l; Invitrogen) y se incubó a 37°C por 30 minutos. Para retirar la DNasa se agregaron 700  $\mu$ l del detergente SSTE más 700  $\mu$ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) más 100  $\mu$ l de acetato de sodio 3 M, las fases se separaron centrifugando a 14000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, posteriormente se precipitó el ARN agregando 600  $\mu$ l de isopropanol frío (-20°C), seguidamente se incubó en hielo por 5 minutos y se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos. La pastilla se lavó 2 veces con 800  $\mu$ l de etanol al 70% centrifugando a 14000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en 60  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultrapura y se conservó a -80°C.

### 3.2.4 Cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría

Para calcular la concentración y la pureza del ARN extraído se utilizó un espectrofotómetro SmartSpect plus de Biorad. Para cuantificar la concentración se tomaron 5  $\mu$ l de muestra más 95  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultra pura (dilución 1:20). Para medir la pureza se tomaron 5  $\mu$ l de muestra más 95  $\mu$ l Tris HCl 10 mM pH 7.5 y se calculó la relación de lecturas de absorvancias de A260/A280.

### 3.2.5 Síntesis de ADN complementario

Para la síntesis de ADNc se partió de 10 µg de las muestras de ARN total de papaya por separado. Se agregó 1 µl de oligo dT (50 µM; Invitrogen) y se llevó la reacción a 20 µl totales con H<sub>2</sub>O. Las muestras fueron incubadas a 75°C por 5 minutos para linearizar a los ARN mensajeros y transcurrido el tiempo se colocaron las muestras en hielo por 3 minutos. A la muestra con 20 µl se agregó 8 µl de 5X first strand buffer (amortiguador de enzima), 4 µl de DTT 0.01 M (0.1 M), 4 µl de dNTPs 10 mM (1 mM; Invitrogen), 2 µl de inhibidor de RNasas (RNaseOUT 40U/µl; Invitrogen). Los 38 µl de reacción se dividieron en dos tubos con 19 µl cada uno. Se agregó 1 µl de la enzima reversa transcriptasa (Super Script III 200U/µl; Invitrogen) a el primer tubo y como control negativo de contaminación de ADN genómico se agregó 1µl de H<sub>2</sub>O al segundo tubo. Las reacciones se incubaron a 50°C por 90 minutos, seguido se inactivó la enzima a 75°C por 15 minutos. Posteriormente se agregaron 4 µl de RNasa A (1 mg/µl; Invitrogen) incubando a 37°C por 30 minutos para eliminar el ARN sobrante. Finalmente se agregó 80 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura (dilución 1:5) y se conservó a -20°C.

### 3.2.6 Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para papaya

La reacción de RT-PCR se realizó con 10 µl de ADNc. Se realizó una PCR anidada, en la primera reacción se desnaturalizó a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 68°C por 2 minutos, con una extensión final a 68°C por 5 minutos. En la segunda reacción se desnaturalizó a 95°C por 3 minutos, seguido de 20 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 68°C por 1 minuto, con una extensión final a 68°C por 5 minutos. Como control positivo se utilizaron oligonucleótidos que amplifican el factor de elongación 1 alfa de papaya (EF α1). Para el control negativo se utilizaron los mismos oligonucleótidos con la muestra que no contiene retrotranscriptasa por lo que no se debería ver amplificación, de lo contrario sería indicativo de contaminación. Los oligos que se utilizaron para la RT-PCR se muestran en el Cuadro 3.1

**Cuadro 3. 1** Oligonucleótidos específicos para la amplificación de los genes tipo *THESEUS1* de papaya.

Secuencia <i>in silico</i>	Secuencia de los oligonucleótidos diseñados	
<i>CpTHE1com</i>	Sentido	5'-TAAGAGCTCAACAATGGAGATCCTATGTAGC-3'
	Antisentido	5'-TATGTCGACTTATCTTCCACGAGGATTTAC-3'
<i>CpTHE1kin</i>	Sentido	5'-TAAGAGCTCAACAATGGGAAATTCTCTAACCATG-3'
	Antisentido	5'-TATGTCGACTTATGATGTCTCCTCTAATTG-3'

### 3.2.7 Clonación del gen *CpTHE1* de papaya en el vector pGEM-T-easy

El fragmento amplificado de 981 pb se purificó con el High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE) previo a la clonación, se ajustó el volumen de PCR a 100 µl, en un tubo de microcentrifuga nuevo, se agregaron los 100 µl de muestra más 500 µl de amortiguador de unión y se mezcló hasta homogenizar completamente. Se transfirió la mezcla a una columna de purificación y se centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto. Se descartó el filtrado y se agregaron 500 µl de amortiguador de lavado centrifugando a 14000 rpm por 1 minuto. Se cambió la columna a un tubo de 1.5 ml nuevo, seguido se eluyó el ADN con 50 µl de amortiguador de elución y centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su uso. Para la clonación se utilizó el vector pGEM-T-easy de PROMEGA. La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl con las siguientes condiciones: 7 µl del inserto purificado (*CpTHE1*), 1 µl de amortiguador de ligasa 10X, 1 µl de vector pGEM-T-easy (50ng/µl), 0.8 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura, 0.2 de la enzima T4 ADN ligasa (1 U/µl; New England Biolabs). Se incubó a 4°C por 16 horas y la enzima se inactivó a 65°C por 20 minutos.

Para la transformación se utilizaron 5 µl de la ligación más 200 µl de células competentes de *Escherichia coli* DH10B y se incubaron en hielo por 30 minutos. Se dió un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y agregó 1 ml de medio SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 20 mM glucosa) para recuperar las bacterias a 37°C por 90 minutos a 180 rpm. 100 µl de bacterias fueron

plaqueadas en cajas con medio LB agar con 50  $\mu\text{l}$  de ampicilina (100 mg/ $\mu\text{l}$ ) como antibiótico de selección, 250  $\mu\text{l}$  de IPTG (0.1 M) para inducir la expresión del gen *lacZ* y 80  $\mu\text{l}$  de XGAL (80ug/ $\mu\text{l}$ ) como sustrato de la  $\beta$ -galactosidasa. Posteriormente se incubaron a 37°C por 12 horas para observar colonias blancas y azules.

Para la selección de colonias recombinantes el vector tiene el gen *lacZ* localizado en el sitio de clonación múltiple de manera que cuando el inserto interrumpe el gen no permite la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa dando colonias blancas. Las colonias fueron crecidas en medio LB líquido con 5  $\mu\text{l}$  de ampicilina (100 mg/ $\mu\text{l}$ ) e incubadas a 37°C de 12-16 horas a 215 rpm.

El plásmido fue extraído con el estuche comercial High Pure Plasmid Isolation (ROCHE), se recolectaron las células centrifugando a 9000 rpm por 30 segundos, se agregaron 250  $\mu\text{l}$  de amortiguador de lisis e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, seguido se agregaron 350  $\mu\text{l}$  de amortiguador de unión frío (4°C) e incubó en hielo 5 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, transfiriéndose el sobrenadante a una columna (spin filter tubes) y se centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto. Para lavar se añadieron 700  $\mu\text{l}$  de amortiguador II al filtro y centrifugó a 14000 rpm por 30 segundos. Finalmente se eluyó el ADN plasmídico agregando 50  $\mu\text{l}$  de amortiguador de elución a la columna y se recolectó en un tubo nuevo.

Teniendo el plásmido aislado y purificado se procedió a realizar el análisis de restricción, con 3  $\mu\text{l}$  de plásmido fueron digeridos con 0.15  $\mu\text{l}$  de la endonucleasa EcoRI (20U/ $\mu\text{l}$ ), 2.5  $\mu\text{l}$  de amortiguador 2 10X (NEB) y 19.35  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O ultra pura en una reacción total de 25  $\mu\text{l}$ . Se incubó a 37°C por 2 horas e inactivó la enzima a 65°C por 10 minutos. El plásmido digerido fue observado en un gel de agarosa al 1.2%.

### 3.2.8 Secuenciación

Para la reacción de secuenciación se cuantificaron los plásmidos por espectrofotometría. Para cada secuencia 5' y 3' se realizaron 2 reacciones de secuenciación con oligonucleótidos específicos que flanquean el sitio de clonación múltiple del vector pGEM-T-easy. La secuenciación se basó en el método de Sanger usando dideoxinucleótidos (dNTPs) que son nucleótidos que carecen de un grupo 3 -OH. La reacción se llevó a cabo con 5  $\mu\text{l}$  del plásmido recombinante, 1  $\mu\text{l}$  de Big Dye terminator v3.1 Cycle sequencing Kit; Applied Biosystems, 3.5  $\mu\text{l}$  de amortiguador 5X, 1  $\mu\text{l}$  de oligonucleótidos (sentido o

antisentido) y 9.5 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura. El programa de amplificación fue 95°C por 30 segundos, 35 ciclos de 95°C 30 segundos, 50°C 30 segundos y 60°C 4 minutos. Con una extensión final a 60°C por 20 minutos. Posteriormente se purificó la amplificación de secuenciación agregando 75 µl de una solución de etanol con 0.2 mM de Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 20 µl de la reacción de PCR, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Seguido se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos y se eliminó el sobrenadante por decantación. Finalmente se dejó secar la pastilla. Las muestras purificadas fueron procesadas por AGRF (Australian Genome Research Facility).

### 3.2.9 Análisis Bioinformático

Los cromatogramas de cada secuencia fueron ensamblados con el programa SeqMan (DNASTAR Lasergene v 7.2.1) con el fin de obtener las secuencias sentido-antisentido. Para verificar que las lecturas fueran correctas se tomaron en cuenta solo los cromatogramas que presentaran una lectura bien definida y clara.

En papaya una vez ensambladas las secuencias se realizó un alineamiento con la secuencia *in silico* de *CpTHE1* con el programa MegAlign (DNASTAR Lasergene v 7.2.1). Este alineamiento fue para descartar que las secuencias presentaran mutaciones puntuales.

### 3.2.10 Mutagénesis de *cpthe1*<sup>Y393D</sup> de papaya

Para realizar la mutante *cpthe1*<sup>Y393D</sup> se utilizó el QuikChange ® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), la mutación es sitio dirigida por lo que la se tradujo la secuencia de nucleótidos de *cpthe1*<sup>Y393D</sup> (Figura 3.3).

1	ATG GGA AAT TCT CTA ACC ATG ACA AAA ATG TCA ACA ACT TCA CAA	45
1	M G N S L T M T K M S T T S Q	15
46	AAG AGT GCA ACA GCA AGC TGC ATC TCA TTA GCT TCC TCC AAC CTT	90
16	K S A T A S C I S L A S S N L	30
91	GGC AGG TTT TTC ATG TTC CAA GAA ATC CTG GAT GCA ACC AAC AAA	135
31	G R F F M F Q E I L D A T N K	45
136	TTT GAT GAG AGC CTA TTG CTA GGG GTT GGT GGT TTT GGT AGG GTA	180
46	F D E S L L L G V G G F G R V	60
181	TAC AAG GGA ACA CTT GAA GAT GGA ACC AAG GTA GCT GTC AAG AGA	225
61	Y K G T L E D G T K V A V K R	75
226	GGA AAT CCC AGG TCT GAA CAA GGC CTT GCT GAA TTC CGA ACT GAG	270
76	G N P R S E Q G L A E F R T E	90

271	ATT GAA ATG TTA TCT AAG CTC CGT CAC CGC CAC CTT GTC TCT CTT	315
91	I E M L S K L R H R H L V S L	105
316	ATT GGC TAC TGT GAT GAA AGA TCA GAA ATG ATT CTT GTT TAT GAA	360
106	I G Y C D E R S E M I L V Y E	120
361	TAC ATG GCC AAT GGA CCT CTC AGA AGT CAC CTT TAT GGA ACA GAT	405
121	Y M A N G P L R S H L Y G T D	135
406	CTG CCA CCT CTG TCA TGG AAG CAG CGG CTT GAA ATA TGC ATC GGA	450
136	L P P L S W K Q R L E I C I G	150
451	GCT GCA AGG GGA CTT CAT TAT CTT CAC ACT GGT GCA GCA CAA AGT	495
151	A A R G L H Y L H T G A A Q S	165
496	ATT ATT CAT CGA GAT GTG AAG ACA ACA AAC ATT CTC TTG GAT GAG	540
166	I I H R D V K T T N I L L D E	180
541	AAC TTC GTG GCT AAA GTT GCT GAT TTT GGC TTA TCA AAA ACA GGT	585
181	N F V A K V A D F G L S K T G	195
586	CCA TCT CTT GAT CAG ACA CAT GTC AGT ACT GCT GTT AAG GGT AGT	630
196	P S L D Q T H V S T A V K G S	210
631	TTT GGC GAC CTG GAT CCT GAA TAC TTT CGA AGG CAA CAG CTC ACT	675
211	F G D L D P E Y F R R Q Q L T	225
676	GAG AAA TCA GAC GTA TAT TCT TTT GGG GTG GTT CTA ATG GAA GTA	720
226	E K S D V Y S F G V V L M E V	240
721	CTC TGT ACT AGA CCA GCT TTA AAT CCT GTT CTT CCC AGG GAG CAA	765
241	L C T R P A L N P V L P R E Q	255
766	GTT AAT ATA GCA GAA TGG GCA ATG ACT TGG CAA AAG AAA GGC ATG	810
256	V N I A E W A M T W Q K K G M	270
811	TTG GAT CAA ATC ATG GAT TCA AAT CTG GTG GGG AAG GTG AAT CCA	855
271	L D Q I M D S N L V G K V N P	285
856	GCT TCT CTT AAG AAA TAT GGG GAG ACA GCT GAG AAA TGT CTG GCT	900
286	A S L K K Y G E T A E K C L A	300
901	GAG CAT GGA GTT GAC AGG CCA TCA ATG GGT GAT GTC TTG TGG AAT	945
301	E H G V D R P S M G D V L W N	315
946	CTT GAA TAT GCT CTT CAA TTA GAG GAG ACA TCA TAA	981
316	L E Y A L Q L E E T S *	

**Figura 3. 3** Secuencia de nucleótidos traducida de *cpthe1*<sup>Y393D</sup>. Se muestra el área tomada para el diseño de los oligonucleótidos de la mutante (amarillo) y el aminoácido mutado (verde).

Se realizó una mutación puntual para ello se diseñaron dos oligonucleótidos que flanquean la base que se mutó para cambiar el codón TAC que codifica para una tirosina (Y) por el codón GAC que codifica para ácido aspártico (D) (Cuadro 3.2).

**Cuadro 3.2** Oligonucleótidos para generar la mutante *cpth1*<sup>Y393D</sup> en papaya variedad maradol.

<i>Cpth1</i> <sup>Y393D</sup>	Sentido	5' GTAGTTTTGGCGACCTGGATCCTGAATACTTTTCG 3'
	Antisentido	5' CATCAAACCGCTGGACCTAGGACTTATGAAAGC 3'

Para la reacción de PCR se utilizó 5 µl de amortiguador de reacción 10X, 2 µl (10 ng) de plásmido, 1.25 µl (125 ng) de oligonucleótido 5', 1.25 µl (125 ng) de oligonucleótido 3', 1 µl de dNTPs, 1 µl de Pfu Ultra High-Fidelity DNA Polimerase (2.5 U/ µl) y 38 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura. Los parámetros de la PCR fueron desnaturalizar a 95°C por 30 segundos, seguido de 18 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto y una extensión final a 68°C por 5 minutos, al terminar se colocó la muestra en hielo 2 minutos y se almacenó a 4°C.

Las muestras amplificadas fueron tratadas con la endonucleasa DpnI (que digiere específicamente ADN metilado o hemimetilado) para digerir el ADN parental (el cual está metilado y es susceptible a la digestión con DpnI) y de esta manera seleccionar el ADN que contenga la mutación. Para ello se agregó 1 µl de DpnI (100 U/µl) y se incubó a 37°C por 1 hora. Para la transformación de células competentes de *E. coli* XL1 blue, se tomó 50 µl de bacterias más 1 µl de ADN digerido y 50 µl de bacterias más 1 µl del vector pUC18 como control de transformación. La mezcla de bacterias más el ADN fueron incubadas en hielo por 30 minutos, posteriormente se dió un choque térmico a 42°C por 45 segundos y colocó los tubos en hielo por 2 minutos. Para recuperar a las bacterias se agregó 500 µl de medio SOC e incubó a 37°C por 2 horas en agitación constante 225-250 rpm.

Se plaquearon 100 µl de bacterias con el plásmido mutante y 5 µl de plásmido pUC18+ 200 µl de medio SOC en cajas con LB conteniendo 100 mg/µl de ampicilina, 100 mM de IPTG y 80 µg/µl de X-Gal. Se incubaron a 37°C por 12-16 horas. Se realizó la selección de 5 colonias blancas que contienen el inserto mutado, inoculadas en medio LB líquido con 100mg/µl de ampicilina fueron incubadas a 37°C por 12-16 hrs a 215 rpm.

Finalmente se extrajo el plásmido con el estuche comercial High Pure Plasmid Isolation (ROCHE), el mapa físico de la construcción mutante *cpth1*<sup>Y393D</sup> quedó con los mismo sitios de restricción en pGEM-T-easy por lo que se realizó el análisis de restricción con 3

μl de plásmido digeridos con 0.15 μl de EcoRI (20U/μl), 2.5 μl de amortiguador 2 10X (NEB) y 19.35 μl de H<sub>2</sub>O ultra pura en una reacción total de 25 μl. Se incubó a 37°C por 2 horas e inactivo la enzima a 65°C por 10 minutos. El plásmido digerido fue observado en un gel de agarosa al 1.2%.

### 3.2.11 Subclonación del los fragmentos *MaTHE13:: NOS*, *mathe1<sup>Y627D</sup>:: NOS* y el promotor Ubiquitina-1 en el vector de expresión pCAMBIA2200

Una vez obtenida la síntesis de los genes *MaTHE1* y *mathe1<sup>Y627D</sup>* se confirmó la integridad de las secuencias mediante un análisis de restricción con las enzimas BamHI-HindIII para liberar de los plásmidos 12AA6PEC\_MaTHE1 y 12AA6PDC\_MaTHE1 Y627D los fragmentos *MaTHE1* y *mathe1<sup>Y627D</sup>* de 1237 pb que incluyen el gen de interés junto al terminador NOS (Nopalina Sintasa). Confirmado los tamaños esperados, así como los cromatogramas de GenArt, se procedió a realizar la clonación de los fragmentos de interés en el vector de expresión pCAMBIA 2200, por tal motivo se realizó la digestión de los plásmidos 12AA6PEC\_MaTHE1, 12AA6PDC\_MaTHE1 Y627D y pCAMBIA 2200 con las enzimas BamHI-HindIII, se tomó 1 ug (5μl) de cada plásmido por separado con 0.5 μl de BamHI (20U/μl), 0.5μl de HindIII (20U/μl), 5 μl de amortiguador 2 10X (NEB), 0.5 μl de BSA 100X y 38.5 μl de H<sub>2</sub>O ultra pura en una reacción total de 50 μl. Se incubó a 37°C por 2 horas e inactivó la enzima a 65°C por 20 minutos. La digestión se visualizó en un gel de agarosa al 1.2% para corroborar la liberación de los fragmentos de interés. En el caso de los genes *MaTHE1::NOS* y *mathe1<sup>Y627D</sup>::NOS* las bandas liberadas fueron cortadas para posteriormente ser purificadas con el estuche comercial QIAquick Gel Extraction (QIAGEN); Se verificó que ambas enzimas pudieran cortar el vector pCAMBIA 2200 completamente para posteriormente ser purificado con el estuche comercial High Pure PCR Product Purification (ROCHE). Finalmente, previo a la ligación se verificó la relación vector-inserto en un gel de agarosa al 1.2%.

Para la reacción de ligación se tomó 1 μl de vector, 7 μl de inserto (*MaTHE1::NOS* y *mathe1<sup>Y627D</sup>::NOS*), 1 μl de ligasa T4 DNA (NEB), 1 μl de amortiguador de ligasa 10X (NEB) en un volumen final de 10 μl. La ligación se incubó a 4°C por 14 horas y transcurrido el tiempo se inactivó la enzima a 65 °C por 20 minutos. El total de la ligación se tomó para transformar 200 μl de células competentes de *E. coli* DH10B por choque térmico con las condiciones que se emplearon anteriormente. 100 μl de las bacterias

recuperadas se plaquearon en cajas con medio LB agar con 25 µl de cloramfenicol (10 mg/L) como antibiótico de selección e incubaron a 37 °C por 12 horas. Se picaron 5 colonias para inocular tubos con 5 ml de LB líquido + 5 µl de cloramfenicol (10 mg/L) y se incubaron a 37°C por 12 – 16 horas a 225 rpm.

Se extrajo el ADN plasmídico con el estuche comercial QIAprep miniprep (QIAGEN) y se realizó el análisis de restricción con 1 ug (5µl) de ADN, 0.5 µl de BamHI (20U/µl), 0.5 µl de HindIII (20U/µl), 5 µl de amortiguador 2 10X (NEB), 0.5 µl de BSA 100X y 38.5 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura en una reacción total de 50 µl. La reacción se incubó a 37°C por 2 horas, se inactivó las enzimas a 65°C por 20 minutos. Finalmente se corrió un gel de agarosa al 1.2% para verificar las clonas positivas.

Una vez obtenidas las construcciones pCAMBIA 2200::*MaTHE1*::NOS y pCAMBIA 2200::*mathe1*<sup>Y627D</sup>::NOS. Se procedió a realizar la clonación del promotor ubiquitina-1 (Ubi-1) en las construcciones correspondientes, se realizó la digestión del vector pBLUESCRIPT SK (-) que contiene el promotor Ubi-1 con las enzimas SacI-BamHI, tomándose 1ug (5µl) de cada plásmido por separado con 0.5 µl de SacI (10U/µl), 0.5 µl de BamHI (20U/µl), 5 µl de amortiguador 4 10 X (NEB), 0.5 µl de BSA 100X y 38.5 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura en una reacción total de 50 µl. Se incubó a 37°C por 2 horas e inactivo la enzima a 65°C por 20 minutos. Seguido se visualizó en un gel de agarosa al 1.2% la liberación del promotor de Ubi-1, el fragmento correspondiente a la banda del promotor se cortó del gel y se purificó con el estuche comercial QIAquick Gel Extraction (QIAGEN), a su vez también se purificaron los vectores pCAMBIA 2200 linearizados con el estuche comercial High Pure PCR Product Purification (ROCHE). Finalmente se verificó la relación vector-inserto en un gel de agarosa al 1.2% para su posterior ligación.

Para realizar la ligación se tomaron las siguientes condiciones: 1 µl de vector, 5 µl de inserto (promotor Ubi-1), 1 µl de ligasa T4 DNA (NEB), 1 µl de amortiguador de ligasa 10X (NEB) y 2 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura en una reacción total de 10 µl. Se incubó la ligación a 4°C por 14 horas e inactivó la enzima a 65°C por 20 minutos. Las condiciones de transformación de células competentes de *E. coli* DH10B fueron las anteriormente mencionadas. Se plaquearon 100 µl de bacterias recuperadas en cajas con medio LB con 25 µl de cloramfenicol (10mg/L) como agente selectivo y se se incubaron a 37°C por 12 horas. Se analizaron 5 colonias crecidas en 5 ml de medio LB líquido más 5µl de cloramfenicol (10mg/L), se extrajo el ADN plasmídico con el estuche comercial QIAprep

miniprep (QIAGEN) y finalmente se realizaron dos análisis de restricción: uno para verificar la clonación del promotor Ubi-1 utilizando 1 ug (5 µl) de ADN, 0.5 µl de SacI (10U/µl), 0.5 µl de BamHI (20U/µl), 5µl de amortiguador 4 10X (NEB), 0.5 µl de BSA 100X y 38.5µl de H<sub>2</sub>O en una reacción total de 50µl y la otra digestión fue para corroborar la liberación del cassette completo de Ubi1::*MaTHE1*::NOS y Ubi-1::*mathe1*<sup>Y627D</sup>::NOS, tomando 1 ug (5µl) de ADN, 0.5 µl de SacI (10U/µl), 1µl de HindIII (20U/µl), 5µl de amortiguador 4 10X (NEB), 0.5µl de BSA 100X y 38µl de H<sub>2</sub>O en una reacción total de 50µl. Las digestiones fueron incubadas a 37°C durante 2 hrs, posteriormente se inactivaron las enzimas y se visualizó la muestra en un gel de agarosa al 1.2% y se seleccionaron las clonas positivas.

### 3.2.12 Subclonación de los fragmentos *CpTHE1* y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> en el vector de expresión pCAMBIA 2200::35S::NOS

Una vez obtenidos los resultados de secuenciación de los genes *CpTHE1* y *cpthe1*<sup>Y393D</sup>. Se confirmó la integridad de las secuencias, en el caso del gen mutante *cpthe1*<sup>Y393D</sup> si presentó únicamente la mutación deseada. Para realizar el análisis funcional, se subclonaron los fragmentos de interés en el vector de expresión pCAMBIA 2200 35S::NOS (Previamente modificado en el laboratorio).

Para la subclonación se digirió el ADN plasmídico correspondiente y el vector pCAMBIA 2200 35S::NOS, con las enzimas de restricción Sac I – Sal I. Debido a que los amortiguadores de las enzimas no eran compatibles, se realizó primero la digestión de 1 ug (5µl) de ambas muestras por separado con 0.25 µl de Sac I (20U/µl), 5 µl de amortiguador 4 10X (NEB), 0.5 µl de BSA 100X y 39.5 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura en una reacción total de 50 µl. Se incubó a 37°C por 2 horas e inactivó la enzima a 65°C por 20 minutos. El plásmido digerido fue observado en un gel de agarosa al 1.2%. Para remover las trazas de amortiguador en el ADN digerido, fue purificado por columna en líquido utilizando el estuche comercial High Pure PCR Product Purification (ROCHE) y se eluyó en 40 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura. Posteriormente se procedió a realizar la digestión de los 40 µl de ADN con 0.25 µl de Sal I (20U/µl), 5 µl de amortiguador 3 10X (NEB), 0.5 de BSA 100X y 4.5 µl de H<sub>2</sub>O ultra pura en una reacción total de 50 µl. De la misma manera se incubó a 37°C por 2 horas, se inactivó la enzima a 65°C por 20 minutos. Los 50 µl digeridos fueron purificados en gel con el estuche comercial QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) y al

termino de la purificación se verificó la relación vector-inserto en un gel de agarosa al 1.2%.

Para la reacción de ligación se siguió la siguiente relación vector – inserto, 3  $\mu$ l de vector, 7  $\mu$ l de inserto (*CpTHE1* y *cpthe1*<sup>Y393D</sup>), 1  $\mu$ l de ligasa T4 DNA (NEB), 2  $\mu$ l de amortiguador de ligasa 10X (NEB) y 7  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultra pura en un volumen total de 20  $\mu$ l. La ligación se incubó a 4°C por 14 horas y transcurrido el tiempo se inactivo la enzima a 65 °C por 20 minutos. El total de la ligación se tomó para transformar 200  $\mu$ l de células competentes de *E. coli* DH10B por choque térmico con las condiciones que se emplearon anteriormente, 100  $\mu$ l de las bacterias recuperadas se plaquearon en cajas con medio LB agar con 25  $\mu$ l de cloramfenicol (10 mg/L) como antibiótico de selección e incubaron a 37 °C por 12 horas. Se picaron 5 colonias para inocular tubos con 5 ml de LB líquido más 5  $\mu$ l de cloramfenicol (10 mg/L) y se incubaron a 37°C por 12 – 16 horas a 225 rpm.

Se extrajo el ADN plasmídico con el estuche comercial QIAprep miniprep (QIAGEN) y se realizó el análisis de restricción con 1  $\mu$ g (5 $\mu$ l) de ADN, 0.5  $\mu$ l de EcoRI (20U/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l de HindIII (20U/ $\mu$ l), 5  $\mu$ l de amortiguador 2 10X (NEB) y 39 $\mu$ l de de H<sub>2</sub>O ultra pura en un volumen total de 50  $\mu$ l. La reacción se incubó a 37°C por 2 horas, se inactivaron las enzimas a 65°C por 20 minutos. Finalmente se corrió un gel de agarosa al 1.2% para verificar las clonas positivas.

### 3.2.13 Micropropagación de plantas de plátano

Para los experimentos de transformación temporal previamente se llevó a cabo la micropropagación de plátano, donde únicamente se realizaron resiembras para su mantenimiento en medio MS modificado (Murashige and Skoog, 1962) (Cuadro 3.3). Fueron mantenidas en condiciones de 16 hrs de luz y 8 hrs de oscuridad, con una intensidad lumínica (75  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>s) a una temperatura de 25°C  $\pm$ 2°C.

**Cuadro 3. 3** Medios de cultivo para el mantenimiento de plantas de plátano

Soluciones	MS para plátano*
	1 litro
Macronutrientes 10X	100 ml
Micronutrientes 100X	10 ml
Fe EDTA 100X	10 ml
Vitaminas 100X	10 ml
Ácido ascórbico (100 mg/ml)	0.1 ml (100 µl)
Sacarosa	30 gr
pH (KOH/HCl)	5.8
Gelrite	2 gr

\* Modificaciones realizadas según el cultivo a partir de Murashige and Skoog, 1962

### 3.2.14 Transformación temporal de los genes *MaTHE1* WT y *CpTHE1* WT y sus versiones mutantes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393D</sup>, en hojas de plátano y papaya

La transformación transitoria se realizó mediante bombardeo de micropartículas (biobalística) de acuerdo al protocolo descrito por Henry *et al.*, 2005 con previas modificaciones estandarizadas en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas y Cultivos Tropicales del CICY.

El material vegetal utilizado para la transformación transitoria consistió en la toma de la segunda hoja nueva completa de plantas de aproximadamente un año de edad de plátano y papaya. Estas plantas fueron cultivadas en recipientes de unicel en sustrato de una mezcla comercial de peat moss y agrolita, mantenidas a una temperatura de 26°C ± 2°C e intensidad lumínica de (75 µmol/m<sup>2</sup>s) con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. La desinfección de las hojas consistió de lavados con una solución de cloro al 10% y tween 20 en 50 ml de agua destilada estéril durante 10 minutos en agitación constante. Posterior a la desinfección las hojas fueron transferidas en cajas Petri con agar al 1%. Para el caso de las plantas *in vitro* de plátano se utilizaron plantas de tres meses de edad mantenidas en medio MS para plátano (Cuadro 3.3).

El día de la transformación las membranas macroacarreadoras y las membranas de ruptura de BIORAD se esterilizaron en una caja petri con etanol al 100% por 10 minutos, transcurrido el tiempo se colocaron sobre papel kleenex. Las membranas

macroacarreadoras se colocaron en el portamacroacarreador con la parte cóncava hacia arriba y se mantuvieron en condiciones de esterilidad hasta su uso. Para el preparado de la muestra se empleó 3 ug de plásmido y fue recubierto con partículas de oro de 0.6 micras en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se le agregaron 50 µl CaCl<sub>2</sub> y vortexeo 5 segundos, seguido se agregaron 20 µl de espermidina y vortexeó 5 segundos, la muestra se incubó 20 minutos en hielo. Finalmente se realizaron 5 lavados agregando 200 µl de etanol al 100% y centrifugando a 13 000 rpm por 1 minuto. La pastilla se resuspendió en 30 µl de etanol al 100% y se tomaron 5 µl para montar cada una de los portamacroacarreadores y se dejó secar. Las muestras fueron montadas en la cámara de biobalística y las cajas Petri se ajustaron en el nivel 2 (cajas petri) y nivel 4 (cajas magenta) para el bombardeo, se generó un vacío a 25 mm de Hg y la presión del disparo fue de 1100 psi. Las muestras bombardeadas fueron mantenidas en condiciones de 16 hrs de luz y 8 hrs de oscuridad a una temperatura de 25°C constante monitoreadas diariamente para observar el fenotipo durante 7 días. La tinción de GUS (SIGMA), para visualizar los controles de la transformación con el gen reportero GUS se realizó al 2º día después de la transformación. Para ello cada muestra fue colocada en tubos de microcentrífuga a la cual se agregó 1 ml del reactivo GUS (SIGMA), se le dio un vacío a 25 mm de Hg por 10 minutos para que la solución penetrara en las hojas, posteriormente fueron incubados a 37°C durante 24. Al día siguiente se realizaron lavados con etanol al 100% para retirar la clorofila presente en las hojas y de esta manera poder visualizar el tejido transformado. Para la transformación se realizaron tres repeticiones por cada muestra experimental.

### **3.2.15 Evaluación del fenotipo de las hojas transformadas con los genes *MaTHE1* y *CpTHE1* y sus versiones mutantes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> en hojas de plátano y papaya.**

La muerte celular tipo respuesta hipersensible generalmente se manifiesta con la presencia de puntos de color café oscuro en el tejido que está siendo atacado por algún patógeno. Esta coloración se debe a la liberación de compuestos fenólicos y también a la producción de especies reactivas de oxígeno, principalmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que actúa como molécula señalizadora modulando la activación de genes relacionados en la defensa de la planta (Thordal *et al.*, 1997).

Las hojas bombardeadas fueron analizadas todos los días partiendo del día 1 hasta finalizar en el día 8, las muestras fueron visualizadas con un estereomicroscopio Stemi DV4 (Carl Zeiss) y las imágenes fueron capturadas con una cámara AxioCam ERc 5s (Carl Zeiss).

En el día 8, finalmente se analizó el fenotipo de muerte celular en las hojas que expresaban los genes *MaTHE1* y *CpTHE1* y sus versiones mutantes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393D</sup>. Para detectar la acumulación de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que como especie reactiva de oxígeno generalmente está asociado con la muerte celular programada, se realizó el ensayo de DAB (3,3 Diaminobenzidina), utilizando el kit comercial SIGMAFAST (SIGMA) que consiste en una mezcla entre el reactivo DAB 0.7 mg/ml, peróxido de hidrógeno 0.67 mg/ml y urea. La reacción contiene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el fin de acelerar la reacción de peroxidación (Figura 3.4) para poder ver resultados en 10 minutos, sin embargo, se puede utilizar el reactivo DAB sin agregar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de esta forma poder detectar únicamente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno de la muestra a evaluar con un tiempo de espera de 8 hrs aproximadamente.

Para el ensayo realizado se tomaron las hojas bombardeadas incluyendo los controles y se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL, se agregó a cada tubo la solución DAB hasta cubrir la hoja en su totalidad, inmediatamente se incubó las muestras durante 5 minutos (en hojas de papaya) y 10 minutos (en hojas de plátano) en oscuridad total. Transcurrido el tiempo se retiró la solución DAB con agua destilada y se colocaron las muestras en etanol absoluto al 100% durante 5 días para retirar la clorofila presente en las hojas, finalmente se realizó la toma de fotos de las hojas sometidas a la tinción y se comparó el fenotipo con los controles.



**Figura 3. 4** Reacción bioquímica de peroxidación (Thordal *et al.*, 1997).

Se tomó las hojas transformadas incluyendo los controles y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 2 mL, se agregó a cada tubo la solución DAB hasta cubrir la hoja en su totalidad, inmediatamente se incubaron las muestras durante 5 minutos (en hojas de papaya) y 10 minutos (en hojas de plátano) en oscuridad total. Transcurrido el tiempo se retiró la solución DAB con agua destilada y se colocaron en etanol absoluto al 100% durante 5 días para retirar la clorofila presente en las hojas, finalmente se realizó la tomá de fotos de las hojas sometidas a la tinción y se comparó el fenotipo con los controles.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Aislamiento de ácidos nucleicos

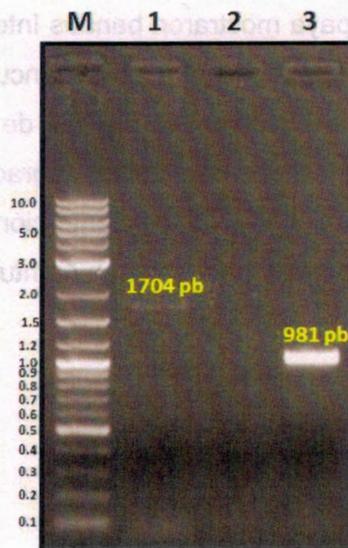
Los resultados del aislamiento de ADN genómico de papaya mostraron bandas íntegras, con una concentración de 2036.29 ng/μl (papaya) observándose que no se encuentra degradado (Figura 3.5a). En el ARN aislado se pudieron observar las bandas de RNA ribosomal 25S y 18S íntegras, indicando que los ARN mensajeros no estaban degradados y serían útiles para realizar la síntesis de ADNc (Figura 3.5b). La concentración y la calidad del ARN fue de 1.607 ng/μl para papaya. La pureza en la muestra se mantuvo en los parámetros requeridos de 1.8 y 2.



**Figura 3. 5** Extracción de ácidos nucleicos de papaya. Muestras de variedad Maradol ADN (a) y ARN (b).

### 3.3.2 Amplificación de los genes *CpTHE1* a partir de ADNc de papaya

Debido a la baja expresión del dominio de cinasa del gen *CpTHE1* se realizó una PCR anidada y los fragmentos de *CpTHE1* fueron obtenidos en la segunda PCR con 20 ciclos (Figura 3.6). Los resultados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.2% utilizando como marcador molecular el 2-Log DNA Ladder (NEB). Los amplicones obtenidos fueron de los tamaños esperados, 1704 pb que corresponde al gen *CpTHE1* completo y 981 pb del dominio de cinasa del gen *CpTHE1* respectivamente. Únicamente se empleó el fragmento que corresponde al dominio de cinasa del gen *CpTHE1* para realizar la evaluación funcional.



M. Marcador molecular 2-Log (NEB)

1. *CpTHE1* completa (1er PCR)

2. *CpTHE1* dominio cinasa (2° PCR 10 ciclos)

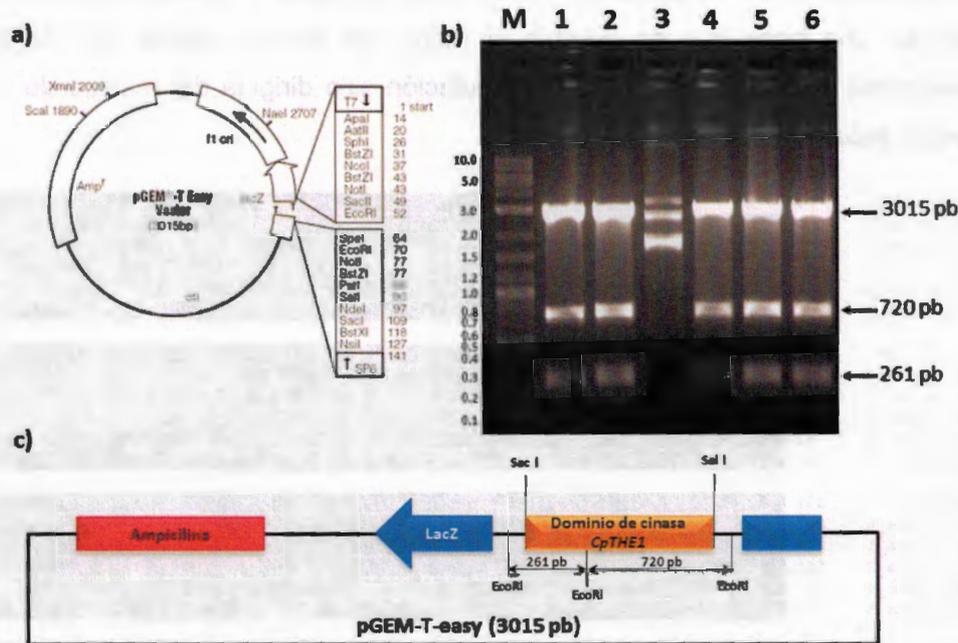
3. *CpTHE1* dominio cinasa (2° PCR 20 ciclos)

**Figura 3. 6.** Resultados de RT-PCR anidada de *CpTHE1* de papaya Maradol. Se partió de una RT-PCR con ADNc como templado, el resultado fue un fragmento de 1704 pb que corresponde al gen completo *CpTHE1* (carril 1), únicamente la PCR anidada con 20 ciclos amplificó un fragmento de 981 pb correspondiente al dominio cinasa del gen *CpTHE1* (carril 3).

### 3.3.3 Clonación del fragmento correspondiente al dominio de cinasa de *CpTHE1* de papaya

Los plásmidos extraídos de colonias de *E. coli* previamente transformadas con el vector pGEM-T-easy fueron digeridos con EcoRI para liberar el fragmento clonado. El análisis mostró que el fragmento de *CpTHE1* se insertó correctamente en el vector, debido a que el fragmento *CpTHE1* tiene un sitio de restricción EcoRI interno en su secuencia se

observaron tres bandas, una que correspondía al vector (3015 pb) y dos que sumaban 981 pb del inserto (Figura 3.7). Las clonas positivas al análisis fueron secuenciadas.



**Figura 3. 7** Clonación de la secuencia *CpTHE1* WT de papaya en el vector pGEM-T-easy. a) Mapa físico del vector de clonación con sus respectivos sitios de clonado múltiple. b) Los carriles 1-6 indican la digestión del vector pGEM-T-easy con la enzima de restricción *EcoRI* para liberar los insertos correspondientes al producto de la PCR anidada de *CpTHE1* WT de papaya, el inserto tiene un sitio de corte de *EcoRI* por tal razón se observan dos bandas que suman el peso esperado. La banda de 3015 pb es el vector pGEM-T-easy linealizado. c) Mapa físico de pGEM-T-easy con la secuencia *CpTHE1*.

### 3.3.4 Alineamiento de la ORF *CpTHE1* del cv Maradol con la ORF *CpTHE1* del cv SunUp

Las 5 secuencias obtenidas de la secuenciación fueron ensambladas sentido-antisentido para ser alineadas con la ORF predicha de *CpTHE1* *in silico* (Figura 3.8).

El alineamiento mostró que las secuencias presentaron mutaciones puntuales debido a que son cultivares diferentes. Las secuencias de las clonas 5 y 6 fueron descartadas debido a la delección de una base en su secuencia que cambió el marco de lectura y la posible funcionalidad de la proteína. Únicamente la clona 2 presentó una mutación silenciosa en una base que no cambia el marco de lectura abierta, por lo que se seleccionó como templado para realizar la mutación sitio dirigida del residuo de tirosina (Y) por ácido aspártico (D) en la posición 393.

```

CpTHE1_silico      1 -----ATGGGAAATTCCTTAACCATGACAAAAATGTCACAACTTCACAAAAGAGTGCAACAGCAAGCTGCATCT
CpTHE1_clona_6    1 GAGCTCAACAATGGGAAATTCCTTAACCATGACAAAAATGTCACAACTTCACAAAAGAGTGCAACAGCAAGCTGCATCT
CpTHE1_clona_1    1 GAGCTCAACAATGGGAAATTCCTTAACCATGACAAAAATGTCACAACTTCACAAAAGAGTGCAACAGCAAGCTGCATCT
CpTHE1_clona_2    1 GAGCTCAACAATGGGAAATTCCTTAACCATGACAAAAATGTCACAACTTCACAAAAGAGTGCAACAGCAAGCTGCATCT
CpTHE1_clona_4    1 GAGCTCAACAATGGGAAATTCCTTAACCATGACAAAAATGTCACAACTTCACAAAAGAGTGCAACAGCAAGCTGCATCT
CpTHE1_clona_5    1 GAGCTCAACAATGGGAAATTCCTTAACCATGACAAAAATGTCACAACTTCACAAAAGAGTGCAACAGCAAGCTGCATCT

CpTHE1_silico     71 CATTAGCTTCCTCCAACCTTGGCAGGTTTTTCATGTTCCAAGAAATCCTGGATGCAACCAACAAATTTGATGAGAGCCTA
CpTHE1_clona_6    81 CATTAGCTTCCTCCAACCTTGGCAGGTTTTTCATGTTCCAAGAAATCCTGGATGCAACCAACAAATTTGATGAGAGCCTA
CpTHE1_clona_1    81 CATTAGCTTCCTCCAACCTTGGCAGGTTTTTCATGTTCCAAGAAATCCTGGATGCAACCAACAAATTTGATGAGAGCCTA
CpTHE1_clona_2    81 CATTAGCTTCCTCCAACCTTGGCAGGTTTTTCATGTTCCAAGAAATCCTGGATGCAACCAACAAATTTGATGAGAGCCTA
CpTHE1_clona_4    81 CATTAGCTTCCTCCAACCTTGGCAGGTTTTTCATGTTCCAAGAAATCCTGGATGCAACCAACAAATTTGATGAGAGCCTA
CpTHE1_clona_5    81 CATTAGCTTCCTCCAACCTTGGCAGGTTTTTCATGTTCCAAGAAATCCTGGATGCAACCAACAAATTTGATGAGAGCCTA

CpTHE1_silico     151 TTGCTAGGGGTTGGTGGTTTTGGTAGGGTATACAAGGGAACACTTGAAGATGGAACCAAGGTAGCTGTCAAGAGAGGAAA
CpTHE1_clona_6    161 TTGCTAGGGGTTGGTGGTTTTGGTAGGGTATACAAGGGAACACTTGAAGATGGAACCAAGGTAGCTGTCAAGAGAGGAAA
CpTHE1_clona_1    161 TTGCTAGGGGTTGGTGGTTTTGGTAGGGTATACAAGGGAACACTTGAAGATGGAACCAAGGTAGCTGTCAAGAGAGGAAA
CpTHE1_clona_2    161 TTGCTAGGGGTTGGTGGTTTTGGTAGGGTATACAAGGGAACACTTGAAGATGGAACCAAGGTAGCTGTCAAGAGAGGAAA
CpTHE1_clona_4    161 TTGCTAGGGGTTGGTGGTTTTGGTAGGGTATACAAGGGAACACTTGAAGATGGAACCAAGGTAGCTGTCAAGAGAGGAAA
CpTHE1_clona_5    161 TTGCTAGGGGTTGGTGGTTTTGGTAGGGTATACAAGGGAACACTTGAAGATGGAACCAAGGTAGCTGTCAAGAGAGGAAA

CpTHE1_silico     231 FCCCAGGCTGAAACAAGGCTTGC TGAATTCGGAAC T GAGAT TGA AATGTTATCTAAGCTCCGTCACCGCCACTTGTCT
CpTHE1_clona_6    241 FCCCAGGCTGAAACAAGGCTTGC TGAATTCGGAAC T GAGAT TGA AATGTTATCTAAGCTCCGTCACCGCCACTTGTCT
CpTHE1_clona_1    241 FCCCAGGCTGAAACAAGGCTTGC TGAATTCGGAAC T GAGAT TGA AATGTTATCTAAGCTCCGTCACCGCCACTTGTCT
CpTHE1_clona_2    241 FCCCAGGCTGAAACAAGGCTTGC TGAATTCGGAAC T GAGAT TGA AATGTTATCTAAGCTCCGTCACCGCCACTTGTCT
CpTHE1_clona_4    241 FCCCAGGCTGAAACAAGGCTTGC TGAATTCGGAAC T GAGAT TGA AATGTTATCTAAGCTCCGTCACCGCCACTTGTCT
CpTHE1_clona_5    241 FCCCAGGCTGAAACAAGGCTTGC TGAATTCGGAAC T GAGAT TGA AATGTTATCTAAGCTCCGTCACCGCCACTTGTCT

CpTHE1_silico     311 CTCTTATGGCTACTCTGATGAAAGATCAGAAATGATTCCTGTTTATGAATACATGGCCAAATGGACCTCTCAGAAAGTCAG
CpTHE1_clona_6    321 CTCTTATGGCTACTCTGATGAAAGATCAGAAATGATTCCTGTTTATGAATACATGGCCAAATGGACCTCTCAGAAAGTCAG
CpTHE1_clona_1    321 CTCTTATGGCTACTCTGATGAAAGATCAGAAATGATTCCTGTTTATGAATACATGGCCAAATGGACCTCTCAGAAAGTCAG
CpTHE1_clona_2    321 CTCTTATGGCTACTCTGATGAAAGATCAGAAATGATTCCTGTTTATGAATACATGGCCAAATGGACCTCTCAGAAAGTCAG
CpTHE1_clona_4    321 CTCTTATGGCTACTCTGATGAAAGATCAGAAATGATTCCTGTTTATGAATACATGGCCAAATGGACCTCTCAGAAAGTCAG
CpTHE1_clona_5    321 CTCTTATGGCTACTCTGATGAAAGATCAGAAATGATTCCTGTTTATGAATACATGGCCAAATGGACCTCTCAGAAAGTCAG

CpTHE1_silico     391 CTTTATGGAACAGATCTGCCACCTCTGTCATGGAAGCAGCGGCTTGA AATATGCA TCGGAGCTGCAAGGGGACTTCATTA
CpTHE1_clona_6    401 CTTTATGGAACAGATCTGCCACCTCTGTCATGGAAGCAGCGGCTTGA AATATGCA TCGGAGCTGCAAGGGGACTTCATTA
CpTHE1_clona_1    401 CTTTATGGAACAGATCTGCCACCTCTGTCATGGAAGCAGCGGCTTGA AATATGCA TCGGAGCTGCAAGGGGACTTCATTA
CpTHE1_clona_2    401 CTTTATGGAACAGATCTGCCACCTCTGTCATGGAAGCAGCGGCTTGA AATATGCA TCGGAGCTGCAAGGGGACTTCATTA
CpTHE1_clona_4    401 CTTTATGGAACAGATCTGCCACCTCTGTCATGGAAGCAGCGGCTTGA AATATGCA TCGGAGCTGCAAGGGGACTTCATTA
CpTHE1_clona_5    401 CTTTATGGAACAGATCTGCCACCTCTGTCATGGAAGCAGCGGCTTGA AATATGCA TCGGAGCTGCAAGGGGACTTCATTA

CpTHE1_silico     471 TC TTCACACTGGTGCAGCACAAAGTATTATTATCGAGATGTGAAGACAACAACATTCTCTGGATGAGAACTTCGTGG
CpTHE1_clona_6    481 TC TTCACACTGGTGCAGCACAAAGTATTATTATCGAGATGTGAAGACAACAACATTCTCTGGATGAGAACTTCGTGG
CpTHE1_clona_1    481 TC TTCACACTGGTGCAGCACAAAGTATTATTATCGAGATGTGAAGACAACAACATTCTCTGGATGAGAACTTCGTGG
CpTHE1_clona_2    481 TC TTCACACTGGTGCAGCACAAAGTATTATTATCGAGATGTGAAGACAACAACATTCTCTGGATGAGAACTTCGTGG
CpTHE1_clona_4    481 TC TTCACACTGGTGCAGCACAAAGTATTATTATCGAGATGTGAAGACAACAACATTCTCTGGATGAGAACTTCGTGG
CpTHE1_clona_5    481 TC TTCACACTGGTGCAGCACAAAGTATTATTATCGAGATGTGAAGACAACAACATTCTCTGGATGAGAACTTCGTGG

CpTHE1_silico     551 CTA AAGTTGCTGATTTGGCTTTC AAAAAACAGGTCATCTCTTGATCAGACACATGTCAGTACTGCTGTTAAGGGTAGT
CpTHE1_clona_6    561 CTA AAGTTGCTGATTTGGCTTGTCAAAAACAGGTCATCTCTTGATCAGACACATGTCAGTACTGCTGTTAAGGGTAGT
CpTHE1_clona_1    561 CTA AAGTTGCTGATTTGGCTTGTCAAAAACAGGTCATCTCTTGATCAGACACATGTCAGTACTGCTGTTAAGGGTAGT
CpTHE1_clona_2    561 CTA AAGTTGCTGATTTGGCTTGTCAAAAACAGGTCATCTCTTGATCAGACACATGTCAGTACTGCTGTTAAGGGTAGT
CpTHE1_clona_4    561 CTA AAGTTGCTGATTTGGCTTGTCAAAAACAGGTCATCTCTTGATCAGACACATGTCAGTACTGCTGTTAAGGGTAGT
CpTHE1_clona_5    561 CTA AAGTTGCTGATTTGGCTTGTCAAAAACAGGTCATCTCTTGATCAGACACATGTCAGTACTGCTGTTAAGGGTAGT

CpTHE1_silico     631 TTTCAGTACCTGATCTGAAATCTGAAATCTGAAAGCAACAAAGCTGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAG
CpTHE1_clona_6    641 TTTCAGTACCTGATCTGAAATCTGAAATCTGAAAGCAACAAAGCTGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAG

```

```

CpTHE1_clona_1 641 TTGGCTACCTGGATCCTGAATACTTTGGAAGGCAACAGCTCACTGAGAAATCAGACGTATATCTTTGGGGTGGTTCT
CpTHE1_clona_2 641 TTGGCTACCTGGATCCTGAATACTTTGGAAGGCAACAGCTCACTGAGAAATCAGACGTATATCTTTGGGGTGGTTCT
CpTHE1_clona_4 641 TTGGCTACCTGGATCCTGAATACTTTGGAAGGCAACAGCTCACTGAGAAATCAGACGTATATCTTTGGGGTGGTTCT
CpTHE1_clona_5 641 TTGGCTACCTGGATCCTGAATACTTTGGAAGGCAACAGCTCACTGAGAAATCAGACGTATATCTTTGGGGTGGTTCT

CpTHE1_silico 711 AATGGAAGTACTCTGTACTAGACCAGCTTTAAATCCTGTCTTCCAGGGAGCAAGTTAATAATAGCAGAAATGGCAATGA
CpTHE1_clona_6 721 AATGGAAGTACTCTGTACTAGACCAGCTTTAAATCCTGTCTTCCAGGGAGCAAGTTAATAATAGCAGAAATGGCAATGA
CpTHE1_clona_1 721 AATGGAAGTACTCTGTACTAGACCAGCTTTAAATCCTGTCTTCCAGGGAGCAAGTTAATAATAGCAGAAATGGCAATGA
CpTHE1_clona_2 721 AATGGAAGTACTCTGTACTAGACCAGCTTTAAATCCTGTCTTCCAGGGAGCAAGTTAATAATAGCAGAAATGGCAATGA
CpTHE1_clona_4 721 AATGGAAGTACTCTGTACTAGACCAGCTTTAAATCCTGTCTTCCAGGGAGCAAGTTAATAATAGCAGAAATGGCAATGA
CpTHE1_clona_5 721 AATGGAAGTACTCTGTACTAGACCAGCTTTAAATCCTGTCTTCCAGGGAGCAAGTTAATAATAGCAGAAATGGCAATGA

CpTHE1_silico 791 GTGGCAAAGAAAGGCATGTTGGATCAAATCATGGATTCAAATCTGGTGGGGAAGGTGAATCCAGCTTCTCTTAAGAAA
CpTHE1_clona_6 801 GTGGCAAAGAAAGGCATGTTGGATCAAATCATGGATTCAAATCTGGTGGGGAAGGTGAATCCAGCTTCTCTTAAGAAA
CpTHE1_clona_1 801 GTGGCAAAGAAAGGCATGTTGGATCAAATCATGGATTCAAATCTGGTGGGGAAGGTGAATCCAGCTTCTCTTAAGAAA
CpTHE1_clona_2 801 GTGGCAAAGAAAGGCATGTTGGATCAAATCATGGATTCAAATCTGGTGGGGAAGGTGAATCCAGCTTCTCTTAAGAAA
CpTHE1_clona_4 801 GTGGCAAAGAAAGGCATGTTGGATCAAATCATGGATTCAAATCTGGTGGGGAAGGTGAATCCAGCTTCTCTTAAGAAA
CpTHE1_clona_5 801 GTGGCAAAGAAAGGCATGTTGGATCAAATCATGGATTCAAATCTGGTGGGGAAGGTGAATCCAGCTTCTCTTAAGAAA

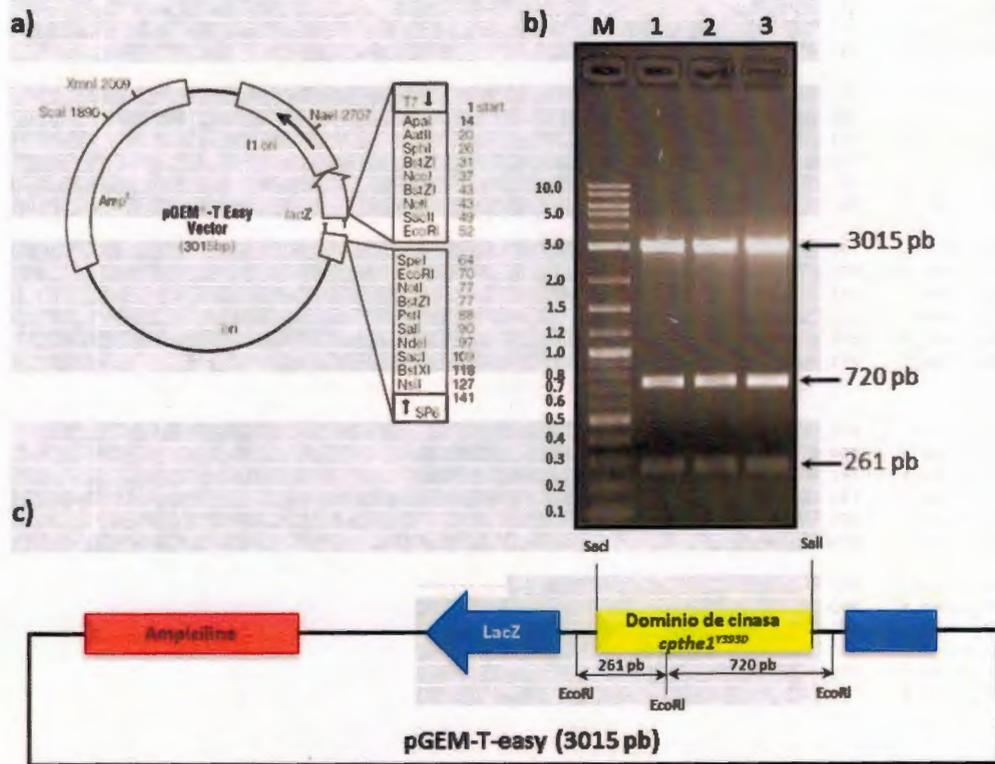
CpTHE1_silico 871 FATGGGAGACAGCTGAGAAATGCTCTGGCTGAGCATGGAGTTGACAGGCCATCAATGGGTGATGCTTGTGGAATCTTGA
CpTHE1_clona_6 880 FATGGGAGACAGCTGAGAAATGCTCTGGCTGAGCATGGAGTTGACAGGCCATCAATGGGTGATGCTTGTGGAATCTTGA
CpTHE1_clona_1 881 FATGGGAGACAGCTGAGAAATGCTCTGGCTGAGCATGGAGTTGACAGGCCATCAATGGGTGATGCTTGTGGAATCTTGA
CpTHE1_clona_2 881 FATGGGAGACAGCTGAGAAATGCTCTGGCTGAGCATGGAGTTGACAGGCCATCAATGGGTGATGCTTGTGGAATCTTGA
CpTHE1_clona_4 881 FATGGGAGACAGCTGAGAAATGCTCTGGCTGAGCATGGAGTTGACAGGCCATCAATGGGTGATGCTTGTGGAATCTTGA
CpTHE1_clona_5 880 FATGGGAGACAGCTGAGAAATGCTCTGGCTGAGCATGGAGTTGACAGGCCATCAATGGGTGATGCTTGTGGAATCTTGA

CpTHE1_silico 951 ATATGCTCTTCAAATTAGAGGAGACATCATAA-----
CpTHE1_clona_6 960 ATATGCTCTTCAAATTAGAGGAGACATCATAAGTCGACATA
CpTHE1_clona_1 961 ATATGCTCTTCAAATTAGAGGAGACATCATAAGTCGACATA
CpTHE1_clona_2 961 ATATGCTCTTCAAATTAGAGGAGACATCATAAGTCGACATA
CpTHE1_clona_4 961 ATATGCTCTTCAAATTAGAGGAGACATCATAAGTCGACATA
CpTHE1_clona_5 960 ATATGCTCTTCAAATTAGAGGAGACATCATAAGTCGACATA
    
```

**Figura 3. 8** Alineamiento de la ORF de *CpTHE1* de papaya cv SunUp y las secuencias generadas mediante la PCR anidada de papaya cv Maradol. Los productos amplificados de *CpTHE1* se alinearon correctamente con la secuencia del cv. SunUp, únicamente se observan algunos polimorfismos debido a que son cultivares diferentes.

### 3.3.5 Análisis de restricción de la secuencia *cpthe1*<sup>Y393D</sup>

La mutación del gen *cpthe1*<sup>Y393D</sup> fue generada por mutación sitio dirigida mediante PCR, con lo cual se obtiene solamente un cambio en una base de la secuencia *CpTHE1*. Los productos de esta PCR fueron clonados y el análisis de restricción obtenido fue una banda de 3015 pb del vector y dos bandas que suman 981 pb del inserto (Figura 3.9). Las clonas positivas al análisis de restricción fueron secuenciadas para corroborar el cambio del residuo Y (tirosina) por D (ácido aspártico).



**Figura 3. 9** Construcción de la secuencia mutante *cpthe1*<sup>Y393D</sup> de papaya en el vector pGEM-T-easy. a) Mapa físico del vector de clonación con sus respectivos sitios de clonado múltiple. b) Los carriles 1-3 indican la digestión del vector pGEM-T-easy con la enzima de restricción EcoRI para liberar los insertos correspondientes al producto de la PCR anidada de *cpthe1*<sup>Y393D</sup> de papaya, el inserto tiene un sitio de corte interno en su secuencia de EcoRI por tal razón se observan dos bandas que suman el peso deseado. La banda de 3015 pb es el vector pGEM-T-easy linealizado. c) Mapa físico de pGEM-T-easy con *cpthe1*<sup>Y393D</sup>.

### 3.3.6 Alineamiento de la secuencias mutante *cpthe1*<sup>Y393D</sup> con la secuencia silvestre *CpTHE1*

Las secuencias obtenidas de las clonas sometidas a tal mutación fueron alineadas con la secuencia de la clona 2 que fue la que se empleó para realizar la mutagénesis, el alineamiento mostró que éstas únicamente presentaron el cambio de una T por una G en el residuo de interés Y393D (Figura 3.10).

<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	1	TAAAGGCTCAACATGGGAATTCTCTACCGTGGGAAATGTGCAAGCACTTCAGAA
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D.seq	1	TAAAGGCTCAACATGGGAATTCTCTACCGTGGGAAATGTGCAAGCACTTCAGAA
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	61	GAGTGCACACGCAAGCTGCATCTCATTAGCTTCTCTCAAGCTTGGCAGCTTTTTCATCTTT
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	61	GAGTGCACACGCAAGCTGCATCTCATTAGCTTCTCTCGAACTCTTGGCAGCTTTTTCATCTTT
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	121	CCAGAAATCTGTGATGCAAACAACAAATTGATGAGAGCTATTTCCTAGGCTTTGGTGG
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	121	CCAGAAATCTGTGATGCAAACAACAAATTGATGAGAGCTATTTCCTAGGCTTTGGTGG
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	181	TTTTGTAGCTATACAAAGGGAACACTTGAAGATGAAACAAGTACTGCTTAACAGAGT
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	181	TTTTGTAGCTATACAAAGGGAACACTTGAAGATGAAACAAGTACTGCTTAACAGAGT
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	241	AAATCCGAGCTGTAAACAAGGCTTCTGTGAATTCGAAATGAGATGAAATTTATCTAA
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	241	AAATCCGAGCTGTAAACAAGGCTTCTGTGAATTCGAAATGAGATGAAATTTATCTAA
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	301	GCTCGCTCAACGGCACTTCTCTCTCTATTGCTACTGCTGATGAAAGATGAAAGATGAT
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	301	GCTCGCTCAACGGCACTTCTCTCTCTATTGCTACTGCTGATGAAAGATGAAAGATGAT
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	361	CTTTGTTTATTAATACATGGCCAAATGGACCTCTCAGAAATTCAGCTTTATGGAACAGATGT
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	361	CTTTGTTTATTAATACATGGCCAAATGGACCTCTCAGAAATTCAGCTTTATGGAACAGATGT
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	421	GCCACCTTCTCTCAAGCAAGCAGCCGCTTGAATATGCAATCCAGCTTCCAGAGGCACTTAA
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	421	GCCACCTTCTCTCAAGCAAGCAGCCGCTTGAATATGCAATCCAGCTTCCAGAGGCACTTAA
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	481	TTATCTTACACTGCTCCAGGCAAAAGTATATTTATCCAGAGCTGAGCAAGCAAGCAAT
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	481	TTATCTTACACTGCTCCAGGCAAAAGTATATTTATCCAGAGCTGAGCAAGCAAGCAAT
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	541	TCTCTTGGATGAGAATCTCGTGGTAAAGTTGCTGATTTTGGCTTGGCAAAACAGGCTCC
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	541	TCTCTTGGATGAGAATCTCGTGGTAAAGTTGCTGATTTTGGCTTGGCAAAACAGGCTCC
		Sitio de mutación ↓
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	601	ATCTCTTGATCAGAC/CATGTCAGTACCTGCTGTAAGCGTAGTTTGGCACTCTGG/TCG
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	601	ATCTCTTGATCAGAC/CATGTCAGTACCTGCTGTAAGCGTAGTTTGGCACTCTGG/TCG
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	661	TGAATACTTTCCAGGCAAGCAGCTCACTGAGAANTCAAGCTATATCTTTTCCGGTGGT
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	661	TGAATACTTTCCAGGCAAGCAGCTCACTGAGAANTCAAGCTATATCTTTTCCGGTGGT
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	721	TCTATTCGAACTACTCTCTACTAGACCAGCTTTAAATCCCTGTTCTTCCAGGCAAGCAAGT
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	721	TCTATTCGAACTACTCTCTACTAGACCAGCTTTAAATCCCTGTTCTTCCAGGCAAGCAAGT
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	781	TAATATAGCAGAAATGCGCAATGATTTGGCAAAAGCAAGGATGTTCCATCAAAATCATGGA
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	781	TAATATAGCAGAAATGCGCAATGATTTGGCAAAAGCAAGGATGTTCCATCAAAATCATGGA
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	841	TTCAAAATTCGCTGCGGAAGCTAAATCAAGCTTCTTTAAGAAATATCGGCAAGCAAGCTGA
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	841	TTCAAAATTCGCTGCGGAAGCTAAATCAAGCTTCTTTAAGAAATATCGGCAAGCAAGCTGA
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	901	GAAATCTTCTGCTTACCATGAGCTGAGCTGACAGCCATCAATGCTGATCTCTTCTCAATCT
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	901	GAAATCTTCTGCTTACCATGAGCTGAGCTGACAGCCATCAATGCTGATCTCTTCTCAATCT
<i>CpTHE1</i> _clona_2_.seq	961	TGAATATGCTCTTCAATTAGAGGAGACATCATAAGTCCACATA
<i>cpthe1</i> _mutante_Y393D	961	TGAATATGCTCTTCAATTAGAGGAGACATCATAAGTCCACATA

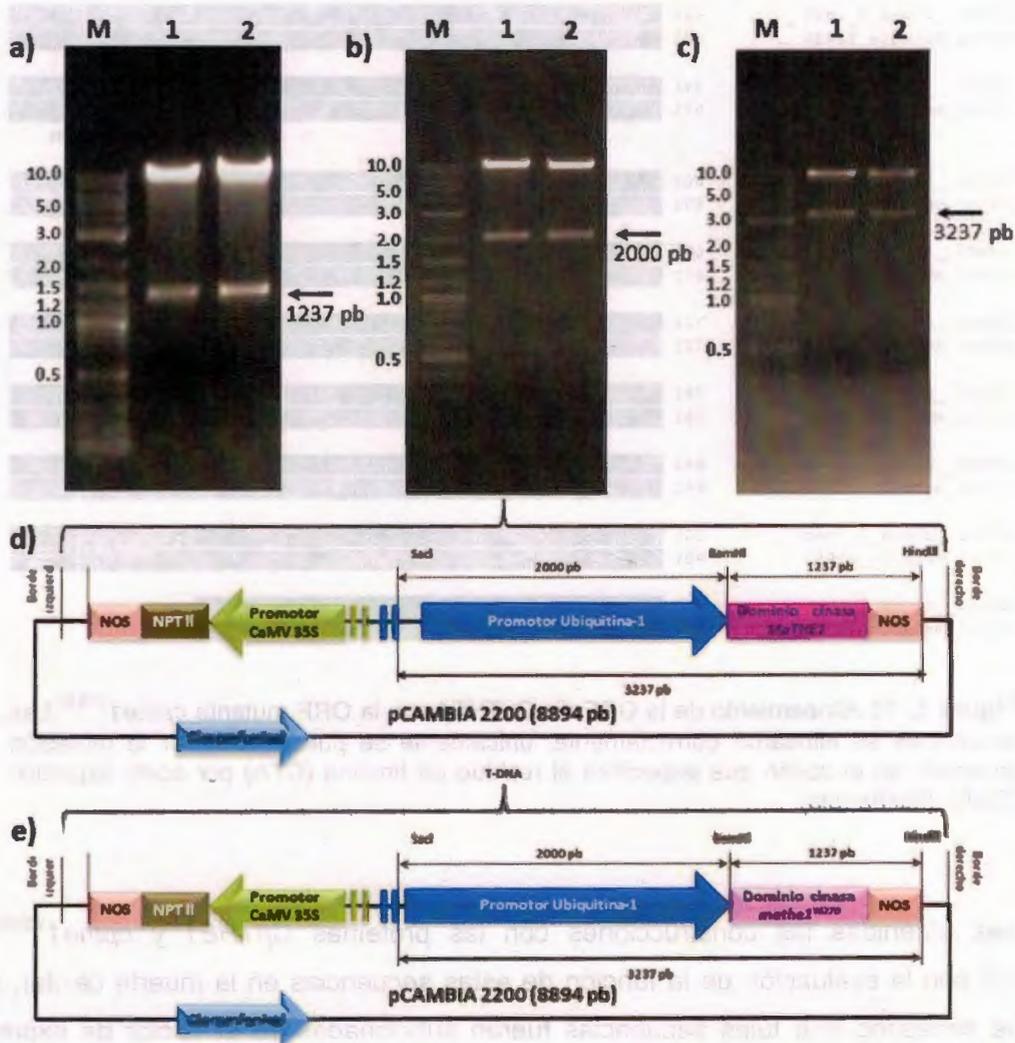
**Figura 3. 10** Alineamiento de la ORF de *CpTHE1* con la ORF mutante *cpthe1*<sup>Y393D</sup>. Las secuencias se alinearon correctamente, únicamente se puede observar la mutación generada en el codón que especifica el residuo de tirosina (CTA) por ácido aspártico (CGA) (flecha roja).

Una vez obtenidas las construcciones con las proteínas *CpTHE1* y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> se continuó con la evaluación de la función de estas secuencias en la muerte celular, para ello fue necesario que tales secuencias fueran subclonadas en el vector de expresión

pCAMBIA 2200::35S::NOS, que contiene un promotor constitutivo que conduce una alta expresión.

### 3.3.7 Subclonación del los fragmentos *MaTHE1*::NOS y *mathe1*<sup>Y627D</sup>::NOS de plátano en el vector de expresión pCAMBIA2200::Ubi-1

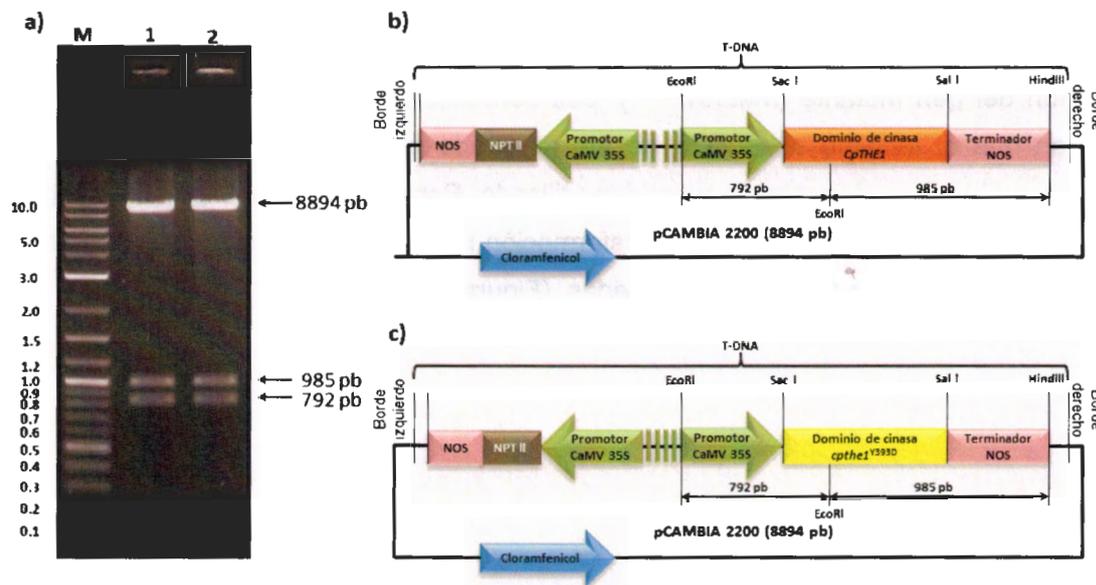
Para realizar las construcciones de expresión de plátano se realizó la clonación de las secuencias *MaTHE1*::NOS y *mathe1*<sup>6273D</sup>::NOS, previamente obtenidas mediante síntesis química, en el vector pCAMBIA 2200 con los sitios BamHI-HindIII. Posteriormente se realizó la subclonación del promotor ubiquitina-1 con los sitios SacI-BamHI como se indica en la Figura 3.11.



**Figura 3. 11** Clonación de las secuencias *MaTHE1* y *mathe1*<sup>Y627D</sup> de plátano en el vector pCAMBIA 2200::Ubi-1. a) Análisis de restricción de pCAMBIA 2200 con las enzimas BamHI-HindIII para liberar el fragmento clonado de los genes *MaTHE1* (carril 1) y *mathe1*<sup>Y627D</sup> (carril 2) con un tamaño de 1237 pb, la banda de 8894 pb es el vector pCAMBIA 2200 linearizado. b) Análisis de restricción de pCAMBIA 2200 con las enzimas SacI-BamHI para liberar el fragmento clonado del promotor ubiquitina-1 con un tamaño de 2000 pb, el vector linearizado de pCAMBIA 2200 corresponde al peso esperado de 8894 pb. c) Análisis de restricción para la liberación del cassette de expresión Ubi-1::*MaTHE1*:: NOS (carril 1) y Ubi-1::*mathe1*<sup>Y627D</sup>:: NOS (carril 2). d) Mapa físico de la construcción pCAMBIA 2200 Ubi-1::*MaTHE1*::NOS. e) Mapa físico de la construcción pCAMBIA 2200 Ubi-1::*mathe1*<sup>Y627D</sup>::NOS.

### 3.3.8 Subclonación de los fragmentos *CpTHE1* WT y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> en el vector de expresión pCAMBIA 2200 35S::NOS

Los cassettes de expresión del dominio de cinasa *CpTHE1* WT y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> fueron subclonados exitosamente en el vector pCAMBIA 2200, el análisis de restricción fue con las enzimas EcoRI y HindIII. Puesto que las secuencias *CpTHE1* y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> poseen un sitio de restricción interno de EcoRI, se obtuvo la liberación de dos fragmentos como se esperaba uno con 985 pb y otro de 792 pb respectivamente (Figura 3.12).

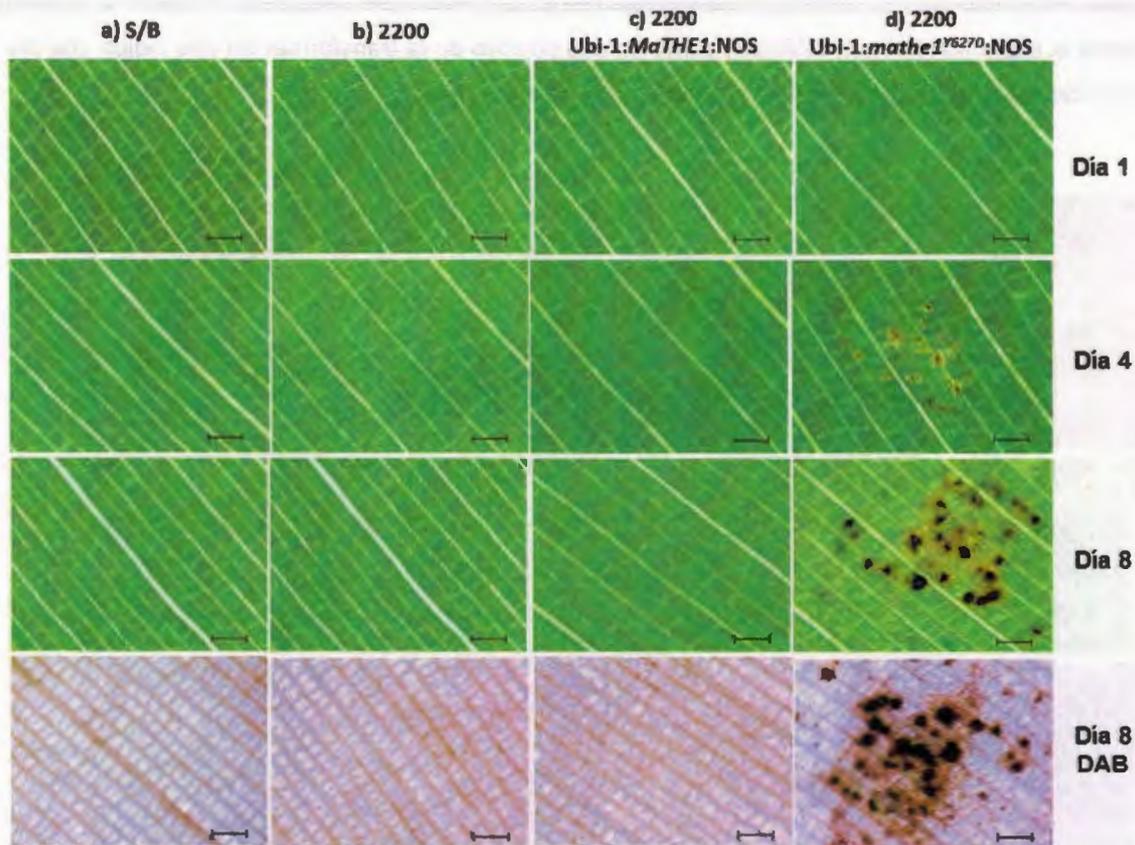


**Figura 3. 12** Clonación de las secuencias *CpTHE1* y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> de papaya en el vector de expresión pCAMBIA 2200. a) Análisis de restricción de pCAMBIA 2200 con los sitios EcoRI para liberar el fragmento clonado de los genes *CpTHE1* (carril 1) y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> (carril 2), el inserto tiene un sitio de corte interno de EcoRI por tal razón se observan dos bandas que suman el peso esperado. La banda de 8894 pb es el vector pCAMBIA 2200 linearizado. b) Mapa físico de la construcción pCAMBIA 2200 35S::*CpTHE1* WT::NOS. c) Mapa físico de la construcción pCAMBIA 2200 35S::*cpthe1*<sup>Y393D</sup>::NOS.

### 3.3.9 Evaluación de fenotipo de hojas de plátano cv. Enano Gigante transformadas temporalmente con las construcciones de expresión *MaTHE1* y su versión mutante *mathe1*<sup>Y627D</sup>

La expresión de *MaTHE1* y *mathe1*<sup>Y627D</sup> en hojas de plátano *ex vitro* del cultivar “Enano Gigante” (susceptible a la Sigatoka negra) estuvo conducida por el promotor constitutivo ubiquitina-1 generalmente usado para especies monocotiledóneas. Las hojas de plátano transformadas con la construcción del gen mutante (*mathe1*<sup>Y627D</sup>) mostraron un fenotipo de puntos de color café oscuro que son un indicio de una muerte celular similar a la observada en la respuesta hipersensible en otras plantas. Estos puntos se comenzaron a observar en el estereoscopio a partir del día 2 después de la transformación, el fenotipo fue visible a simple vista a los 4 días después de haber realizado la transformación, los puntos crecieron considerablemente día con día hasta el día 8, a diferencia de las hojas transformadas con la secuencia silvestre (*MaTHE1*) y los controles negativos donde no se observaron este tipo de lesiones (Figura 3.13). Las tinciones de DAB realizadas para detectar presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permitieron resaltar el área dañada como resultado de la expresión del gen mutante (*mathe1*<sup>Y627D</sup>). Los controles negativos de la transformación indicaron que el fenotipo observado no fue generado por las partículas de oro en la transformación o por el vector de expresión utilizado. Por otra parte, la expresión del gen *GUSplus* como control positivo de la transformación nos indicó que las condiciones de la transformación genética fueron las adecuadas. (Figura 3.13)

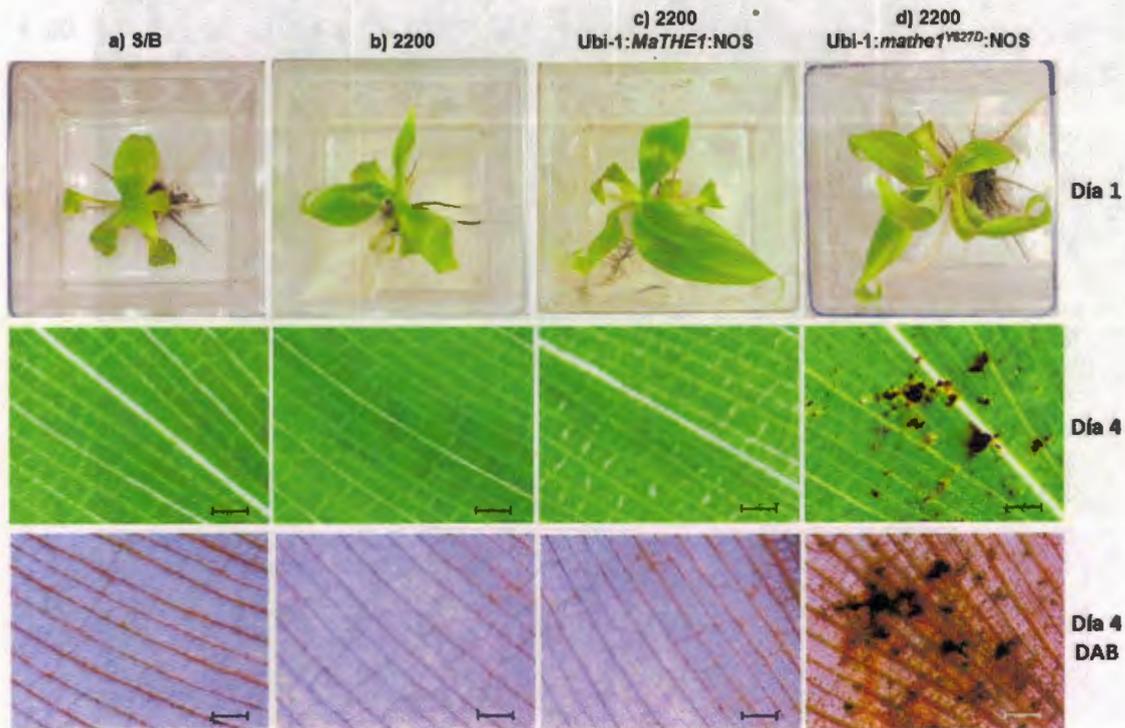




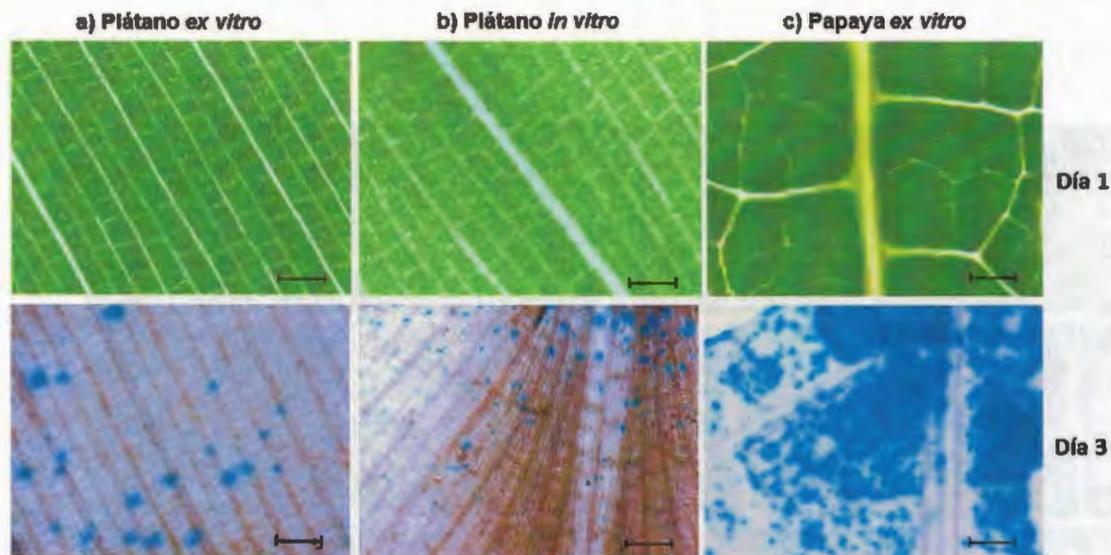
**Figura 3. 13** Transformación temporal de hojas de plátano cv Enano Gigante (cultivar susceptible a la Sigatoka negra) con *MaTHE1* y *mathe1<sup>Y627D</sup>*. a) Control negativo de hojas de plátano sin bombardear (S/B), b) Control negativo de hojas de plátano transformadas con el vector pCAMBIA 2200 vacío, c) Transformación temporal de hojas de plátano con la construcción pCAMBIA 2200 Ubi-1::*MaTHE1*::NOS, d) Transformación temporal de las hojas de plátano con la construcción pCAMBIA 2200 Ubi-1::*mathe1<sup>Y627D</sup>*:: NOS. La tinción DAB realizada a todas las muestras en el día 8 después de la transformación mostró que las hojas que expresaron la versión mutante del gen *MaTHE1* reaccionaron con la solución DAB dando el color café oscuro característico de este ensayo indicando la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumento en la actividad de peroxidasas y de una muerte celular programada tipo respuesta hipersensible (color marrón). El fenotipo observado fue reproducible en tres repeticiones. Barra= 0.05cm

La secuencia mutante de plátano (*mathe1<sup>Y627D</sup>*) también pudo generar un fenotipo de muerte celular en hojas de plantas *in vitro*. La respuesta de la muerte celular fue de hecho más rápida que en las hojas *ex vitro*, lográndose visualizar la muerte celular a simple vista al día 2 después de la transformación, por lo que se realizó la tinción DAB al día 4 a diferencia de las hojas *ex vitro* que fueron al día 8. La tinción DAB permitió enfatizar el fenotipo observado a simple vista del área dañada como resultado de la expresión del gen mutante (*mathe1<sup>Y627D</sup>*) (Figura 3.14). Los controles negativos de la transformación nos indicaron que el fenotipo observado no fue generado por las partículas de oro empleadas en la transformación o a causa del vector de expresión. De igual

forma la expresión del gen *GUSplus* como control positivo de la transformación nos indicó que las condiciones de transformación fueron adecuadas (Figura 3.15).



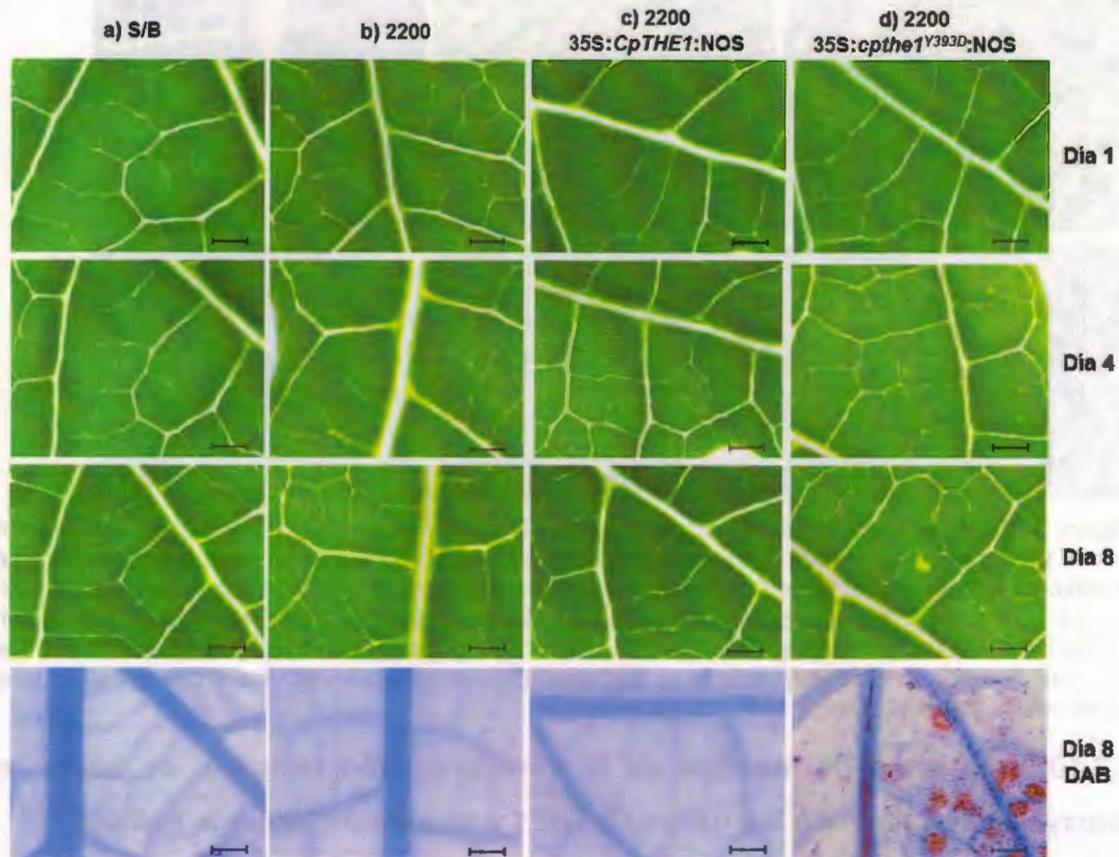
**Figura 3. 14** Transformación temporal de hojas *in vitro* de plátano cv Enano Gigante con *MaTHE1* y *mathe1*<sup>Y627D</sup>. a) Control negativo de hojas de plátano sin bombardear (S/B), b) Control negativo de hojas de plátano transformadas con el vector pCAMBIA 2200 vacío, c) Transformación temporal de hojas de plátano con la construcción pCAMBIA 2200 Ubi-1::*MaTHE1*::NOS, d) Transformación temporal de las hojas de plátano con la construcción pCAMBIA 2200 Ubi-1::*mathe1*<sup>Y627D</sup>::NOS. La tinción DAB realizada a todas las muestras en el día 4 después de la transformación mostró que las hojas que expresaron la versión mutante del gen *MaTHE1* reaccionaron con la solución DAB dando el color café oscuro característico de este ensayo, indicando con ello una acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un aumento de la actividad de peroxidasa y una muerte celular tipo respuesta hipersensible (color marrón). El fenotipo observado fue reproducible en tres repeticiones. Barra= 0.05cm



**Figura 3. 15** Transformación temporal de hojas de plátano cv Enano Gigante y papaya cv Maradol con el vector pCAMBIA 1305.1. La expresión del gen reportero *GUSplus* se tomó como control positivo de la transformación temporal de hojas de plátano *ex vitro* (a), *in vitro* (b) y papaya *ex vitro* (c). La tinción GUS fue realizada a las hojas de plátano y papaya transformadas con el vector pCAMBIA 1305.1 al 2° día después de la transformación, pudiéndose observar la tinción al 3er día después de retirar la clorofila presente en las hojas. El fenotipo observado fue reproducible en tres repeticiones. Barra= 0.05cm.

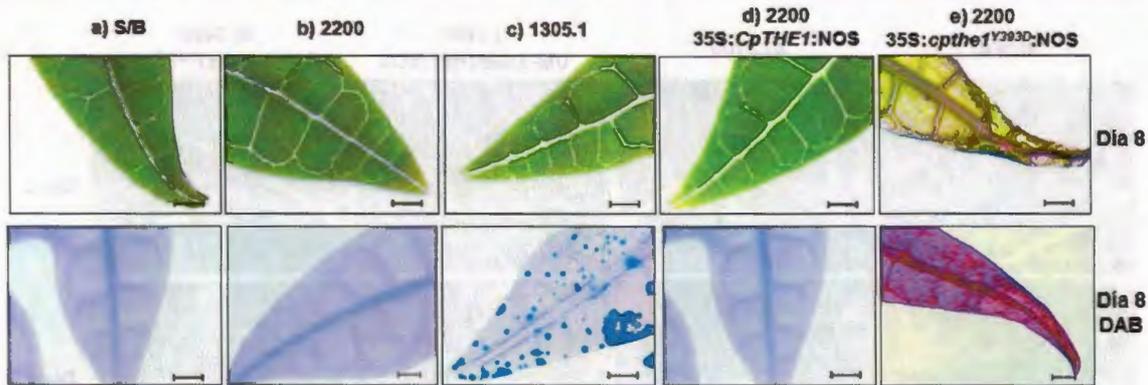
### 3.3.10 Evaluación de fenotipo de la transformación temporal de hojas de papaya cv Maradol con los genes *CpTHE1* y su versión mutante *cpthe1*<sup>Y393D</sup>

La expresión de *CpTHE1* y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> en hojas de papaya estuvo conducida por el promotor constitutivo CaMV 35S generalmente usado para especies dicotiledóneas. Las hojas de papaya transformadas con la construcción del gen mutante (*cpthe1*<sup>Y393D</sup>) mostraron un fenotipo, que pudo observarse inicialmente en las orillas de las hojas de papaya que al comenzar a necrosarse causaron un cambio en la tonalidad de la hoja, fue hasta el día 4 después de la transformación cuando se comenzaron a observar puntos amarillos como resultado de una muerte celular en el centro de la hojas hasta el día 8 (Figura 3.16). Las tinciones de DAB realizadas para detectar presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permitió resaltar el área dañada como resultado de la expresión del gen mutante (*cpthe1*<sup>Y393D</sup>). Los controles negativos de la transformación nos indicaron que el fenotipo observado no fue generado por las partículas de oro empleadas en la transformación o a causa del vector de expresión. De igual forma la expresión del gen *GUSplus* como control positivo de la transformación nos indicó que las condiciones de transformación fueron adecuadas (Figura 3.15).



**Figura 3. 16** Transformación temporal de hojas de papaya cv Maradol con *CpTHE1* y *cpthe1*<sup>Y393D</sup>. a) Control negativo de hojas de papaya sin bombardear (S/B), b) Control negativo de hojas de papaya transformadas con el vector pCAMBIA 2200 vacío, c) Transformación temporal de hojas de papaya con la construcción pCAMBIA 2200 35S::*CpTHE1*::NOS, d) Transformación temporal de hojas de papaya con la construcción pCAMBIA 2200 35S::*cpthe1*<sup>Y393D</sup>::NOS. La tinción DAB realizada a todas las muestras en el día 8 después de la transformación mostró que las hojas que expresaron la versión mutante del gen *CpTHE1* reaccionaron con la solución DAB dando el fenotipo rojizo característico de este ensayo, según lo reportado en especies dicotiledóneas. Como resultado de la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumento en la actividad de peroxidasas y una muerte celular tipo respuesta hipersensible (color rojiza). El fenotipo observado fue reproducible en tres repeticiones Barra=0.05cm

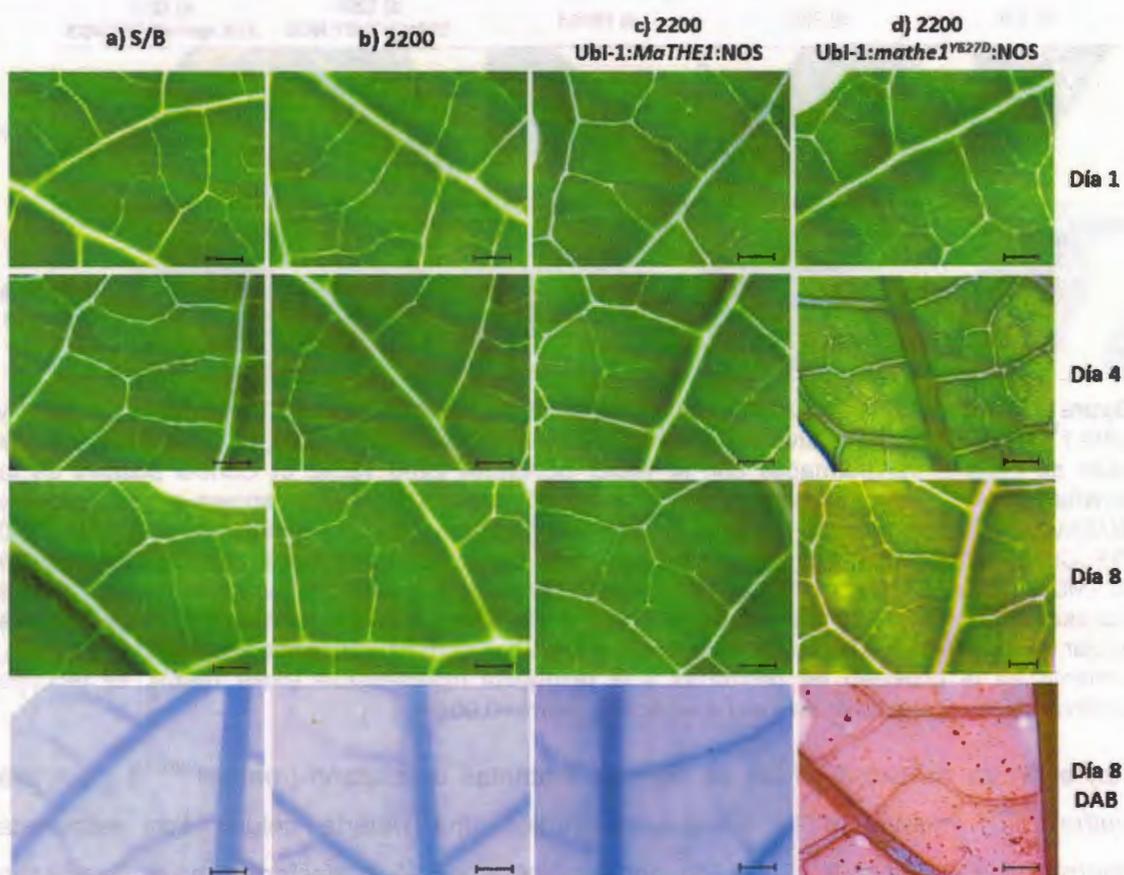
A continuación se muestra el fenotipo observado en los bordes de las hojas de papaya transformadas. Donde se observa claramente que la secuencia mutante *cpthe1*<sup>Y393D</sup> induce la muerte celular en las orillas de la hoja a diferencia de la secuencia silvestre *CpTHE1*, los controles negativos nos indican que el fenotipo observado está siendo generado por el gen mutante y el control positivo de la transformación con el gen *GUSplus* nos indican que las condiciones de transformación fueron las adecuadas (Figura 3.17).



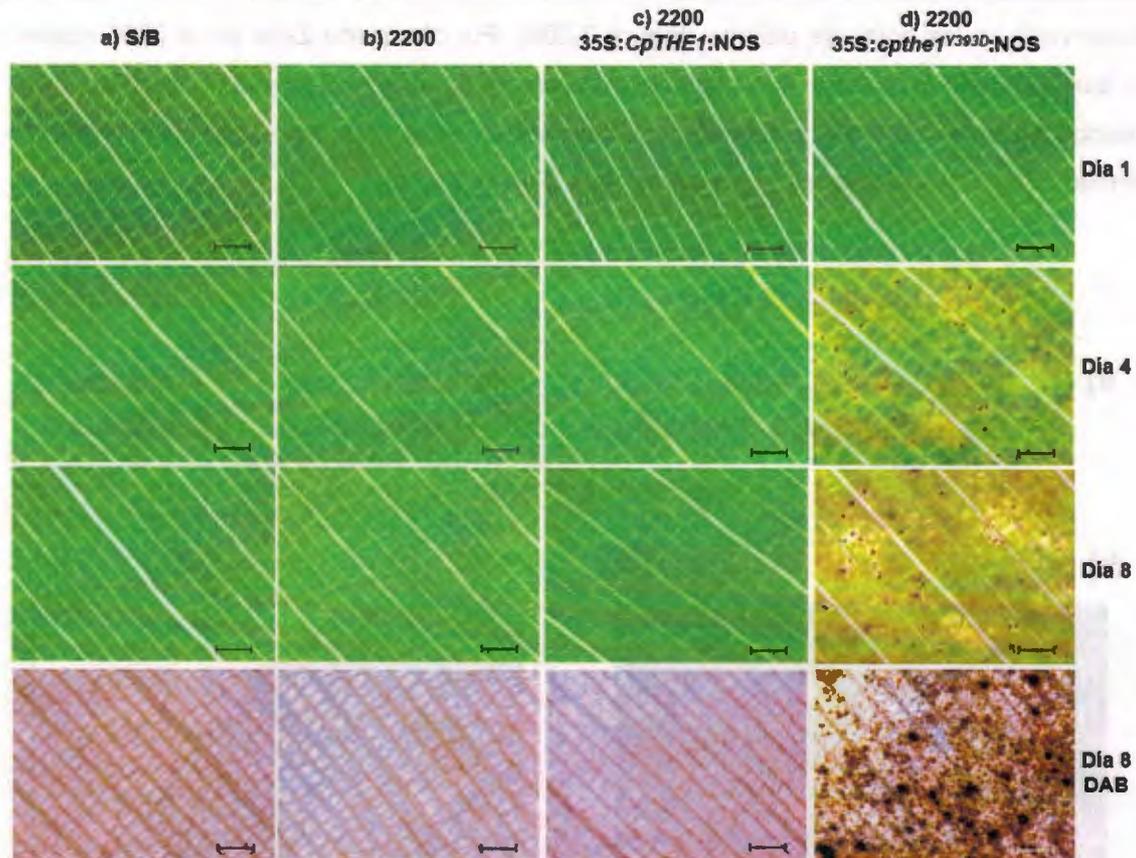
**Figura 3. 17** Efecto de la transformación temporal de hojas de papaya cv Maradol *CpTHE1* y *cpthe1*<sup>Y393D</sup>. a) Control negativo de hojas de papaya sin bombardear (S/B), b) Control negativo de hojas de papaya transformadas con el vector pCAMBIA 2200 vacío, c) Control positivo de la transformación de hojas de papaya con el vector pCAMBIA 1305.1 que expresa el gen reportero *GUSplus*, d) Transformación temporal de de hojas de papaya con la construcción pCAMBIA 2200 35S::*CpTHE1*::NOS, e) Transformación temporal de hojas de papaya con la construcción pCAMBIA 2200 35S::*cpthe1*<sup>Y393D</sup>::NOS. Se pudo observar al 8° día que las hojas de papaya que expresaron la versión mutante del gel *CpTHE1* presentaron a simple vista un fenotipo de muerte celular, respuesta que fue corroborada con la tinción con DAB la cual indica acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumento en la actividad de peroxidas y la respuesta hipersensible (color rojizo). El fenotipo observado fue reproducible en tres repeticiones. Barra=0.05cm

Con el fin de determinar si las secuencias mutantes de plátano (*mathe1*<sup>Y627D</sup>) y papaya (*cpthe1*<sup>Y393D</sup>) mantienen la función de inducir una muerte celular tipo respuesta hipersensible más allá de la clase taxonómica, se procedió a transformar hojas de plátano con la secuencia mutante de papaya *cpthe1*<sup>Y393D</sup> y hojas de papaya con la secuencia mutante de plátano (*mathe1*<sup>Y627D</sup>) con sus respectivos controles.

En ambos casos se pudo observar muerte celular indicando que la función de las secuencias mutantes se conserva más allá de la clase taxonómica (Figura 3.18 y 3.19). Sin embargo, las hojas de plátano transformadas con la secuencia mutante de papaya (*cothe3*<sup>Y213D</sup>) mostraron una mayor acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y actividad de peroxidasas que las hojas de papaya transformadas con la secuencia de plátano, lo cual podría deberse a la naturaleza de los promotores utilizado, ya que se sabe que el promotor 35S puede conducir altos niveles de expresión tanto en plantas dicotiledóneas como en monocotiledóneas, a diferencia del promotor Ubi-1 de maíz que es más específico de plantas monocotiledóneas (Christensen and Quail, 1996).



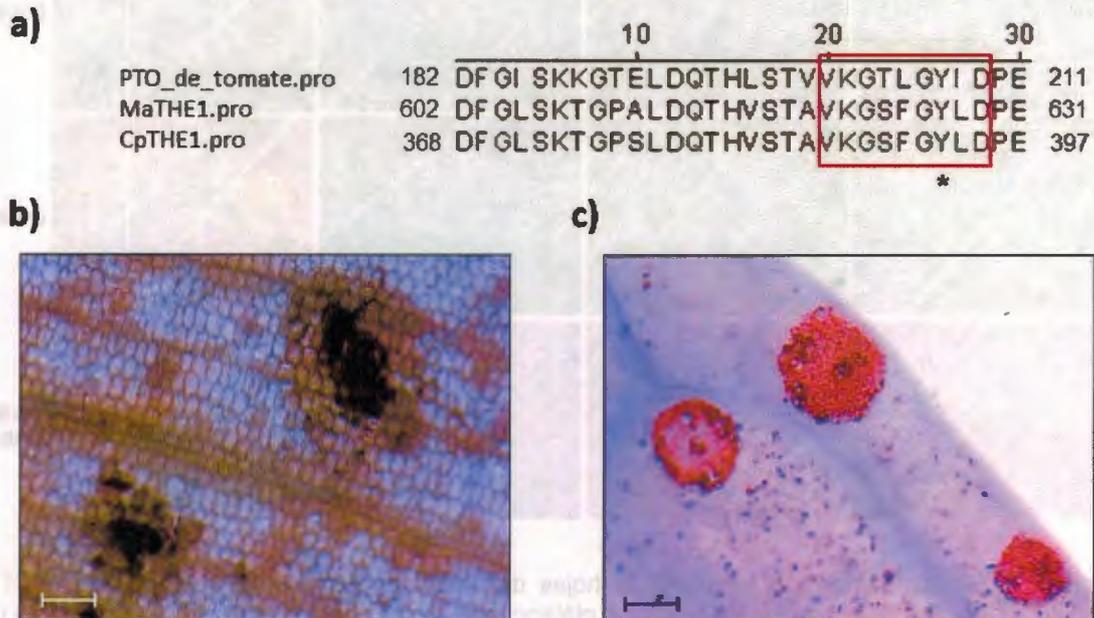
**Figura 3. 18** Transformación temporal de hojas de papaya cv Maradol con *MaTHE1* y *mathe1*<sup>Y627D</sup>. a) Control negativo de hojas de papaya sin bombardear (S/B), b) Control negativo de hojas de papaya transformadas con el vector pCAMBIA 2200 vacío, c) Transformación temporal de hojas de papaya con la construcción pCAMBIA 2200 Ubi-1::*MaTHE1*::NOS, d) Transformación temporal de las hojas de papaya con la construcción pCAMBIA 2200 Ubi-1::*mathe1*<sup>Y627D</sup>:: NOS. La tinción DAB realizada a todas las muestras en el día 8 después de la transformación mostró que las hojas que expresaron la versión mutante del gen *MaTHE1* reaccionaron con la solución DAB debido a una acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un aumento en la actividad de peroxidasas y una muerte celular tipo respuesta hipersensible (color rojiza). El fenotipo observado fue reproducible en tres repeticiones. Barra= 0.05cm.



**Figura 3. 19** Transformación temporal de hojas de plátano cv Enano Gigante con *CpTHE1* y *cpthe1*<sup>Y393D</sup>. a) Control negativo de hojas de plátano sin bombardear (S/B), b) Control negativo de hojas de plátano transformadas con el vector pCAMBIA 2200 vacío, c) Transformación temporal de hojas de plátano con la construcción pCAMBIA 2200 35S::*CpTHE1*::NOS, d) Transformación temporal de hojas de plátano con la construcción pCAMBIA 2200 35S::*cpthe1*<sup>Y393D</sup>::NOS. La tinción DAB realizada a todas las muestras en el día 8 después de la transformación mostró que las hojas que expresaron la versión mutante del gen *CpTHE1* reaccionaron con la solución DAB lo cual indica una acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un aumento en la actividad de peroxidasas y de una muerte celular tipo respuesta hipersensible (color marrón). El fenotipo observado fue reproducible en tres repeticiones. Barra=0.05cm.

En este trabajo hemos generado evidencias que indican que la función en la muerte celular del dominio de cinasa de las secuencias MaTHE1, CpTHE1 y PTO está conservada. Sin embargo, la muerte celular que inducen las versiones mutantes (*mathe1*<sup>Y627D</sup>) y (*cpthe1*<sup>Y393D</sup>) en plátano y papaya presentaron una coloración distinta. La coloración del precipitado puede variar según el tipo de planta. Liu y colaboradores en el 2012, reportaron el fenotipo de la respuesta hipersensible en la planta monocotiledónea de trigo con una coloración marrón oscuro, tal fenotipo presenta mucha similitud con lo

observado en las hojas de plátano (Figura 3.20b). Por otra parte Zeier en el 2005 reportó el fenotipo de la respuesta hipersensible en la planta dicotiledónea de *A. thaliana* donde la reacción de peroxidación presentó una coloración rojiza oscuro, siendo un resultado similar a lo observado en las hojas de papaya (Figura 3.20c).



**Figura 3. 20** Expresión temporal de versiones mutantes de los genes *MaTHE1* y *CpTHE1* inducen una respuesta similar a la respuesta hipersensible en hojas de plátano cv Enano Gigante y papaya cv maradol. a) Alineamiento múltiple del dominio de activación de PTO con los genes *MaTHE1* y *CpTHE1*, se muestra en el recuadro la región lazo P+1 altamente conservada, se especifica el sitio de la mutación sitio dirigida generada en las secuencias de *MaTHE1* y *CpTHE1* (asterisco). Las hojas de plátano (b) y papaya (c) que expresaron los genes mutantes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> inducen la muerte celular tipo respuesta hipersensible. El fenotipo observado fue reproducible en tres repeticiones. Barra=0.02cm

Previamente en el capítulo II de este estudio se demostró que los dominios de cinasa de genes tipo *THESEUS1* identificados en plátano y papaya son homólogos a PTO de tomate. En este capítulo se evaluó la función de los dominios de cinasa de los genes *MaTHE1* y *CpTHE1* observándose que la sustitución del residuo de tirosina por aspartato en la posición 627 y 393 correspondiente al subdominio de activación, indujo una respuesta fenotípica de puntos de coloración café oscuro (en hojas de plátano) y rojiza (en hojas de papaya) en la zona bombardeada, y una reacción con la solución DAB que

concuerta con la acumulación de la especie reactiva de oxígeno  $H_2O_2$ , un aumento en la actividad de peroxidasas y que por tanto sugiere la posibilidad de una muerte celular programada tipo respuesta hipersensible en las hojas transformadas de plátano (Figura 3.13) y de papaya (Figura 3.17), a diferencia de los genes silvestres que no ocasionaron esta respuesta de muerte celular.

Estas son las primeras evidencias experimentales que muestran que el dominio de cinasa de secuencias tipo THESEUS1 tienen una función en la muerte celular apoyando de esta forma el modelo propuesto por Cheung y Wu en el 2011. Esta tesis también proporcionó las primeras evidencias de que esta función de muerte celular del dominio de cinasa de secuencias tipo THESEUS1 está conservada tanto en plantas monocotiledóneas como en dicotiledóneas, lo que hace suponer que esta función se estableció antes de la diversificación de estos grupos de plantas hace aproximadamente 240 millones de años (Wolfe *et al.*, 1989).

### 3.4 DISCUSIÓN

La proteína THESEUS1 (THE1) de *Arabidopsis* es un receptor de membrana tipo cinasa que esta involucrada en el desarrollo y probablemente en la resistencia a patógenos (Hématy *et al.*, 2006). Estudios recientes sugieren que THE1 podría estar desarrollando una papel crucial sensando perturbaciones generadas en la pared celular y también que podría estar involucrada en la muerte celular programada (Cheung y Wu, 2011). En la presente tesis pudimos demostrar que el dominio de cinasa de secuencias tipo THESEUS1 de los cultivos tropicales de plátano y papaya presentan homología con la proteína cinasa PTO de tomate, la cual genera resistencia ante la bacteria *P. syringae* induciendo una muerte celular programada del tipo respuesta hipersensible (Martin *et al.*, 1993), en la cual PTO reconoce las moléculas efectoras AvrPTO o AvrPTOB que son introducidas por la bacteria al interior de la célula mediante el sistema de secreción tipo III (Chisholm *et al.*, 2006). En los últimos años se ha logrado entender como se lleva a cabo el reconocimiento de las moléculas efectoras de *P. syringae*, AvrPTO y PTO las cuales requieren de un motivo de miristoilación que les permite anclarse a membrana y de esta manera se pueda llevar a cabo el reconocimiento del patógeno (Vries *et al.*, 2006) (Figura 1.25). Por otra parte recientemente se demostró que los receptores cinasa FLS2 y EFR que tienen un dominio extracelular LRR son capaces de interactuar físicamente con moléculas efectoras AvrPTO activando la respuesta de resistencia (Xiang *et al.*, 2008) Esto concuerda con el modelo “decoy”, en donde receptores tipo cinasa se localizan anclados en la membrana celular siendo el blanco para que moléculas efectoras como AvrPTO intenten bloquear la respuesta inmune activada por PAMPS, sin embargo, es ahí donde la proteína cinasa de PTO quien tiene un dominio cinasa similar al receptor tipo cinasa puede engañar al efector y de esta forma activa la respuesta inmune activada por efectores (Zong *et al.*, 2008). Tomando en cuenta la homología que presentan las secuencias tipo THESEUS1 encontradas en plátano y papaya con PTO y los antecedentes anteriormente mencionados permitieron proponer en esta tesis que el dominio de cinasa de secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya podrían estar involucrados en la muerte celular del tipo respuesta hipersensible.

El dominio de cinasa del gen *CpTHE1* fue aislado de papaya cv Maradol y comparado con el marco de lectura abierto predicho de su correspondiente alelo del cv SunUp (Ming *et al.*, 2009) encontrándose cuatro polimorfismos que no generaron cambios en la secuencia

de aminoácidos en ambas secuencias (Figura 3.8). En el caso de plátano la secuencia *MaTHE1* fue obtenida de la variedad DH-Pahang (D'Hont *et al.*, 2012) y únicamente se sintetizó químicamente la secuencia correspondiente al dominio de cinasa (Figura 3.2). Previamente en nuestro laboratorio ya se había detectado por RT-PCR la expresión de esta secuencia en tejido de hoja de plátano (Rojas Polanco, 2010).

La proteína PTO ha sido estudiada ampliamente durante los últimos 25 años, uno de los estudios de mayor relevancia fue reportado por Rathjen y colaboradores en (1999), donde se muestra que PTO posee un dominio de activación (residuos 182-209) que contiene siete residuos fosforilables serina (S), treonina (T) y tirosina (Y), de los cuales únicamente los residuos T204 y Y207 comprometen la interacción con la proteína efectora AvrPTO y están ubicados en la región lazo P+1. Estos autores realizaron sustituciones de la T204 y Y207 por aspartato en la secuencia de PTO, logrando obtener de manera interesante un fenotipo de muerte celular constitutiva tipo respuesta hipersensible en ausencia del *P. syringae* a los 4 días después de ser expresadas las secuencias mutantes en hojas de *Nicotiana benthamiana* utilizando la técnica de agroinfiltración Rathjen *et al.*, 1999: De la misma forma estos autores discuten acerca de la tirosina 207 del sitio de activación de PTO de tomate como un regulador negativo de la activación de la muerte celular en *N. benthamiana*. El mismo fenotipo fue observado por Chang y colaboradores en el 2002, donde decidieron mutar los residuos T204D y Y207D en genes homólogos a PTO de la familia *Solanum*. Años más tarde Dong y colaboradores en el 2009 demostraron que la respuesta hipersensible es dependiente de la interacción con la proteína Prf y que AvrPTO interactúa con residuos esenciales de PTO que comprometen la activación de Prf. Dentro de los resultados obtenidos, interesantemente los dominios de cinasa de los genes *MaTHE1* y *CpTHE1* conservan el dominio de activación de PTO (Figura 3.20a), principalmente el residuo de Y en la posición 627 (plátano) y 393 (papaya) que corresponden a la reportada por Rathjen y colaboradores en 1999. Esto hizo posible desarrollar las versiones mutantes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> para poder realizar la transformación transitoria de plátano y papaya con estos genes. Los resultados descritos en este capítulo permitieron aceptar la hipótesis de la presente tesis, ya que los dominios de cinasa de secuencias tipo THESEUS1 *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> pudieron inducir la ocurrencia de una muerte celular similar a la respuesta hipersensible observada en genes de resistencia (Ning. *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2012).

Otro resultado de nuestro trabajo que concuerda con los trabajos de Rathjen *et al.*, (1999); Chang *et al.*, (2002) y Dong *et al.*, (2009), fue el tiempo de cuatro días en el que se observó el fenotipo de muerte celular en hojas de plátano y papaya, que fue el mismo tiempo requerido para observar tal fenotipo en hojas de plátano (Figura 3.13) y papaya (Figura 3.16) utilizando la técnica de biobalística en la presente tesis. Las diferencias en el tiempo ocurrieron cuando evaluamos las secuencias mutantes en hojas de plantas *in vitro* de plátano, donde el tiempo de respuesta fue menor (dos días) (Figura 3.14).

Estos resultados son la primera evidencia funcional de que los receptores cinasa de proteínas de la familia THESEUS1 están involucrados en la muerte celular tal como propuso Cheung y Wu en el 2011, donde ya se había considerado ese papel, no obstante hasta ese momento no se contaban con evidencias que apoyaran dicha propuesta. Esta función en la muerte celular probablemente se deba a que estas proteínas son del tipo de resistencia al igual que PTO, y se encuentran monitoreando posibles amenazas de patógenos en el ambiente, además de estar involucradas en el desarrollo. No sería de sorprender que se confirme tal supuesto, ya que existen proteínas de resistencia que tienen funciones duales tanto en la resistencia a patógenos como en el desarrollo (Afzal *et al.*, 2008). Es importante mencionar que el fenotipo de muerte celular observado tanto en plátano como papaya, se adecuaba al modelo propuesto por Cheung y Wu (2011), quienes proponen que las proteínas THESEUS1/FERONIA se mantienen ancladas a la membrana sensando la actividad de la célula ante el ataque de algún patógeno, una vez detectada alguna perturbación estos receptores se activan fosforilando su dominio de cinasa y en conjunto con el complejo RAC/ROP inducen la producción de especies reactivas de oxígeno como un posible mecanismo de defensa que traerá consigo la activación de diversas rutas, entre ellas la muerte celular programada. Los ensayos de expresión temporal de los genes mutantes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> y los resultados obtenidos con la tinción DAB en hojas de plátano y papaya indican que la activación de estos dominios indujo la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que es un elemento esencial en la muerte celular programada (Thordal *et al.*, 1997). Por otra parte, el fenotipo decoloración observado en las hojas después de la tinción DAB fue diferente entre plátano y papaya, lo cual posiblemente se deba en el caso de plátano a que es una planta monocotiledónea, y según los reportes la coloración observada es marrón oscuro (Liu *et al.*, 2012), a diferencia de las plantas dicotiledóneas como es el caso de papaya, donde pudo observarse una coloración rojiza que es similar a la reportada en *A. thaliana* (Zeier *et al.*,

2005) (Figura 3.13 y 3.16). De la misma forma se observó que la inducción de la respuesta hipersensible se presentó de manera mas rápida en plantas de plátano *in vitro* (Figura 3.14), y como se sabe, THESEUS1 tiene antecedentes de estar involucrado en etapas de desarrollo de la planta (Hématy *et al.*, 2007), por lo que es posible que exista una relación con el rápido efecto observado en plantas *in vitro* a diferencia de las plantas *ex vitro*.

A lo largo de la presente tesis se han encontrado evidencias de la alta similitud entre la proteína PTO y el dominio de cinasa de THESEUS1. Hasta el momento no se tienen pruebas de que THESEUS1 pudiera interactuar físicamente con moléculas efectoras como lo es AvrPTO, sin embargo, estudios realizados en otros receptores cinasa como FLS2 y EFR hacen posible creer que pudiera existir cierta interacción, basándonos en las similitudes estructurales de los genes *MaTHE1* y *CpTHE1* con PTO. Por otra parte los receptores que reconocen PAMPs (PRR) juegan un papel esencial en la adaptación de las plantas ya sea en condiciones ambientales o en respuesta a un gran número de patógenos (Chisholm *et al.*, 2006). En los últimos años, gracias a los adelantos en las tecnologías genómicas se ha visto incrementado el número de descubrimientos de efectores bacterianos que inhiben la ruta de señalización mediada por PAMPs (Kim *et al.*, 2005; Nomura *et al.*, 2006), encontrándose que la molécula efectora AvrPTO bloquea la respuesta inmune dirigida por PRR, considerándose un efector muy antiguo que ha estado en constante evolución para poder bloquear la respuesta inmune de la planta (Xiang *et al.*, 2008).

La interacción de PTO y cinasas PRR con AvrPTO, es el resultado de un proceso de coevolución (Chisholm *et al.*, 2006). Trabajos recientes muestran que AvrPTO está presente en diversos aislados de *P. syringae* que infectan un amplio rango de plantas entre las que se encuentran la calabaza, el haba, el tomate y el tabaco (Lin *et al.*, 2007), sugiriendo un importante papel de AvrPTO en cuanto a su adaptación en esas plantas. Por lo tanto, Lin y Martin en el 2007 consideraron que AvrPTO es una molécula efectora muy antigua involucrada en inhibir receptores cinasas en esas plantas. Para nuestra sorpresa los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que las secuencias más parecidas a PTO en plátano y papaya fueron secuencias de la familia THESEUS1 (éstas fueron las secuencias que aparecieron en los primeros hits del BLAST), y que además de tener un dominio de cinasa tiene un dominio extracelular con motivos de

malectina que en estudios recientes se demostró que son dominios putativos de unión a carbohidratos. Recientes estudios demostraron que receptores tipo cinasa de la familia CrRLK1L a la que pertenece THESEUS1 juegan un papel esencial en la elongación celular, el desarrollo vegetativo y reproductivo; sugiriendo que la presencia de los dominios de malectina son esenciales para que la célula pueda controlar su crecimiento y regular la constante remodelación de su pared celular durante su desarrollo (Boisson *et al.*, 2011).

Otro resultado generado en este capítulo fue demostrar que la función de los genes evaluados no es específica de las especies de estudio, pudiéndose inducir la respuesta hipersensible en hojas de papaya que fueron transformadas con el gen *mathe1*<sup>Y627D</sup> de plátano (Figura 3.18), y de la misma forma en hojas de plátano transformadas con el gen *cpthe1*<sup>Y393D</sup> de papaya (Figura 3.19). Estos resultados son una evidencia de que los genes tipo THESEUS1 son secuencias conservadas en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. Esto aunado a que PTO es una proteína que se encuentra presente probablemente únicamente en plantas de la familia *Solanum*, hace suponer que la función del dominio de cinasa de THESEUS1 y PTO en la muerte celular se pudo haber establecido antes de la divergencia de ambos tipos de proteínas. Como resultado de un proceso evolutivo, PTO posiblemente perdió su dominio transmembranal conservando únicamente un motivo de miristoilación que le permite anclarse a la membrana de la célula para detectar moléculas efectoras que supriman a proteínas PRR, y de esta forma activar la inmunidad activada por efectores, la cual culmina en una respuesta hipersensible y en un fenotipo de resistencia de la planta. Esto explicaría el modelo “decoy”, de como la planta ha coevolucionado a la par con los patógenos y ha desarrollado la habilidad de engañar a las moléculas efectoras como es el caso de AvrPTO, para que en lugar de que bloquee la señal de PRR interactúe con PTO y de esta manera se pueda reactivar la señal de defensa por medio de la interacción con la proteína NB-LRR Prf (Zong *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2009)

Una vez demostrada la función de los genes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> en la muerte celular programada en las hojas de plátano y papaya, éstos genes podrían ser fusionados a promotores inducibles ante patógenos, como los ya reportados por Rushton *et al.*, en el 2002, quienes demostraron que los promotores inducibles sintéticos: 4 x W1, 4 x GCC, 4 x S y 4 x Gst1 son activados únicamente en presencia de patógenos como *Peronospora*

*parasítica* y *P. syringae* (Figura 1.33). De esta forma se estaría utilizando un sistema de resistencia inducible basado en la respuesta hipersensible similar al que las plantas utilizan de manera natural para combatir el ataque de patógenos.

La manipulación por ingeniería genética de los mecanismos de resistencia como la muerte celular programada tipo respuesta hipersensible es una estrategia de mejoramiento genético prometedora que puede ser aplicada a cultivos de papaya y plátano que actualmente presentan enfermedades ocasionadas por numerosos patógenos. El mecanismo que se propone es similar al propuesto por Rushton *et al.*, (2002), en el cual un promotor inducible por un patógeno determinado es fusionado a un gen involucrado en la muerte celular tipo respuesta hipersensible, como podría ser el caso de las secuencias (*mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393D</sup>). La secuencia involucrada en activar la muerte celular solo se debe expresar en el momento en que un patógeno determinado active el promotor inducible y éste a su vez promueva la expresión del gen involucrado en la muerte celular únicamente en el sitio de ataque del patógeno, como podría ser el caso para *M. fijiensis* en plátano o bien *C. gloeosporioides* en papaya. La misma secuencia mutante podría servir para generar resistencia a diferentes tipos de patógenos a través de la muerte celular programada; donde la especificidad estaría dirigida por el promotor inducible utilizado.

---

### 3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Afzal. A., Wood A. and Lightfoot D. (2008). Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *The American Phytopathological Society*. 21:507-517.
- Aviv. D., Rustérucci C., Holt B., Dietrich R., Parker J. and Dangl J. (2002). Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *Isd1* is SA- and NIM1/NPR1-dependent. *The Plant Journal*. 29:381-391.
- Canto. C.B.B. y Castillo A.G.M. (2011). Un mil usos: el plátano. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*. 24:1.
- Chang. J., Tai Y., Bernal A., Lavelle D., Stackawicz B. and Michelmore R. (2002). Functional Analyses of the Pto Resistance Gene Family in Tomato and the Identification of a Minor Resistance Determinant in a Susceptible Haplotype. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 15:281-291.
- 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.
- Christensen. A.H. and Quail, P.H. (1996). Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*. 5:213-218.
- Churchill. C.A. (2010). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*. 1-22.
- Claridades Agropecuarias (1999). Papaya un Mercado en expansión. Claridades Agropecuarias. México. Marzo. Pp 3-24.
- D'Hont. A., Denoeud F., Aury J., Baurens F., Carreel F., Garsmeur O., Noel B., Bocs S., Droc G., Rouard M., Da C., Jabbari K., Cardi C., Poulain J., Souquet M., Labadie K., Jourda C., Lengellé J., Rodier M., Alberti A., Bernard M., Correa M., Ayyampalayam S., Mckain M., Leebens J., Burgess D., Freeling M., Mbéguié D., Chabannes M., Wicker T., Panaud O., Barbosa J., Hribova E., Heslop P., Habas R., Rivallan R., Francois P., Poirion C., Kilian A., Burthia D., Jenny C., Bakry F., Brown S., Guignon

- V., Kema G., Dita M., Waalwijk C., Joseph S., Dievart A., Jaillon O., Leclercq J., Argout X., Lyons E., Almeida A., Jeridi M., Dolezel J., Roux N., Risterucci A., Weissenbach J., Ruiz M., Glaszmann J., Qu erier F., Yahiaoui N. and Wincker P. (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*. 488: 213-219.
- Dong J., Xiao F., Fan F., Gu L., Cang H., Martin G. y Chai J. (2009). Crystal Structure of the Complex between *Pseudomonas* Effector AvrPTOB and the Tomato PTO Kinase Reveals Both a Shared and a Unique Interface Compared with AvrPTO-PTO. *The Plant Cell*. 21:1846-1859.
- Gurr S. and Rushton P. (2005). Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it?. *TRENDS in Biotechnology*. 23:283-290.
- H ematy K., Sado P.E., Van Tuinen A., Rochange S., Desnos T., Balzergue S., Pelletier S., Renou J.P. and H ofte H. (2007). *The Current Biology*. 17:922-931.
- Kim, M.G., Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., and Mackey, D. (2005). Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cel* 121:749-759.
- Lin. N.C., and Martin, G.B. (2007). Pto and Prf mediated recognition of AvrPto and AvrPtoB restricts the ability of diverse *Pseudomonas syringae* pathovar to infect tomato. *Mol. Plant. Microbe Interac*. 20:806-815.
- Liu. Z., Zhang. Z., Faris. J., Oliver. R., Syme. R., McDonald. M., McDonald. B., Solomon. P., Lu. S., Shelver. W., Xu. S. and Friesen. T. (2012). The Cysteine Rich Necrotrophic Effector SnTox1 Produced by *Stagonospora nodorum* Triggers Susceptibility of Wheat Lines Harboring *Snn1*. *Plos Pathogens*. 8:1-24.
- Martin G., Brommonschenkel S., Chunwongse J., Frary A., Ganai W., Spivey R., Wu T., Earle E. and Tanksley S. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*. 262:1432-1436.
- Ming R., Hou S., Feng Y., Yu Q., Dionne L.A., Saw J.H., Senin P., Wang W., Ly B.V., Lewis K.L., Salzberg S.L. Feng L., Jones M.R., Skelton R.L., Murray J.E., Chen C., Qian W., Shen J., Du P., Eustice M., Tong E., Tang H., Lyons E., Paull R.E., Michael

- T.P., Wall K., Rice D.W., Albert H., Wang M.L., Zhu Y.J., Schatz M., Nagarajan N., Acob R.A., Guan P., Blas A., Wai C.M., Ackerman C.M., Ren Y., Liu C., Wang J., Na J.K., Shakirov E.V., Haas B., Thimmapuram J., Nelson D., Wang X., Bowers J.E., Gschwend A.R., Delche A.L., Singh R., Suzuky J.Y., Tripathi S., Neupane K., Wei H., Irikura B., Paidi M., Jiang N., Zhang W., Presting G., Windsor A., Navajas P.R., Torres M.J., Feltus F.A., Porter B., Li Y., Burroughs A.M., Luo M.C. Liu L., Christopher D.A., Mount S.M., Moore P.H., Sugimura T., Jiang J., Schuler M.A., Friedman V., Mitchell O.T., Shippen D.E., dePamphilis C.W., Palmer J.D., freeling M., Paterson A.H., Gonsalves D., Wang L., Alam M. (2008). The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*. 452:991-996.
- Murashige. T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiology Plants*. 15: 473-497.
- Ning. W., Chen. Fang., Mao. B., Li. Qun., Guo. Z. and He. Z. (2004). N-acetylchitooligosaccharides elicit rice defence responses including hypersensitive response-like cell death, oxidative burst and defence gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 64:263-271.
- Nomura. K., DebRoy, S., Lee, Y.H., Pumphin, N., Jones, J., and He, S.Y. (2006). A bacterial virulence protein suppresses host immunity to cause plant disease. *Science* 313: 220-223.
- Rathjen. J., Chang J., Staskawicz B and Michelmore R. (1999). Constitutively active PTO induces a Pfr-dependent hypersensitive response in the absence of avrPTO. *The EMBO Journal*. 18:3232-3240.
- Rushton. P., Reinsädler A., Lipka V., Lippok B. and Somssich E. (2002). Synthetic Plant Promoters Containing Defined Regulatory Elements Provide Novel Insights into Pathogen- and Wound-Induced Signaling. *The Plant Cell*. 14:749-762.
- Tang. X., Xie M., Kim Y., Zhou J., Klessin D. and Martin G. (1999). Overexpression of PTO activates defense responses and confers broad resistance. *The Plant Cell*. 11: 13-29.
- Thordal. H., Zhang Z., Wei Y. and Collinge D. (1997). Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal*. 11:1187-1194.

- Vries. J., Andriotis V., Wu A. and Rathjen J. (2006). Tomato Pto encodes a functional N-myristoylation motif that is required for signal transduction in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*. 45:31-45.
- Wolfe. K., Gouy. M., Yang. Y., Sharp. P. and Li. W. (1989). Date of the monocot-dicot divergence estimated from chloroplast DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:6201-6205.
- Zavala. L.M., Tun S.J., Alejo C., Ruíz S.E., Gutiérrez A., Vázquez C.M., Méndez G.R. (2005). Control Postcosecha de la antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (penz) sacc.a fungicidas organosintéticos. *Revista Chapingo*. 11: 251-255.
- Zeier. J. (2005). Age-dependent variations of local and systemic defense responses in *Arabidopsis* leaves towards an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 66:30-39.
- Zong N., Xiang T., Zou Y., Chia J. and Zhou J. (2008). Bloking and triggering of plant immunity by *Pseudomonas syringae* effector AvrPTO. *Plant Signaling & Behavior*. 3:583-585.



## CAPÍTULO IV

### 4.1 DISCUSIÓN GENERAL

La manipulación de genes de resistencia involucrados en la inducción de la muerte celular programada se ha planteado como una estrategia para generar plantas con resistencia a patógenos. Además, se ha propuesto el uso de promotores inducibles para activar tales genes involucrados en la muerte celular como alternativa sobre el uso de promotores constitutivos, que ofrece la ventaja de activar la respuesta de defensa en presencia de un estímulo específico ya sea biótico o abiótico (Gurr *et al.*, 2005).

En los años noventa se demostró que las plantas presentan mecanismos de defensa, llegando a inducir su propia muerte celular para impedir que un agente patógeno pueda infectarlas (Ryals *et al.*, 1996). No obstante, se ha reportado que la muerte celular programada no es específica de la defensa a patógenos, sino que es empleada por la planta en varios procesos del desarrollo y de estrés abiótico (Hofius *et al.*, 2009).

La muerte celular programada de tipo hipersensible, únicamente se activa cuando la planta detecta proteínas de avirulencia de un patógeno, desencadenando con ello una cascada de señalización que induce un proceso llamado lignificación en donde las células se compactan de tal manera que inmovilizan al patógeno, posteriormente moléculas y especies reactivas de oxígeno, principalmente  $H_2O_2$ , son liberados en el sitio de infección causando la muerte de la célula y del patógeno en un sitio específico (Madriz, 2002) (Figura 1.10).

PTO es la proteína de resistencia más estudiada en la actualidad y genera una resistencia de tipo respuesta hipersensible en tomate ante la bacteria hemibiótrofa *P. syringae* (Martin *et al.*, 1993). Diversos estudios se han realizado para caracterizar la función de esta proteína y de esta manera poder explicar como lleva a cabo la interacción con moléculas efectoras de la bacteria *P. syringae* para poder inducir dicha muerte celular (Rathjen *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2010). En *N. benthamiana* se demostró que PTO puede inducir la muerte celular en ausencia del patógeno, Rathjen *et al.* (1999) y Dong *et al.* (2009) estudiaron detalladamente el sitio de activación de esta proteína y concluyeron que el residuo de tirosina en la posición 207 actúa como regulador negativo de PTO.

Estos autores sugieren que la unión de la proteína de avirulencia AvrPTO o AvrPTOB en el sitio de activación de PTO interfiere con diferentes aminoácidos cuya función es la de promover la inactivación de la proteína de PTO. La perturbación de estos aminoácidos por las proteínas de avirulencia provoca un cambio en la estructura tridimensional de PTO que conduce a la activación de la muerte celular de tipo respuesta hipersensible, y esto es lo que precisamente podría haber ocurrido con las secuencias mutantes de PTO, al sustituir la Y207 por aspartato en el sitio de activación de la proteína, lo cual simula el estado activo de la proteína en ausencia de la proteína de avirulencia. De hecho la mutante Y207A pierde la capacidad de unirse a las proteínas de avirulencia antes mencionadas (Rahtjen *et al.*, 1999)

Existe una gran familia de receptores tipo cinasa que tienen funciones similares en la defensa contra patógenos, entre los miembros de esta familia tenemos a los receptores tipo cinasa Ser/Thr que son clasificados en receptores transmembranales y citoplasmáticos (Azfal *et al.*, 2008). THESEUS1 es un receptor transmembranal tipo cinasa involucrado en procesos de desarrollo de la planta y que probablemente funciona como un sensor de cambios en la pared celular (Hématy *et al.*, 2007). Recientemente Cheung y Wu en el 2011 plantearon que THESEUS1 en conjunto con otros receptores cinasa estructuralmente similares, como FERONIA y HÉRCULES podrían estar involucrados en un mecanismo de muerte celular y resistencia contra patógenos. Tomando en cuenta estos antecedentes se decidió caracterizar el dominio de cinasa de estas secuencias tipo THESEUS1 en los cultivos tropicales de plátano y papaya y evaluar su papel en la muerte celular.

En este trabajo de tesis se lograron identificar 17 secuencias tipo *THESEUS1* en el genoma de *Musa acuminata* cv. DH-Pahang (D'Hont *et al.*, 2012) (Cuadro 2.1), y 9 secuencias tipo *THESEUS1* en el genoma de papaya transgénica variedad SunUp (Ming *et al.*, 2009) (Cuadro 2.2). Aunque estructuralmente THESEUS1 y PTO solo comparten el dominio cinasa serina/treonina, se mostró mediante un análisis filogenético que son homólogos al gen PTO (Figura 2.5). Sin embargo, se observó que la longitud THESEUS1 y PTO no son iguales debido a que THESEUS1 presenta un dominio transmembranal. Previamente, Hématy *et al.* (2007) demostraron que el dominio de cinasa de THESEUS1 es activo por si solo. Por tal motivo se decidió caracterizar únicamente el dominio cinasa de las secuencias con mayor identidad a PTO que correspondieron a *MaTHE1* para

plátano y *CpTHE1* para papaya, para posteriormente generar sus versiones mutantes en los residuos 627 para plátano y 393 para papaya, que corresponde al residuo Y207D en PTO de tomate tal como reportan Rahtjen *et al.* (1999) y Dong *et al.* (2009). Los resultados obtenidos son de gran interés ya que los genes tipo *THESEUS1* de plátano en sus versiones mutantes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y papaya *cpthe1*<sup>Y393D</sup> fueron homólogos a PTO y capaces de inducir la muerte celular tipo respuesta hipersensible en las hojas transformadas transitoriamente. La expresión transitoria de las versiones mutantes (*mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393Y</sup>) de los genes *MaTHE1* y *CpTHE1* produjo un fenotipo de muerte celular tipo respuesta hipersensible en hojas de plátano y papaya, a diferencia del fenotipo observado para los genes silvestres (Figura 3.13 y 3.16). Este resultado es de gran relevancia pues se demostraron diferentes puntos. Primero se demostró que los residuos de tirosina localizados en la posición 627 (para plátano) y 393 (para papaya) de la región lazo P+1, juegan un papel esencial en la activación de los genes *MaTHE1* y *CpTHE1* de manera similar a PTO de tomate como fue demostrado por Rathjen *et al.* (1999). De igual manera se demostró que el dominio de cinasa de genes tipo *THESEUS1* está involucrado en la muerte celular tipo respuesta hipersensible en los cultivos de plátano y papaya, siendo este trabajo el primer reporte funcional de este dominio de cinasa en especies diferentes a la planta modelo *A. thaliana*, lo que se adecua muy bien al modelo sugerido por Cheung y Wu (2011), que señala que el complejo de receptores de cinasa *THESEUS1/FERONIA* requieren la activación de su dominio de cinasa para poder inducir al complejo *RAC/ROP* para que se genere la producción de especies reactivas de oxígeno, principalmente  $H_2O_2$ . Esto se demostró en esta tesis con la tinción DAB realizada a las hojas transformadas transitoriamente con los genes mutantes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> (Figura 3.14 y 3.16), donde cualitativamente se observó el fenotipo esperado como consecuencia de una hiperacumulación de  $H_2O_2$  en las hojas transformadas con las secuencias mutantes, a diferencia de las hojas transformadas con los genes silvestres, por lo que el fenotipo observado debe ser el resultado de la actividad de las proteínas mutantes. Trabajos previos con mutantes de PTO demostraron que la respuesta hipersensible se daba de manera visible a partir del día 4 posterior a la agroinfiltración (Rathjen *et al.*, 1999; Vries *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2009), en el caso de las hojas de plátano y papaya transformadas con los genes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> se pudo observar que el método de transformación temporal por biobalística permitió inducir el fenotipo de muerte celular a partir del día 2 posterior al bombardeo en hojas de plátano cultivadas *in vitro* y hasta el día 4 en las hojas *ex vitro* (Figura 3.13 y 3.14).

De manera interesante se demostró que los genes mutantes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe1*<sup>Y393D</sup> son funcionales más allá de la clase taxonómica, el gen *mathe1*<sup>Y627D</sup> ocasionó una muerte celular en hojas de papaya (Figura 3.18) y de la misma forma el gen *cpthe1*<sup>Y393D</sup> indujo una muerte celular parecida a la respuesta hipersensible en las hojas de plátano (Figura 3.19).

Una vez demostrado que estos genes inducen la muerte celular, el siguiente paso sería poder caracterizar promotores inducibles que respondan a los patógenos que más afectan la producción de plátano y papaya, estos promotores serían fusionados a las secuencias mutantes de *MaTHE1* y *CpTHE1* para inducir los mecanismos naturales de la planta para resistir el estrés biótico. Consideramos que las aportaciones de esta tesis representan un avance importante en el entendimiento de la función de las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya, y abren la oportunidad para su aprovechamiento en programas de mejoramiento genético de estos cultivos.

## 4.2 CONCLUSIONES

1. El genoma de plátano cv. DH-Pahang y papaya variedad SunUp cuentan respectivamente con 17 (*MaTHE1-MaTHE17*) y 9 secuencias (*CpTHE1-CpTHE9*) que muestran una alta similitud con la proteína THESEUS1 de *A. thaliana*. Las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya presentaron los 11 subdominios de cinasa serina/treonina. Además, el dominio de cinasa de estas secuencias presentó una estructura tridimensional similar a la proteína de resistencia PTO. Las secuencias más similares a THESEUS1 y a PTO fueron *MaTHE1* y *CpTHE1*.
2. El análisis filogenético mostró que los dominios de cinasa de las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya están relacionados de manera cercana con el dominio de cinasa de secuencias tipo THESEUS de otras especies de plantas, así como con la proteína de resistencia PTO. Esta homología con PTO sugiere una posible función de las secuencias tipo THESEUS1 de plátano y papaya en la resistencia a patógenos.
3. Las versiones mutantes de las secuencias tipo *THESEUS1* de plátano y papaya *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpth1*<sup>Y393D</sup>, pudieron activar una muerte celular en tejido de hoja de plátano y papaya, similar a lo reportado para la versión mutante *pto*<sup>Y207D</sup> o la muerte celular activada por otros genes R. Esta muerte celular estuvo acompañada por un aumento en la actividad de peroxidasas, lo cual se puede deber a una hiperacumulación de la especie reactiva de oxígeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
4. Las tirosinas 627 y 393 del sitio de activación de las secuencias *MaTHE1* y *CpTHE1*, respectivamente, podrían estar actuando como un regulador negativo de la activación de la muerte celular programada similar al de la tirosina 207 de PTO.
5. La función de los genes *MaTHE1* y *CpTHE1* en la muerte celular programada esta conservada tanto en plantas monocotiledóneas como en dicotiledóneas.

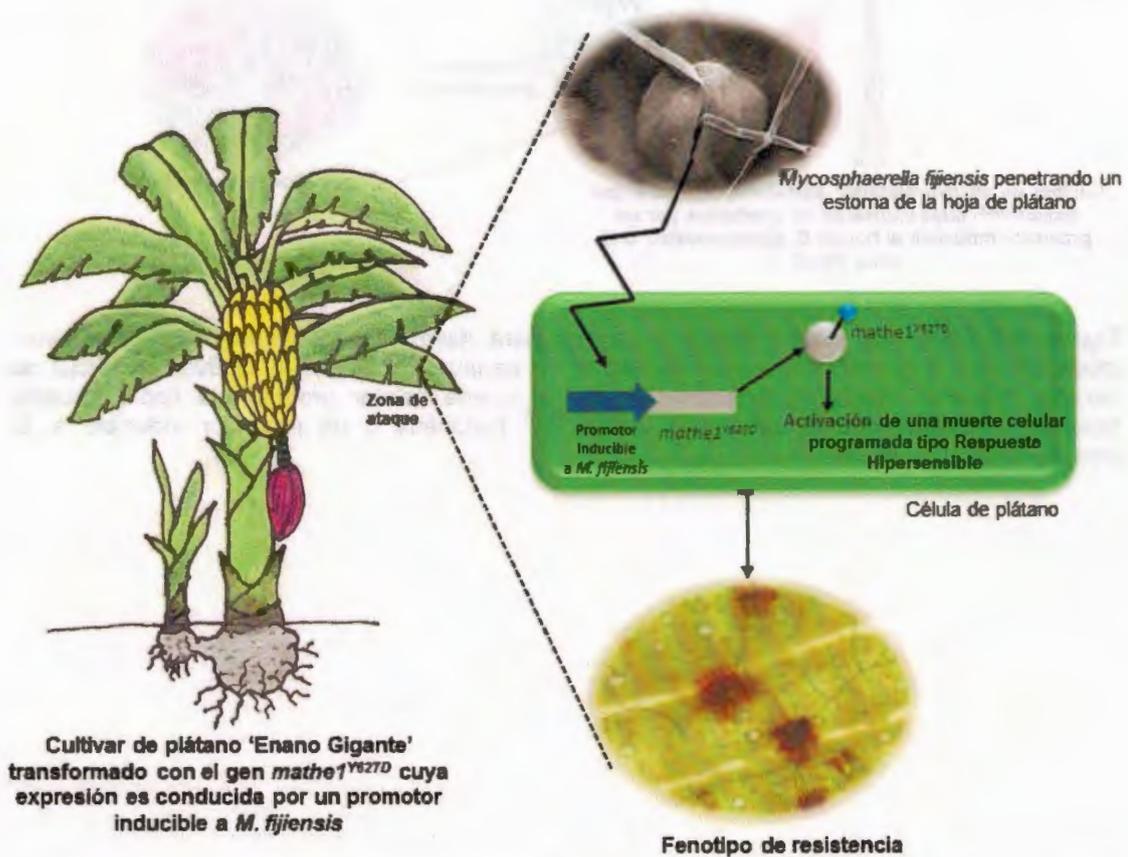
### 4.3 PERSPECTIVAS

En la presente tesis se caracterizó *in silico* la estructura de los miembros de la familia tipo *THESEUS1* de plátano y papaya. También se avanzó de manera importante con el análisis funcional de estas secuencias al descubrir que *MaTHE1* y *CpTHE1* están involucradas en la muerte celular. Con la finalidad de avazar más en el conocimiento de estas secuencias se propone determinar su actividad de cinasa, para lo cual se requerirá expresar los correspondientes dominios de cinasa de *MaTHE1* y *CpTHE1* en la bacteria *E. coli* y purificar las correspondientes proteínas para que puedan ser utilizadas en ensayos de actividad de cinasa *in vitro*.

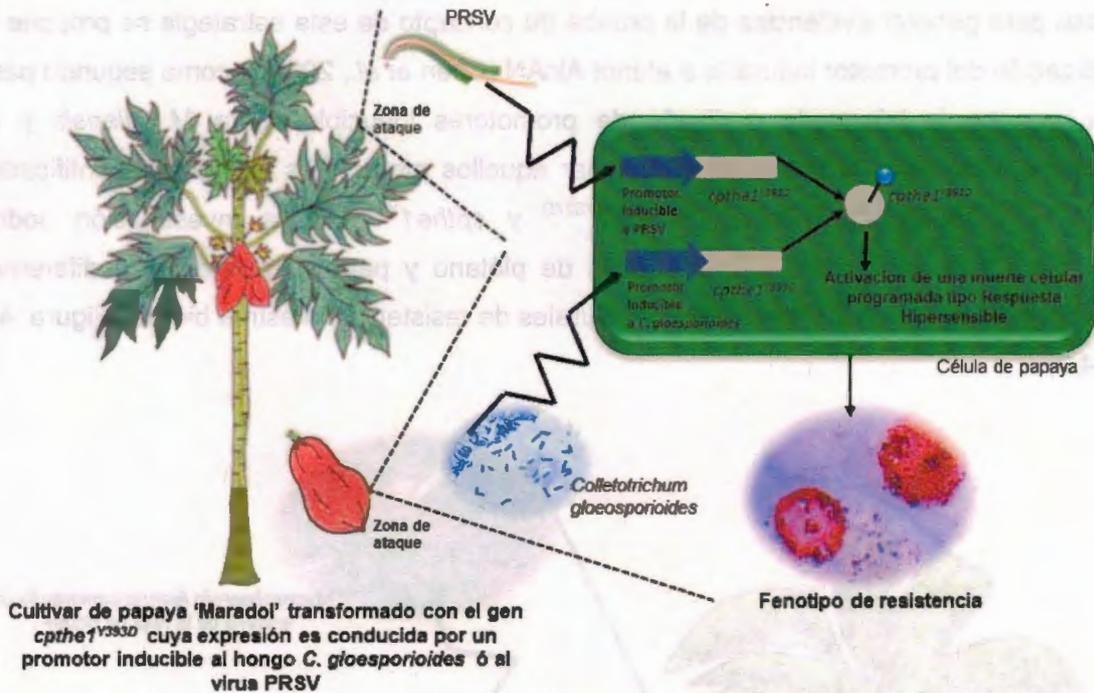
También se planea determinar la localización celular de estas secuencias mediante su expresión como proteínas de fusión con la proteína verde fluorescente (GFP). Otro aspecto interesante para estudiar será la identificación mediante la técnica de dos híbridos de otras proteínas que interactúen con los dominios de cinasa de *MaTHE1* y *CpTHE1*. La identificación de otras proteínas que interactúen con *MaTHE1* y *CpTHE1* permitirá diseccionar la cascada de señalización que conduce a la muerte celular. Otro aspecto relevante para estudiar será evaluar la expresión mediante RT-PCR de genes marcadores de la muerte celular y de la resistencia sistémica adquirida en las hojas transformadas de manera temporal con las construcciones mutantes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpthe*<sup>Y393D</sup>. Otro aspecto interesante por evaluar en las hojas que mostraron el fenotipo de muerte celular será cuantificar la producción de especies reactivas de oxígeno (ejemplo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y por otro lado cuantificar fuga de electrolitos, como resultado del daño a la membrana celular.

La muerte celular de tipo respuesta hipersensible es una de las respuestas más efectivas que tiene la planta para resistir el ataque de patógenos. En esta tesis logramos generar evidencias que muestran que una sola mutación en el codón que especifica a la tirosina del sitio de activación de *MaTHE1* y *CpTHE1* es suficiente para activar una muerte celular en hojas de genotipos de plátano y papaya que son susceptibles a los hongos *M. fijiensis* y *C. gloesporioides* respectivamente. El hecho de haber activado una muerte celular de tipo respuesta hipersensible en genotipos susceptibles a estos patógenos sugiere que estas secuencias mutantes podrían utilizarse para el mejoramiento genético de estos cultivos mediante el uso de promotores inducibles (Malnoy *et al.*, 2006). Como primer

paso para generar evidencias de la prueba de concepto de esta estrategia se propone la utilización del promotor inducible a etanol AlcAN (Chen *et al.*, 2003) y como segundo paso se propone la búsqueda o diseño de promotores inducibles para *M. fijiensis* y *C. gloesporioides* con la finalidad de fusionar aquellos promotores inducibles identificados con las secuencias mutantes *mathe1*<sup>Y627D</sup> y *cpth1*<sup>Y393D</sup>. Esta investigación podría conducir a la generación de variedades de plátano y papaya resistentes a diferentes patógenos utilizando los mecanismos naturales de resistencia al estrés biótico (Figura 4.1 y 4.2).



**Figura 4.1** Estrategia biotecnológica propuesta para desarrollar resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* en el cultivar comercial de plátano 'Enano Gigante', mediante la activación de la muerte celular programada tipo respuesta hipersensible, utilizando la secuencia *mathe1*<sup>Y627D</sup> fusionada a un promotor inducible a *M. fijiensis*.



**Figura 4.2** Estrategia biotecnológica propuesta para desarrollar resistencia a *Colletotrichum gloeosporioides* ó al virus de la mancha anular de papaya (PRSV) en el cultivar comercial de papaya 'Maradol', mediante la activación de la muerte celular programada tipo respuesta hipersensible, utilizando la secuencia *cpth1<sup>Y393D</sup>* fusionada a un promotor inducible a *C. gloeosporioides* ó al PRSV.

---

#### 4.4 BIBLIOGRAFÍA

- Afzal. A., Wood A. and Lightfoot D. (2008). Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. *The American Phytopathological Society*. 21:507-517.
- Boisson. D. A., Kessler. S. A. and Grossniklaus. U. (2011). The walls have ears: the role of plant CrRLK1Ls in sensing and transducing extracellular signals. *Journal of experimental botany*. 62:1581-1591.
- Chang. J., Tai Y., Bernal A., Lavelle D., Stackawicz B. and Michelmore R. (2002). Functional Analyses of the Pto Resistance Gene Family in Tomato and the Identification of a Minor Resistance Determinant in a Susceptible Haplotype. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 15:281-291.
- Chang. S. and Martin G. (2010). Effector- triggered immunity mediated by the PTO kinase. *Cell*. 20:1-9.
- Chen. S., Hofius. D., Sonnewald. U., Börnke. F. (2003). Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA. *The plant journal*. 36:731-740.
- Cheung A. and Wu H. (2011). THESEUS1, FERONIA and relatives: a family of cell wall-sensing receptor kinases?. *Current Opinion in Plant Biology*. 14:632-641.
- Dong J., Xiao F., Fan F., Gu L., Cang H., Martin G. y Chai J. (2009). Crystal Structure of the Complex between *Pseudomonas* Effector AvrPTOB and the Tomato PTO Kinase Reveals Both a Shared and a Unique Interface Compared with AvrPTO-PTO. *The Plant Cell*. 21:1846-1859.
- D'Hont A., Denoeud F., Aury J., Baurens F., Carreel F., Garsmeur O., Noel B., Bocs S., Droc G., Rouard M., Da C., Jabbari K., Cardi C., Poulain J., Souquet M., Labadie K., Jourda C., Lengellé J., Rodier M., Alberti A., Bernard M., Correa M., Ayyampalayam S., Mckain M., Leebens J., Burgess D., Freeling M., Mbéguié D., Chabannes M., Wicker T., Panaud O., Barbosa J., Hribova E., Heslop P., Habas R., Rivallan R., Francois P., Poirion C., Kilian A., Burthia D., Jenny C., Bakry F., Brown S., Guignon V., Kema G., Dita M., Waalwijk C., Joseph S., Dievart A., Jaillon O., Leclercq J., Argout X., Lyons E., Almeida A.,

Jeridi M., Dolezel J., Roux N., Risterucci A., Weissenbach J., Ruiz M., Glaszmann J., Qu erier F., Yahiaoui N. and Wincker P. (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*. 488: 213-219.

Gurr S. and Rushton P. (2005). Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it?. *TRENDS in Biotechnology*. 23:283-290.

H ematy K., Sado P., Tuinen A., Rochange S., Desnos T., Balzergue S., Pelletier S., Renou J. and H ofte H. (2007). A receptor-like kinase mediates the response of *Arabidopsis* cells to the inhibition of cellulose synthesis. *Current Biology*. 17:922-931.

Hofius D., Schultz T., Joensen J., Tsitsigiannis D., Petersen N., Mattsson O., Jorgensen L., Jones J., Mundy J. and Petersen M. (2009). Autophagic Components Contribute to Hypersensitive Cell Death in *Arabidopsis*. *Cell*. 137:773-783.

Madriz K.(2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-pat geno. *Manejo Integrado de Plagas*. 63:22-32.

Malnoy M., Reynoird J., Borejsza E. and Aldwinckle H. (2006).Activation of the pathogen inducible *Gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apples (*Malus x domestica*).*Transgenic research*. 15:83-93.

Martin G., Brommonschenkel S., Chunwongse J., Frary A., Ganai W., Spivey R., Wu T., Earle E. and Tanksley S. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato.*Science*. 262:1432-1436.

Ming R., Hou S., Feng Y., Yu Q., Dionne L.A., Saw J.H., Senin P., Wang W., Ly B.V., Lewis K.L., Salzberg S.L. Feng L., Jones M.R., Skelton R.L., Murray J.E., Chen C., Qian W., Shen J., Du P., Eustice M., Tong E., Tang H., Lyons E., Paull R.E., Michael T.P., Wall K., Rice D.W., Albert H., Wang M.L., Zhu Y.J., Schatz M., Nagarajan N., Acob R.A., Guan P., Blas A., Wai C.M., Ackerman C.M., Ren Y., Liu C., Wang J., Na J.K., Shakirov E.V., Haas B., Thimmapuram J., Nelson D., Wang X., Bowers J.E., Gschwend A.R., Delche A.L., Singh R., Suzuky J.Y., Tripathi S., Neupane K., Wei H., Irikura B., Paidi M., Jiang N., Zhang W., Presting G., Windsor A., Navajas P.R., Torres M.J., Feltus F.A., Porter B., Li Y., Burroughs A.M., Luo M.C. Liu L., Christopher D.A., Mount S.M., Moore P.H., Sugimura T., Jiang J., Schuler M.A., Friedman V., Mitchell O.T., Shippen D.E., dePamphilis C.W., Palmer J.D., freeling M., Paterson A.H., Gonsalves D., Wang L., Alam M. (2008). The draft

- genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*. 452:991-996.
- Mourgues F., Brisset M. and Chevreau E. (1998). Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Trends in Biotechnology*. 16: 203-209.
- Mur L., Kenton P., Lloyd A., Ougham H. and Prats E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know?. *Journal of Experimental Botany*. 59:501-520.
- Rathjen J., Chang J., Staskawicz B and Michelmore R. (1999). Constitutively active PTO induces a Pfr-dependent hypersensitive response in the absence of avrPTO. *The EMBO Journal*. 18:3232-3240.
- Ryals, JA ; Neuenschwander, U H ; Willits, M G ; Molina , A ; Steiner, H-Y; Hunt,MD. 1996. Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8:1009-1819.
- Schouten, H.J., F.A. Krens y E. Jacobsen. (2006) Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Reports*, 7, 750–753.
- Vivianne, G.A.V., Martens, A., Dooijeweert, W., Colon, L.T., Govers, F. and Kamoun, S. (2001). Ancient diversification of the PTO kinase Family preceded speciation in *Solanum*. *MPMI*. 14:996-1005.
- Vries J., Andriotis V., Wu A. and Rathjen J. (2006). Tomato Pto encodes a functional N-myristoylation motif that is required for signal transduction in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal*. 45:31-45.

