



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE UN GEN TIPO  
*NPR1* EN PLANTAS DE COCOTERO TRATADAS  
CON ÁCIDO SALICÍLICO

Tesis que presenta

JOSÉ GERMÁN NIC MATOS

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción: Biotecnología

Mérida, Yucatán, México

Agosto 2012







## **RECONOCIMIENTO**

**Por medio de la presente, hago constar que el trabajo titulado. “Estudio de la expresión de un gen tipo *NPR1* en plantas de cocotero tratadas con ácido salicílico” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín, dentro de la opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado de Ciencias Biológicas de este Centro.**

**Atentamente.**

**Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela**

**Director Académico**

**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**



Mérida, Yucatán, México, Agosto 2012

## **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

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



---

**IBQ. José Germán Nic Matos**



## AGRADECIMIENTOS

Al **Centro de Investigación Científica de Yucatán**, por todas las instalaciones prestadas para llevar a cabo la realización de este trabajo de investigación y por brindarme la oportunidad de formarme como Maestro en Ciencias.

Al **CONACYT** por la beca otorgada durante los dos años Maestría.

Al proyecto **Common Found for commodities (CFC)**, por los apoyos brindados y que fueron fundamentales para la realización de este trabajo de investigación.

A mi asesor, el **Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín**, un especial agradecimiento por brindarme la oportunidad y la confianza de trabajar en su proyecto de investigación, al igual por darme la oportunidad de convivir con la gente del laboratorio de cocotero. ¡Mil Gracias Estimado Doctor!

Al **Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell**, por su ayuda en los trámites de la tesis y por sus consejos durante la Maestría. Le agradezco por brindarme su amistad y confianza lo cual hizo agradable mi estancia en el laboratorio durante la Maestría. ¡Gracias!

Al **Dr. Santy Peraza Echeverría**, por sus observaciones y comentarios en la redacción de la tesis, así como por el conocimiento transmitido durante mi formación como Maestro en Ciencias. También quiero agradecerle especial y sinceramente por los consejos brindados en su momento y que fueron pieza clave para mi superación personal. ¡Gracias!

A la **M.C. María Narvárez Cab**, por el apoyo técnico brindado durante la Maestría y por sus comentarios durante la redacción de la tesis. Quiero agradecerle por los consejos brindados y por darme su confianza y amistad, los cuales hicieron mi estancia en el laboratorio placentera. ¡Gracias Mary!

Al **M.C. Iván Córdova Lara**, te agradezco por el conocimiento compartido y por el apoyo técnico, facilitandome algunos reactivos que en su momento fueron necesarios para la extracción del ARN y la síntesis de ADN complementario. Te agradezco también por tu sincera amistad y por tus consejos durante la Maestría los cuales sirvieron de motivación. ¡Thanks Master!

A mi comité tutorial, el **Dr. Carlos Oropeza Salín**, **Dr. Luis Sáenz Carbonell**, **Dr. Santy Peraza Echevería** y **Dr. Gabriel Lizama Uc**, por sus observaciones y comentarios, ya que fueron de mucha ayuda para la conclusión exitosa de este trabajo de investigación.

A la **Dra. Elizabeth Ortiz** por su apoyo en la revisión del documento de la tesis. ¡Gracias!

Al **Dr. Antonio Andrade Torres**, por los conocimientos prácticos y teóricos transmitidos durante la maestría. ¡Gracias Amigo!

Al **Dr. Celso Reyes Martinez**, por su ayuda en la traducción del Abstract de la tesis y por brindarme su valiosa amistad durante la Maestría. ¡Gracias Amigo!

A la **Dra. Goretty Caamal Chan**, por su apoyo en el tratamiento de las plantas de cocotero con SA y en la colecta de los tejidos.

Al **M.C. Carlos Alberto Puch Hau**, por los conocimientos compartidos y por su apoyo en el laboratorio durante la Maestría. ¡Gracias Carnalito!

A la **IBQ. Ana Collí Rodriguez**, por su ayuda en los trámites y cotizaciones de reactivos empleados durante este trabajo de investigación. ¡Gracias Anita!

A mis compañeros del laboratorio de cocotero ¡Gracias Compañeros!

A **Gabriela Ek Yah**, por acompañarme y apoyarme incondicionalmente en todo momento en esta travesía que llamamos ¡vida!, te agradezco el cariño y el amor que me has brindado en los momentos de angustia, al igual por motivarme cada día para alcanzar mis metas. ¡Gracias Mujer!

A mis pequeños **José Julián** y **Héctor Alejandro**, por ser ahora los pilares de mi superación personal, porque gracias a la alegría y al cariño que ustedes me brindan es que puedo decir que absolutamente todo vale la pena. ¡Gracias Hijos!

A mis **padres**, les agradezco por darme la oportunidad de estudiar para alcanzar mis sueños y por apoyarme en todo momento durante la Maestría ¡Los Quiero Mucho!

A **Dios**, por darme vida y salud para lograr alcanzar mis metas. Te agradezco por darme la sabiduría para concluir exitosamente esta etapa en mi vida profesional. ¡Gracias!

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5

## CAPITULO I

1.1 ANTECEDENTES GENERALES.....	7
1.1.1 El Cocotero ( <i>Cocos nucifera</i> L.).....	7
1.1.1.1 Características taxonómicas.....	7
1.1.1.2 Descripción taxonómica.....	7
1.1.1.3 Importancia económica.....	8
1.1.2 Amarillamiento letal (AL).....	8
1.1.2.1 Dispersión.....	8
1.1.2.2 Síntomas.....	9
1.1.2.3 Agente causal y vector.....	10
1.1.2.4 Control del amarillamiento letal.....	11
1.1.3 Respuesta de la planta ante un patógeno.....	11
1.1.4 Sistema inmune de la planta.....	12
1.1.4.1 Modelo "ZIG-ZAG" del sistema inmune de plantas.....	12
1.1.4.2 Tipos de genes de resistencia.....	13
1.1.5 Reconocimiento del patógeno.....	15
1.1.5.1 Respuesta hipersensible (HR).....	16
1.1.5.2 Resistencia sistémica adquirida (SAR).....	17
1.1.5.3 Ácido salicílico (SA).....	19
1.1.6 NPR1 (No expresivo de genes <i>PR-1</i> ).....	19
1.1.6.1 Caracterización y clonación del gen <i>NPR1</i> .....	21
1.1.6.2 Estructura característica de la proteína NPR1.....	22
1.1.6.3 NPR1 y su interacción con proteínas.....	23
1.1.6.4 Proteína relacionadas a patogénesis (PR).....	25
1.1.6.5 Genes tipo <i>NPR1</i> caracterizadas en otras especies de plantas.....	27
1.1.6.6 Biotecnología de NPR1.....	28
1.1.7 Mecanismos de defensa en cocotero ( <i>Cocos nucifera</i> L.).....	29

1.2 HIPÓTESIS.....	33
1.3 OBJETIVOS.....	33
1.3.1 General.....	33
1.3.2 Específicos.....	33
1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.....	34
1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

## CAPÍTULO II

### ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN TIPO *NPR1* EN PLANTAS DE COCOTERO TRATADAS CON ÁCIDO SALICÍLICO

2.1 INTRODUCCIÓN.....	45
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	48
2.2.1 Material vegetal.....	48
2.2.2 Tratamiento de las plantas con ácido salicílico (2.5 mM).....	48
2.2.3 Diseño de cebadores específicos.....	50
2.2.4 Estandarización de las condiciones de PCR para el estudio de expresión del gen tipo <i>NPR1</i> .....	51
2.2.4.1 Extracción de ADN.....	51
2.2.4.2 Estandarización de la temperatura de hibridación de los cebadores.....	51
2.2.5 Extracción de ARN.....	52
2.2.6 Tratamiento con la enzima ADNsa I.....	53
2.2.7 Síntesis de ADNc.....	53
2.2.8 Estudio de la expresión del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero.....	53
2.2.9 Clonación de los productos obtenidos del estudio de expresión del gen tipo <i>NPR1</i> .....	55
2.2.10 Análisis de los productos secuenciados.....	56
2.3 RESULTADOS.....	57
2.3.1 Plantas tratadas con ácido salicílico (2.5 mM).....	57
2.3.2 Selección de cebadores.....	57
2.3.3 Estandarización de las condiciones de amplificación.....	58

2.3.4 Extracción de ARN.....	60
2.3.5 Análisis de expresión.....	62
2.3.6 Análisis de los productos amplificados durante el estudio de expresión del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero.....	64
2.4 DISCUSIÓN.....	67
2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

### CAPÍTULO III

#### ASLAMIENTO DEL EXTREMO 3' TERMINAL DEL GEN TIPO *NPR1* EN COCOTERO

3.1 INTRODUCCIÓN.....	75
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	77
3.2.1 Diseño de cebadores.....	77
3.2.2 Ubicación de los cebadores en el fragmento del gen tipo <i>NPR1</i> aislado de ADN genómico de cocotero.....	78
3.2.3 Análisis de los cebadores en el GeneBank.....	78
3.2.4 Predicción del extremo 3' terminal del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero.....	78
3.2.5 Extracción del ARN.....	79
3.2.6 Síntesis de ADNc.....	79
3.2.7 Aislamiento del extremo 3' terminal del gen tipo <i>NPR1</i> (Fragmento 1)...	80
3.2.7.1 Primera reacción de amplificación (GeneRacer PCR).....	80
3.2.7.2 Segunda reacción de amplificación (GeneRacer-Nested PCR).....	81
3.2.8 Aislamiento del extremo 3' terminal del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero (Fragmento 2).....	83
3.2.9 Clonación de los fragmentos amplificados del extremo 3' terminal.....	83
3.2.10 Análisis y obtención de las ORF's de los fragmentos clonados.....	84
3.2.11 Alineamiento e identificación de los dominios conservados del extremo 3' terminal del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero.....	84
3.2.12 Análisis filogenético del extremo 3' terminal del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero.....	84

3.3 RESULTADOS.....	85
3.3.1 Cebadores diseñados para el aislamiento del extremo 3' terminal del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero.....	85
3.3.2 Posición de los cebadores en el fragmento del gen tipo <i>NPR1</i> aislado del ADN genómico.....	85
3.3.3 Análisis de los cebadores en el Genebank.....	86
3.3.4 Deducción del extremo 3' terminal del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero.....	87
3.3.5 Extracción del ARN y síntesis de ADNc.....	88
3.3.6 Aislamiento del extremo 3' terminal del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero (Fragmento 1).....	89
3.3.6.1 Primera reacción de amplificación (GeneRacer PCR).....	89
3.3.6.2 Segunda reacción de amplificación (GeneRacer-Nested PCR).....	89
3.3.7 Aislamiento del extremo 3' terminal del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero (Fragmento 2).....	90
3.3.8 Clonación de los fragmentos amplificados del extremo 3' terminal.....	91
3.3.9 Análisis de la secuencia de los fragmentos amplificados del extremo 3' terminal.....	93
3.3.10 Alineamiento de los marcos de lectura abierto (ORF's) de los extremos aislados.....	96
3.3.11 Análisis del extremo 3' terminal de la proteína tipo <i>NPR1</i> de cocotero..	98
3.3.12 Alineamiento e identificación de los dominios conservados del extremo aislado.....	100
3.3.13 Análisis filogenético.....	102
3.4 DISCUSIÓN.....	104
3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

#### CAPITULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL.....	111
4.2 CONCLUSIONES.....	115
4.3 PERSPECTIVAS.....	116
4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

---

**Listado de Abreviaturas**

---

<b>SA</b>	Ácido salicílico
<b>ETI</b>	Inmunidad activada por efectores
<b>PTI</b>	Inmunidad activada por PAMP's
<b>ALC</b>	Amarillamiento letal del cocotero
<b>HR</b>	Respuesta hipersensitiva
<b>NPR1</b>	No expresor de genes <i>PR-1</i>
<b>SAR</b>	Resistencia sistémica adquirida
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto
<b>PAMP's</b>	Patrones moleculares asociados a patogénesis
<b>PRR</b>	Receptores de patrones de reconocimiento
<b>INA</b>	Acido 2,6-Dicloroisonicotínico
<b>avr</b>	Genes de avirulencia
<b>PCD</b>	Muerte celular programada
<b>TMV</b>	Virus mosaico del tabaco
<b>MeSA</b>	Metil salicilato
<b>JA</b>	Acido jasmónico
<b>MeJa</b>	Metil jasmonato
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribunocleico
<b>ADNc</b>	AND complementario
<b>ARN</b>	Ácido ribunocleico
<b>RGC's</b>	Candidato a genes de resistencia
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetil trimetilamonio

---



## ÍNDICE DE FIGURAS

## CAPÍTULO I

<b>Figura 1.1.</b> Mapa representativo del área de dispersión del Amarillamiento Letal en México.....	9
<b>Figura 1.2.</b> Esquema representativo de los estadios durante el desarrollo de la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero.....	9
<b>Figura 1.3.</b> Agente causal del AL, son los fitoplasmas, los cuales poseen un diametro aproximado de 142-295 nm y 1-16 $\mu$ m de longitud. En cuanto al posible vector se ha catalogado a <i>Myndus crudus</i> .....	10
<b>Figura 1.4.</b> Modelo evolutivo “Zig-Zag” representa el proceso evolutivo que ha existido actualmente entre plantas y patógenos.....	13
<b>Figura 1.5.</b> Tipos de receptores celulares con sus respectivos dominios conservados LRR y NBS.....	14
<b>Figura 1.6.</b> Modelo evolutivo del mecanismo de resistencia en plantas.....	15
<b>Figura 1.7.</b> Respuesta hipersensible. A. Proceso de reconocimiento y activación de HR. B. Lesiones necróticas formadas por la muerte celular programada (PCD).	17
<b>Figura 1.8.</b> El mecanismo de defensa SAR es determinado por una primera infección en la cual se observa mayor daño (A) y posteriormente en una segunda infección en la cual se observa un menor daño (B).....	18
<b>Figura 1.9.</b> Análisis de expresión de genes <i>PR</i> en respuesta a tratamiento con SA o INA.....	21
<b>Figura 1.10.</b> Mapa genético utilizado para la clonación del gen <i>NPR1</i> .....	22
<b>Figura 1.11.</b> Modelo estructural de la proteína <i>NPR1</i> . Se observa los residuos Cys 82 y Cys 216, junto con el dominio repetido de ankirina y el dominio BTB/POZ.....	23
<b>Figura 1.12.</b> Esquema que representa la ruta de señalización del SA y la activación con <i>NPR1</i> .....	24
<b>Figura 1.13.</b> Árbol filogenético de la familia de genes tipo <i>NPR1</i> en <i>Arabidopsis</i> ..	27
<b>Figura 1.14</b> Grafica que muestra los niveles de peróxido de hidrógeno. Se observa que el nivel de peróxido de hidrógeno, fue aumentando al momento de que los callos fueron tratados con quitosano (Lizama <i>et al.</i> , 2007).....	29

<b>Figura 1.15.</b> Se observa que a una concentración de 2.5 mM de SA la planta de coco sufrió menos daño después de ser inoculado con el hongo patógeno <i>Phytophthora capsici</i> .....	30
<b>Figura 1.16.</b> Alineación múltiple de la secuencia de la proteína de NPR1 de cocotero con otras especies (banano, soya y arroz).....	31
<b>Figura 1.17.</b> Árbol filogenético en el cual se observan los clados en los que fueron agrupados las secuencias aisladas en ese trabajo.....	32
<b>Figura. 1.18.</b> Diagrama de cada uno de los pasos realizados durante el trabajo de investigación.....	34

## CAPITULO II

<b>Figura 2.1.</b> Imagen representativa de una de las palmas que fueron sometidas a una concentración de 2.5 mM de ácido salicílico.....	48
<b>Figura 2.2.</b> Representación esquemática del proceso de tratamiento de plantas con SA. A). Se observa una planta antes de ser sometida al tratamiento con SA. B). Cajetero conteniendo medio de cultivo líquido Y3 con una concentración de 2.5 mM de SA estéril. C). Imagen representativa de una la planta durante el tiempo sometido al tratamiento.....	49
<b>Figura 2.3.</b> Esquema representativo de la cosecha de los tejidos. A). Aspecto de la planta hasta antes de ser cosechado; B). Proceso de cosecha de cada uno de los diferentes tejidos. C). Contenedor con nitrógeno líquido en el cual eran puestos los tejidos cosechados antes de ser almacenados a -80°C.....	50
<b>Figura 2.4.</b> Imagen representativa que muestra los principales puntos de referencia del vector de clonación pGEM-T Easy.....	55
<b>Figura 2.5.</b> Fraccionamiento de ADN genómico de cocotero. Imagen representativa de un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio que muestra el ADN extraído para la estandarización de los cebadores. Carriles 1, 2, 3. Réplicas del ADN extraído.....	58
<b>Figura 2.6.</b> Imagen que muestra los productos obtenidos con el cebador NPR1-a, empleando las diferentes temperaturas de hibridación. Carril 1. Temperatura de 62°C; Carril 2. Temperatura de 60°C; Carril 3. Temperatura de 58°C y Carril 4. Temperatura de 56°C. M. Marcador molecular de 100 pb. La flecha indica, el producto que mostró la mejor temperatura de hibridación.....	59
<b>Figura 2.7.</b> Imagen que muestra el producto obtenido con el cebador NPR1-b. Carril 1. Temperatura de 62°C; Carril 2. Temperatura de 60°C; Carril 3. Temperatura de 58°C; Carril 4. Temperatura de 56°C y M. Marcador molecular de 1 kb.....	59

- Figura 2.8.** ARN extraído con distintos protocolos. Carril 1. Protocolo empleando el reactivo Trizol; Carril 2. Empleando el reactivo Concert; Carril 3. Empleando el reactivo CTAB; Carril 4. Empleando el Kit comercial; Carril 5. Protocolo combinado de CTAB/Kit..... 61
- Figura 2.9.** ADNc de plantas tratadas con SA y sintetizado con la enzima SuperScript II. Carril 1 y 8. Marcador de 1kb; Carril 2. 0 Horas; Carril 3. 24 Horas; Carril 4. 48 Horas; Carril 5. 72 Horas; Carril 6. 96 Horas; Carril 7. 120 Horas..... 61
- Figura 2.10.** Nivel de transcritos del gen tipo *NPR1* en tejido de hoja de plantas de *C. nucifera*. Los amplicones fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. A. Primer ensayo, en el recuadro rojo señala que a las 72 h hubo un mayor nivel de transcritos comparado con las 0 h y 48 h; B. Segundo ensayo, el recuadro rojo señala los tiempos en el cual el nivel de transcrito del gen tipo *NPR1* fue mayor; C. Tercer ensayo; el recuadro rojo señala los tiempos donde el nivel del transcrito del gen tipo *NPR1* fue mayor comparado con los controles; los recuadros amarillos señalan aumento del nivel de transcrito del gen tipo *NPR1* igual que en el segundo ensayo. El tamaño esperado del amplicón del gen tipo *NPR1* es de 189 pb y 18S: 190 pb. Las Flechas en rojo, indican los dos fragmentos clonados..... 63
- Figura 2.11.** Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los dos fragmentos clonados, productos de la amplificación del ADNc, del gen tipo *NPR1* de coco... 64
- Figura 2.12.** Alineamiento de los dos productos secuenciados, productos amplificados durante el estudio de expresión del gen tipo *NPR1* de coco. a) Alineamiento de nucleótidos. b). Alineamiento de aminoácidos. PA. Producto A; PB. Producto B..... 65
- Figura 2.13.** Resultados del análisis de la secuencia de aminoácidos del Producto A (86 aa). La secuencia de aminoácidos se ubica en el Dominio Repetido de ankirina del gen *NPR1*..... 66

### CAPITULO III

- Figura 3.1.** Imagen representativa de la posición de los tres cebadores diseñados (Forward), dentro de la secuencia del fragmento inicial del gen tipo *NPR1* de cocotero (amplicón de 217pb) y posteriormente fueron empleados en el aislamiento del extremo 3' terminal..... 86
- Figura 3.2.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos homólogos de *NPR1* de banano, arroz y coco. El rectángulo rojo, muestra el sitio donde la secuencia de coco (69aa) se alinea con estas secuencias, mostrando así, el tamaño aproximado de los extremos terminales por aislar..... 87
- Figura 3.3.** Muestra de ARN empleado para el aislamiento del extremo 3' terminal. a) ARN total después de ser descongelado (96 horas) con presencia de

ADN contaminante. b) ARN previamente tratado con ADNsA I (Ambión). c) ADNc sintetizado con la enzima Cloned AMV RT empleando 3 µg de ARN total.....	88
<b>Figura 3.4.</b> Productos amplificados con el cebador NPR1-A. Carril 1. Muestra el producto amplificado con una temperatura de hibridación de 70°C; Carril 2. Marcador de molecular de 100 pb. Carril 2. Producto amplificado con una temperatura de hibridación de 72°C.....	89
<b>Figura 3.5.</b> Productos de la segunda amplificación, empleando un gradiente de temperatura para ambos cebadores (NPR1-B y NPR1-C). a) Fragmentos amplificados con el cebador NPR1-B de aproximadamente 500 pb, la flecha, indica el fragmento clonado. b) Fragmento amplificado con el cebador NPR1-C, también de aproximadamente 500 pb.....	90
<b>Figura 3.6.</b> Fragmentos de la primera reacción de amplificación con el cebador NPR1-B. Carril 1. Marcador molecular de 100 pb; Carril 2. Fragmento amplificado de aproximadamente 1,200 pb (flecha roja) con el cebador NPR1-B. Las flechas negras, señalan posibles fragmentos inespecíficos.....	90
<b>Figura 3.7.</b> Producto de la segunda amplificación. Carril 1. Marcador molecular de 100 pb; Carril 2. Fragmento amplificado de aproximadamente 1,100 pb (flecha roja) con el cebador NPR1-C.....	91
<b>Figura 3.8.</b> Imagen representativa de los tres fragmentos purificados. Carril 1. Marcador molecular de masas (High mass); Carril 2. Primer fragmento purificado (500 pb); Carril 3. Segundo fragmento purificado (1,200 pb) y Carril 4. Tercer fragmento purificado (1,100 pb).....	92
<b>Figura 3.9.</b> Productos de PCR con los cebadores M13. Carril 1. Marcador molecular de 100 pb; Carril 2. Producto que contiene el fragmento 1 (500 pb); Carril 2. Producto que contiene el fragmento 2 (1,200 pb); Carril 3. Producto que contiene el fragmento 3 (1,100 pb).....	92
<b>Figura 3.10.</b> Concentración de los plásmidos extraídos los cuales contienen los fragmentos de interés. Carril 1. Plásmido con el fragmento 1 (500 pb); Carril 2. Plásmido con el fragmento 2 (1,200 pb); Carril 3. Plásmido con el fragmento 3 (1,200 pb) y Carril 4. Marcador de Masas Highmass.....	93
<b>Figura 3.11.</b> Secuencia de nucleótidos de los tres fragmentos aislados del extremo 3' terminal del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero.....	94
<b>Figura 3.12.</b> Marcos de lectura abierto de los fragmentos aislados del gen tipo <i>NPR1</i> .....	96
<b>Figura 3.13.</b> Alineamiento de los tres marcos de lectura abierto del extremo 3' terminal aislado. a) alineamiento de la secuencia del Fragmento 2 con la secuencia del Fragmento 3; b) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del Fragmento 1 con la secuencia del Fragmento 3; c) Secuencia final de aminoácidos aislado (251aa), mediante la unión las secuencias de los tres fragmentos.....	97

- Figura 3.14.** Secuencia final de aminoácidos del extremo 3' terminal aislado. a) Secuencia de aminoácidos del nuevo fragmento aislado de extremo 3' terminal; b) Secuencia inicial de aminoácidos (Narváez, 2010. Tesis de Maestría; c) Secuencia total de aminoácidos del extremo 3' terminal del gen tipo *NPR1* de coco, producto de la unión de la secuencia nueva con la secuencia inicial. aa. Aminoácidos..... 98
- Figura 3.15.** Esquema que muestra los resultados del análisis de la secuencia final de aminoácidos del extremo 3' terminal aislado del gen tipo *NPR1* de cocotero empleando el programa BLASTP..... 99
- Figura 3.16.** Imagen representativa que muestra el tamaño del fragmento aislado del gen tipo *NPR1* de cocotero, comparado con la proteína completa de *NPR1*. a). Muestra los dominios conservados de la proteína *NPR1* completa. b). Muestra el fragmento aislado del gen tipo *NPR1* de la palma de cocotero.. 99
- Figura 3.17.** Alineamiento de secuencias de *NPR1* de arábidopsis, banano, arroz y coco, empleando el programa BOXSHADE ([http://www.ch.embnet.org/software/box\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/box_form.html)). Los aminoácidos idénticos son sombreados en negro y las sustituciones conservadas en gris. Las proteínas *NPR1*, poseen dos dominios conservados, el dominio BTB/POZ, señalado dentro un rectángulo azul de líneas punteadas y el dominio repetido de ankirina, señalado dentro un rectángulo rojo (4 repeticiones, señalados con líneas negras). Los aminoácidos requeridos para la localización nuclear de *NPR1* en arábidopsis son señalados con triángulos rojos. Los residuos Cys82 y Cys216 son señalados por rectángulos verdes. Los aminoácidos cambiados en la mutante *npr1-1* (H), *npr1-2* (C) y *nim1-4* (R), participan en la transactivación, son señalados por dos triángulos verdes y uno rojo..... 101
- Figura 3.18.** Árbol filogenético Neighbor-Joining, realizado con 35 secuencias homólogas de *NPR1* de diferentes especies de plantas. Secuencias homólogas de *NPR1* de arroz, arábidopsis y papaya son señaladas en cuadros azules, verdes y naranjas, respectivamente. También se observa el nombre de las especies y el número de accesión para las otras secuencias homólogas de *NPR1*. Se señala en letra negrita y en triángulo rojo la secuencia tipo *NPR1* aislada de la palma de cocotero. El número en los clados indica el porcentaje obtenido del análisis con un Bootstrap de 1000 réplicas. Solo los aminoácidos a partir del dominio de ankirina fueron considerados para este análisis filogenético. 103



## ÍNDICE DE CUADROS

### CAPÍTULO I

<b>Cuadro 1.1.</b> Clasificación taxonómica de la palma de coco.....	7
<b>Cuadro 1.2.</b> Familias de genes <i>PR</i> , que se han visto se encuentran involucradas en respuestas de defensa.....	26
<b>Cuadro 1.3.</b> Familias de genes tipo <i>NPR1</i> , que han sido caracterizados en otras especies de plantas.....	28
<b>Cuadro 1.4.</b> Especies de plantas en las cuales se ha sobreexpresado el gen <i>NPR1</i> .....	28

### CAPÍTULO II

<b>Cuadro 2.1.</b> Condiciones empleadas para el ensayo del estudio de la expresión semicuantitativa del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero.....	49
<b>Cuadro 2.2.</b> Mezcla de reacción para el análisis de expresión del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero.....	54
<b>Cuadro 2.3.</b> Condiciones de temperatura empleadas para la amplificación del gen <i>NPR1</i> de coco, durante el estudio de la expresión semicuantitativa.....	49
<b>Cuadro 2.4.</b> Características de los dos cebadores seleccionados para el estudio de expresión del gen tipo <i>NPR1</i> de cocotero.....	57
<b>Cuadro 2.5.</b> Resultados del análisis del cebador <i>NPR1F-a</i> con el programa BLAST.....	58

### CAPÍTULO III

<b>Cuadro 3.1.</b> Condiciones para la preparación de la mezcla de la primera reacción para el aislamiento del extremo 3' terminal.....	80
<b>Cuadro 3.2.</b> Condiciones de temperatura empleadas para la primera reacción de amplificación del extremo 3' terminal.....	81
<b>Cuadro 3.3.</b> Condiciones empleadas para la preparación de la mezcla en la segunda reacción de amplificación del extremo 3' terminal.....	82
<b>Cuadro 3.4.</b> Condiciones de temperatura empleadas para la segunda reacción de amplificación del extremo 3' terminal.....	82
<b>Cuadro 3.5.</b> Características de los cebadores empleados para el aislamiento del extremo 3' terminal del gen tipo <i>NPR1</i> .....	85

<b>Cuadro 3.6.</b> Resultados del análisis de los tres cebadores con la base de datos del GenBank ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ).....	86
<b>Cuadro 3.7.</b> Secuencias empleadas como referencia para determinar el tamaño de los extremos 3' y 5' terminales del gen tipo <i>NPR1</i> de coco. El sombreado gris, muestra el tamaño del fragmento aislado del ADN genómico y las partes no sombreadas, muestran los tamaños aproximados de los extremos faltantes.....	88
<b>Cuadro 3.8.</b> Porcentajes de identidad de los fragmentos aislados y analizados con el programa BLASTN del NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> ).....	95

**RESUMEN**

México ocupa el sexto lugar en producción de coco a nivel mundial y el segundo en producción de copra a nivel del Continente Americano, por lo que es una importante fuente de empleo para México y otros países del mundo. Sin embargo, el cocotero es susceptible a diferentes plagas y enfermedades, tales como el Amarillamiento Letal (AL), considerada la principal enfermedad que ataca a este cultivo. Las plantas al igual que los seres vivos, poseen mecanismos de defensa que ayudan a contrarrestar los efectos de las enfermedades ocasionados por patógenos. La resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés), es un mecanismo de defensa que brinda resistencia a la planta ante una amplia gama de microorganismos patogénicos como; virus, bacterias, hongos, entre otros. Esta resistencia es mediada por el ácido salicílico (SA, por sus siglas en inglés), el cual induce la síntesis y activación del gen *NPR1* (No expresivo de genes *PR-1*), considerado como el regulador maestro de SAR. Hasta la fecha, se han reportado dos estudios sobre la posible presencia del mecanismo de defensa SAR en cocotero. El primero, reporta un incremento en la actividad de las 1,3  $\beta$ -glucanasas en callos de cocotero tratados con quitosano (10 mg/mL) y el segundo reporta el aislamiento de un fragmento del gen tipo *NPR1*, a partir de ADN genómico de una planta de cocotero. De acuerdo a estos estudios, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos, evaluar los niveles de expresión del fragmento del gen tipo *NPR1* en plantas de cocotero tratadas con SA (2.5 mM) y aislar el extremo 3' terminal del ADNc del gen tipo *NPR1* de cocotero a partir de una planta tratada con SA. Los resultados mostraron, mayor expresión del fragmento del gen tipo *NPR1* en las plantas tratadas con SA en comparación con los controles donde se observó una expresión basal de dicho gen. Posteriormente, se logró el aislamiento del extremo 3' terminal del ADNc del gen tipo *NPR1* de cocotero y mediante el análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos se observó un 81% de identidad con banano y 78% con arroz y maíz, esta secuencia presentó un dominio conservado de ankirina, el cual es característico de la proteína NPR1 de arábido. Por último, el análisis filogenético de esta nueva secuencia aislada de cocotero, mostró homología con las proteínas AtNPR3 y AtNPR4 de arábido, por lo que posiblemente esta nueva proteína aislada podría tener una función similar a dichas proteínas de encontradas en arábido.



**ABSTRACT**

Mexico is the sixth largest producer of coconut in the world and second in production of copra at the American Continent, making it an important source of employment for Mexico and other countries. However, the coconut is susceptible to various pests and diseases, such as lethal yellowing (AL), considered the main disease that attacks the crop. Plants like humans have defense mechanisms that help counteract the effects of diseases caused by phytopathogenic. Systemic acquired resistance (SAR) is a defense mechanism that gives the plant resistance to a wide range of pathogenic microorganisms such as, viruses, bacteria, fungi, among others. This resistance is mediated by salicylic acid (SA), which induces the synthesis and activation of the NPR1 gene (not expressive of genes PR-1), considered the master regulator of SAR. To date, two studies have reported on the possible presence of the SAR defense mechanism in coconut. The first, reports an increase in the activity of 1,3  $\beta$ -glucanases in coconut callus treated with chitosan (10 mg / mL) and the second report the isolation of a type *NPR1* gene fragment, from genomic DNA coconut plant. According to these studies, the present work raised the following objectives, evaluate the expression levels of type *NPR1* gene fragment in coconut plants treated with SA (2.5 mM) and isolate the 3' end of cDNA type *NPR1* gene coconut from a plant treated with SA. The results showed increased expression of type *NPR1* gene fragment in plants treated with SA compared to controls observed where a basal expression of said gene. Subsequently, it was isolated from the 3' terminus of the cDNA type *NPR1* gene coconut, and by bioinformatic analysis of the amino acid sequence was observed a 81% identity and 78% with banana rice and maize, this sequence showed a conserved domain of ankyrin, which is characteristic of the arabidopsis NPR1 protein. Finally, phylogenetic analysis of this new coconut isolated sequence showed homology with proteins of arabidopsis AtNPR3 and AtNPR4, so possibly this new protein isolate may have a function similar to those found in arabidopsis proteins.



## INTRODUCCIÓN

El cocotero es una especie de distribución pantropical, la predominancia de este cultivo se acentúa en las áreas costeras de México y el mundo. La explotación del cocotero es integral, pues cada una de sus partes puede ser utilizada para múltiples aplicaciones desde la construcción hasta la industria química (Punchihewa, 1999). Las plantaciones de cocotero han disminuido su productividad debido a varios factores; aumento en la incidencia de plagas y enfermedades, pobre rendimiento de plantaciones, el uso extensivo de variedades de baja producción y principalmente el envejecimiento de los cultivares los cuales son menos productivos con el paso de los años. Una de las principales amenazas del cultivo de cocotero es la enfermedad del Amarillamiento Letal (AL), que representa una de las más importantes para la región del Caribe por las pérdidas económicas ocasionadas y además que ha devastado grandes poblaciones de este cultivo en México (OIRSA, 2010). El conocimiento de los mecanismos de defensa en las plantas permitiría plantear estrategias para el mejoramiento genético (expresión de genes relacionados, utilización de inductores de respuestas de defensa etc.), y el control de plagas y enfermedades. La resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés) es un mecanismo de defensa inducido que confiere protección contra un amplio número de microorganismos patogénicos, la cual requiere de la molécula señal del ácido salicílico (SA), que activa la proteína NPR1, misma que se une a factores de transcripción (TGA, WRKY, etc.) promoviendo la síntesis y acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) las cuales contribuyen a la resistencia (Durrant and Dong, 2004). Recientemente en un estudio realizado en cocotero, se obtuvo evidencia de la presencia de un gen tipo *NPR1* (Narváez, 2010). Para continuar con este estudio, es importante obtener alguno de los extremos 3' y/o 5' terminales del gen tipo *NPR1* de cocotero, para determinar si este gen se encuentra expresado en niveles basales en la planta o se expresa ante algún factor externo. Por lo que el presente trabajo tiene la finalidad de evaluar la expresión del gen tipo *NPR1* en plantas de cocotero sometidas a un tratamiento con ácido salicílico (2.5 mM) así como de aislar el extremo 3' terminal del ADNc del gen tipo *NPR1* de cocotero.



## CAPÍTULO I

### 1.1 ANTECEDENTES GENERALES

#### 1.1.1 EL COCOTERO (*Cocos nucifera* L.)

##### 1.1.1.1 CARACTERÍSTICAS TAXONÓMICAS

Cuadro 1.1. Clasificación taxonómica de la palma de coco.

<b>Familia</b>	<b>Areaceae (antes Palmaceae)</b>
<b>Nombre científico</b>	<i>Cocos nucifera</i> L.
<b>Nombres comunes</b>	Cocotero, Coco, Palma cocotera, Palma de coco
<b>Etimología</b>	" <i>nucifera</i> " deriva del latín y significa portador de nueces
<b>Lugar de origen</b>	Nativa de las regiones tropicales de Oriente.

Fuente: GESPLAN, 2008.

##### 1.1.1.2 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA

El cocotero es una planta muy longeva, puede alcanzar los 100 años de vida. Tiene un tronco único, alto hasta 20-30 m, con corteza lisa y gris marcada por las cicatrices anulares de las hojas viejas, hojas pinnadas y largas arqueadas de hasta 6m de longitud, floración durante todo el año. Se producen sucesivas oleadas de florecillas seguidas de frutos comestibles ovoides de envoltura fibrosa, fruto monoseminado, drupáceo, mesocarpo fibroso, endocarpo pétreo con 3 poros cerca de la base, endosperma sólido y líquido, con 1-2 kg de masa, es una drupa con epicarpo delgado, liso y de color marrón grisáceo y endocarpo leñoso; siendo ligero puede ser transportado por el mar a grandes distancias, sin que su germinación sea perjudicada. El cocotero es una sola especie con múltiples variedades, diferenciadas básicamente por el color del fruto (amarillo o verde) (GESPLAN, 2008).

### 1.1.1.3 IMPORTANCIA ECONÓMICA

En México, la mayor superficie cultivada con cocotero se encuentra en áreas marginales de los suelos costeros, no obstante, es uno de los cultivos tropicales de mayor importancia económica, cubre una superficie de 100 mil hectáreas de las cuales dependen aproximadamente 50 mil familias que viven directamente del cultivo, además es fuente de ingreso para cerca de 20 mil trabajadores que viven de las labores del proceso de producción del cultivo y de las actividades en la industria de la transformación. Los estados productores de cocotero son Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa y Tabasco ([www.conacoco.com.mx](http://www.conacoco.com.mx), 2008). Sin embargo durante los últimos 10 años la superficie de cocotero ha disminuido a consecuencias tales como la vejez de las plantaciones y los daños causados por plagas y enfermedades, tales como son el anillo rojo, el ataque del mayate prieto y principalmente el Amarillamiento Letal (AL) que ha devastado millones de hectáreas de este cultivo (Harrison y Oropeza, 2008).

### 1.1.2 AMARILLAMIENTO LETAL (AL)

El Amarillamiento Letal (AL) es una enfermedad que afecta principalmente especies dentro de la familia *Arecaceae* (Gobierno del Edo. de Colima, 2005). Es una enfermedad devastadora que afecta al cocotero (*cocos nucífera* L.), así como a otras 38 especies más de palmas (Harrison, *et al.*, 1999), y a una especie no palma, *Pandanus utilis*. El AL ha causado la muerte de cientos de millones de palmas de cocotero en la región del Caribe, América Central y México (Harrison y Oropeza, 2008).

#### 1.1.2.1 DISPERSIÓN

Esta enfermedad fue diagnosticada como tal en Key West (Florida) en 1950 y posteriormente en la región de Miami en 1971, desde donde continúa extendiéndose hacia el norte. Esta enfermedad se observó por primera vez en México en la Isla de Cozumel, Quintana Roo en 1977 (Figura 1.1), pero su presencia fue confirmada cinco años después, mediante microscopía electrónica (Mc Coy *et al.*, 1982). Actualmente, la enfermedad se encuentra en gran parte del Caribe (Jamaica, Gran Caimán, Cuba, República Dominicana, Haití, Bahamas), México, Belice, Florida Texas, y más recientemente en Honduras y Guatemala.



Figura 1.1. Mapa representativo del área de dispersión del Amarillamiento Letal en México

### 1.1.2.2 SÍNTOMAS

Durante el desarrollo de la enfermedad del Amarillamiento Letal, las palmas exhiben los siguientes síntomas visuales: la caída prematura de los frutos (estadio 1), inflorescencia necrótica (estadios 2 y 3), clorosis y senescencia de hojas (estadios 4-6), (Maust *et al.*, 2003). Las hojas adquieren después un color marrón, se desecan y mueren, permanecen colgando por algunos días y finalmente caen, quedando únicamente el tronco desnudo (Figura 1.2) (Mc Coy *et al.*, 1982).



Figura 1.2. Esquema representativo de los estadios durante el desarrollo de la enfermedad del Amarillamiento Letal del Cocotero.

### 1.1.2.3 AGENTE CAUSAL Y VECTOR

El agente causal se descubrió simultáneamente por tres grupos de investigadores en 1972, al observar mediante el microscopio electrónico, la presencia de fitoplasmas en las células del floema de palmas afectadas (Beakbane *et al.*, 1972; Heinze *et al.*, 1972; Plavsic *et al.*, 1972). El agente causal del AL es transmitido por el homóptero *Myndus crudus* de acuerdo a diferentes pruebas realizadas en áreas afectadas por el AL en Jamaica y Florida, donde se observó que la única especie común encontrada en plantaciones de cocotero en ambos países fue *Myndus crudus* (Figura 1.3) (Howard y Mc Coy, 1980). Estos estudios se realizaron en plantas juveniles que fueron aisladas en jaulas en ensayos que duraron más de un año e involucraron decenas de miles de insectos introducidos en las jaulas. El AL fue exitosamente transmitido por el insecto vector *Myndus crudus* en pruebas de transmisión en distintas especies de palmas como: *C. nucifera*, *Veitchia merrillii* y *Pritchardia thusrtonii* (Howard *et al.*, 1983).



**Figura 1.3.** Agente causal del AL, son los fitoplasmas, los cuales poseen un diámetro aproximado de 142-295 nm y 1-16  $\mu\text{m}$  de longitud. En cuanto al posible vector se ha catalogado a *Myndus crudus*.

Recientemente se logró obtener la transmisión de fitoplasmas del AL a plántulas de cocotero en condiciones *in vitro*, utilizando al insecto chupador *Myndus crudus*, esto se llevó a cabo en un sistema que requiere de alrededor de 50 insectos y en experimentos que duraron 4 semanas (CICY, resultados no publicados, 2010). Actualmente, también se ha logrado la transmisión del fitoplasma del AL en palmas de *Pritchardia thusrtonii*, mediante el uso de jaulas en donde estas palmas fueron sometidos a la introducción de una gran cantidad de insectos *Myndus crudus* (CICY, resultados no publicados 2012).

#### 1.1.2.4 CONTROL DEL AMARILLAMIENTO LETAL

Hasta el momento la forma más eficaz para enfrentar al AL es el uso de germoplasma resistente (Been, 1981). Desafortunadamente la identificación de genotipos resistentes de cocotero no es fácil. Para enfrentar a la enfermedad del AL en forma eficaz es necesario contar con métodos ágiles de respuesta y capacidad de propagar en forma masiva y rápida a individuos seleccionados de genotipos resistentes, por lo que ya se cuenta con un protocolo que posee una gran capacidad de multiplicación con base a la embriogénesis somática (Pérez-Núñez *et al*, 2006).

#### 1.1.3 RESPUESTAS DE LAS PLANTAS ANTE PATÓGENOS

Las plantas viven en ambientes complejos e interactúan con un amplio rango de patógenos microbiales con diferentes estilos de vida y estrategias de infección. La velocidad evolutiva de armas entre plantas y sus atacantes proveen plantas con un sistema de defensa altamente sofisticado que, parecido al sistema inmune innato de los animales, reconoce moléculas patógenas y responde mediante la activación de defensas específicas que son directas contra los invasor (Pieterse *et al.*, 2009). El ataque de patógenos es una condición desfavorable para las plantas que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. Las plantas pueden poseer *mecanismos constitutivos* de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra patógenos.

Los mecanismos de resistencia constitutiva se pueden dividir en *Estructurales Constitutivos*, como por ejemplo la presencia de capas gruesas de cutícula, presencia de tricomas, deposición de ceras, entre otros; y *Químicos Constitutivos*, como la acumulación de compuestos tóxicos en las células vegetales. Los mecanismos constitutivos, se basan en los rasgos distintivos de una especie o cultivar particular y generalmente no involucra una respuesta activa del hospedante ante la presencia del patógeno. A diferencia de la defensa constitutiva, los inducidos, dependen de la síntesis de *novo* de compuestos químicos antimicrobianos, cuya síntesis se activa después de un intento de invasión al tejido vegetal por un patógeno para que una planta sea capaz de reconocer de manera eficiente a un patógeno y así activar las respuestas de defensa apropiadas, existe evidencia de receptores localizados en la membrana plasmática de las células vegetales encargadas de activar las respuestas de defensa (García y Lozoya, 2004).

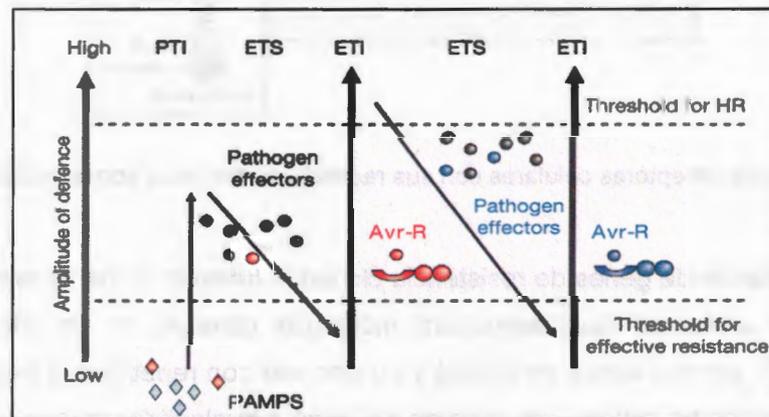
#### 1.1.4 SISTEMA INMUNE DE LA PLANTA

Recientes avances en la investigación de inmunidad vegetal proveen nuevas señales dentro de la subrayada red de señales de defensa. En la naturaleza, las plantas están continuamente amenazadas por un amplio rango de patógenos y plagas dañinos, incluyendo virus, bacterias, hongos, Oomicetos, nemátodos e insectos herbívoros. Cada uno de estos atacantes se aprovecha de altas características especializadas para establecer una relación parasítica con su planta hospedera. De acuerdo a su estilo de vida, los patógenos de plantas son generalmente divididos en biótrofos, necrótrofos y hemibiótrofos (Pieterse *et al.*, 2009). Los patógenos biótrofos, son aquellos que mantienen su hospedero vivo y causan un daño mínimo celular. Establecen contacto íntimamente intracelular y se alimentan de la célula hospedera. Por ejemplo están los mohos y micelios de los hongos, nemátodos endoparasíticos, ciertas bacterias y virus patogénicos. Los patógenos necrótrofos, son aquellos que matan al tejido hospedero mediante la producción de enzimas o toxinas que degradan la pared celular, conduciendo a la maceración del tejido hospedero, muestran un rango hospedero amplio, un ejemplo es la bacteria de raíz *Erwinia*. Los patógenos hemibiótrofos, son aquellos que muestran una fase inicial de biotrófico seguido por una necrotrofo matando a la célula hospedera (Gurr and Rushton, 2005).

##### 1.1.4.1 MODELO “ZIG-ZAG” DEL SISTEMA INMUNE DE PLANTAS

Un punto de vista del sistema inmune en plantas puede ser representado como un modelo de cuatro fases. En la fase 1, los PAMPs (o MAMPs) son reconocidos por PRRs, resultando en inmunidad activada por PAMP's (PTI, por sus siglas en inglés). En la fase 2, los patógenos exitosos despliegan efectores que contribuyen a patógenos virulentos. Los efectores pueden interferir con PTI, resultando en una susceptibilidad activada por efectores (ETS, por sus siglas en inglés). En la fase 3, un efector dado es específicamente reconocido por una de las proteínas NB-LRR, resultando en una inmunidad activada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés). El reconocimiento es indirecto o a través de reconocimiento directo de un efector por NB-LRR. ETI es una acelerada y amplificadas respuestas de PTI, resultando en la resistencia a la enfermedad y, usualmente, una respuestas de muerte celular hipersensible (HR, por sus siglas en inglés) en el sitio de infección.

En la fase 4, la selección natural conduce a patógenos a evitar ETI ya sea por vertimiento o diversificación de genes efectores reconocidos o mediante la adquisición adicional de efectores que supriman ETI. La selección natural resulta en nuevas proteínas R, específicas para que ETI pueda ser activado otra vez. Este modelo que se observa en la siguiente figura (Figura 1.4) ilustra la dinámica coevolución entre plantas y patógenos (Chisholm *et al.*, 2006; Jones and Dangl, 2006).



**Figura 1.4.** Modelo evolutivo de "Zig-Zag", representa el proceso evolutivo que existe actualmente entre plantas y patógenos.

#### 1.1.4.2 TIPOS DE GENES DE RESISTENCIA

Como se describió anteriormente las plantas han evolucionado sistemáticamente mecanismos de defensa capaces de reconocer y responder a una gran variedad de patógenos bacterianos, hongos, Oomicetos y virales, así como manifestar resistencia contra nemátodos e insectos. La evolución de proteínas efectoras secretadas por patógenos vegetales últimamente conduce a la adquisición de proteínas que específicamente reconocen estos patógenos. Hasta la fecha numerosos genes *R* han sido clonados de un amplio rango de especies de plantas. A pesar del amplio espectro de Resistencia impartida por las proteínas *R*, estos productos de genes pueden ser categorizados dentro de dos principales clases basados en la organización de los dominios (Figura 1.5) (Dangl and Jones, 2001).

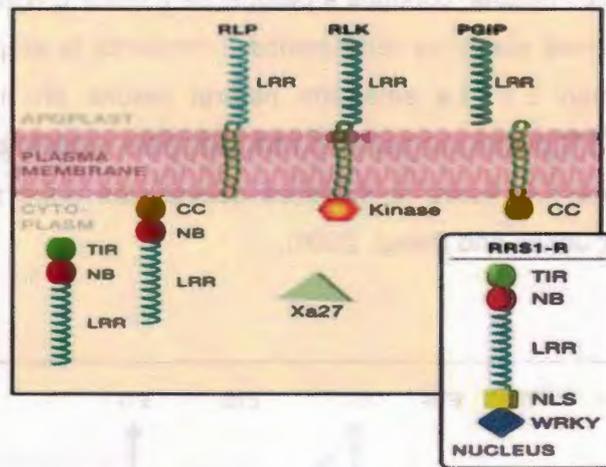


Figura 1.5. Tipos de receptores celulares con sus respectivos dominios conservados LRR y NBS.

La clase más grande de genes de resistencia clonados hasta la fecha es representada por una familia de proteínas cuya estructura molecular consiste en un sitio de unión a nucleótido (NBS, por sus siglas en inglés) y un dominio con repeticiones ricas en leucinas (LRR, por sus siglas en inglés). Los motivos de unión a nucleótidos comparten secuencias similares con las regiones NB de los reguladores de apoptosis tal como CED4 de *C. elegans* y Apaf-1 de humanos (Dangl and Jones, 2001). El dominio LRR es típicamente de 20-30 aminoácidos de longitud y estos motivos han sido identificados en proteínas que van desde los virus a los eucariotas y participan en un rango de procesos de desarrollo de resistencia a enfermedad.

La clase de genes NBS-LRR pueden ser además divididos en Coiled-Coil (CC) NBS-LRR y Toll-Interleukin-1 Receptor (TIR) NBS-LRR de acuerdo a su dominio N-terminal. Dentro la clase NBS-LRR, los miembros mejor caracterizados incluyen RPS2, RPM1 y RPS5, proteínas R de Arabidopsis especifican resistencia a *P. syringae* llevando los efectores bacteriales AvrRpt2, AvrRpm1/AvrB y AvrPphB respectivamente. Solo en Arabidopsis más de 150 proteínas son predichas que son proteínas NBS-LRR y 40 de estos genes son específicos para diferentes líneas de patógenos. Estos genes fueron aislados de 10 especies vegetales tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas (Innes, 2004). Colectivamente, esta clase de proteínas R determina resistencia a patógenos bacterianos, virus, hongos y Oomicetos (Chisholm *et al.*, 2006)

### 1.1.5 RECONOCIMIENTO DEL PATÓGENO

En un ambiente rico en microbios potencialmente dañinos, las plantas sobreviven dependiendo en la eficiente percepción del microbio y las rápidas respuestas de defensa. Contrario a los sistemas inmunes de mamíferos compuestos de células especializadas para defensa (ej: linfocitos), la inmunidad vegetal se basa en la habilidad de cada célula para reconocer patógenos. Un primer nivel de reconocimiento microbial es realizado mediante proteínas membranales llamados receptores de patrones de reconocimiento (PRR, por sus siglas en inglés), el cual percibe firmas moleculares características de toda clase de microbios, llamado patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP; por sus siglas en inglés) (Medzhitov and Janeway, 1997).

Los PAMP son moléculas altamente conservadas entre las diferentes clases de microorganismos, por esta razón los PRR son altamente específicos y sensibles en la identificación de los PAMP's (Göhre y Robatzek, 2008; Benet y Mackey, 2007). La percepción de PAMPs mediante PRRs es común para todos los organismos multicelulares y conduce a una matriz de respuestas de defensa y redistribución de la energía celular en una forma rápida, eficiente y forma multirespuesta, previniendo la entrada del patógeno (Nicaise *et al.*, 2009). En la Figura 1.6, se observa, que los PRR reconocen los PAMP activando PTI, confiriéndole a la planta una resistencia basal para evitar la virulencia del patógeno (Torto-Alalibo *et al.*, 2009; Benet y Mackey, 2007; Pieterse y Van Loon, 2004).

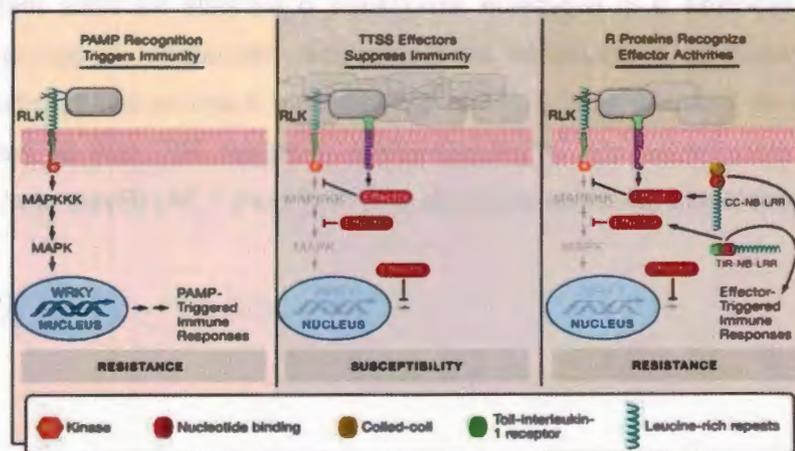
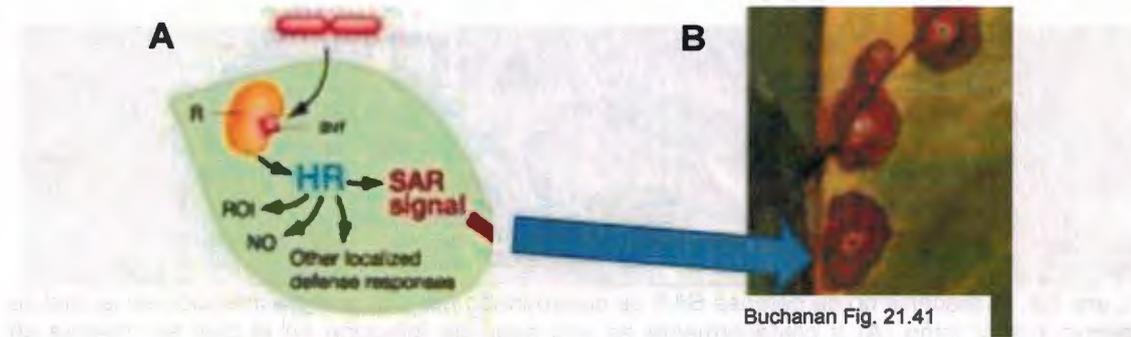


Figura 1.6. Modelo evolutivo del mecanismo de resistencia en plantas.

Frente a PTI, los patógenos exitosos han evolucionado secretando efectores que flanquean actores claves de PTI para interferir con la defensa de las plantas. A su vez, algunos cultivares vegetales han evolucionado proteínas de resistencia (R) para directamente o indirectamente detectar estos efectores (previamente llamados proteínas de avirulencia o *Avr*) de acuerdo a la teoría gen a gen y conduciendo a la inmunidad activada por efectores (ETI, por sus siglas en inglés), el cual es a menudo acompañado por la respuesta hipersensible, una forma de muerte celular programada (Nicaise *et al.*, 2009). La percepción de PAMP también resulta en resistencia sistémica adquirida (Mishina y Zeier, 2007b).

#### 1.1.5.1 RESPUESTA HIPERSENSIBLE (HR)

Las plantas han desarrollado un gran número de mecanismos de defensa contra el ataque de patógenos. El reconocimiento de un patógeno a menudo desencadena una reacción de resistencia localizada, conocido como Respuesta Hipersensible (HR por sus siglas en inglés), que se caracteriza por una rápida muerte celular en el sitio de infección (Hammond *et al.*, 1996). En las interacciones raza-cultivar del tipo incompatible, muchas veces ocurre una alteración en el metabolismo de la planta que se manifiesta con la aparición de lesiones locales necróticas en el sitio mismo de infección (Figura 1.7B). Estas lesiones son el resultado de una muerte celular programada (PCD por sus siglas en inglés) o reacción hipersensible (HR por sus siglas en inglés). La respuesta hipersensible además está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa, incluyendo la acumulación de fitoalexinas, deposición de lignina, suberina y proteínas ricas en hidroxiprolina; y con la producción y acumulación de altas cantidades de proteínas relacionadas con la patogénesis o proteínas PR, que se asocian con el fenómeno de resistencia sistémica adquirida o SAR (Figura 1.7A) (Ryals *et al.*, 1996).



**Figura 1.7.** Respuesta hipersensible. **A.** Proceso de reconocimiento y activación de HR. **B.** Lesiones necróticas formadas por la muerte celular programada (PCD).

A pesar de que HR es un mecanismo sumamente efectivo que produce una reacción de resistencia casi absoluta, aún no existe consenso que defina si la HR es directamente responsable de la resistencia, al privar de tejido vivo y nutrientes al patógeno, o si más bien su acción está basada en la acumulación de compuestos dañinos que simultáneamente matan al patógeno y a las células hospedantes (Heath, 2000b). Sin embargo, cada vez existe más evidencia de que el proceso de HR ocurre como resultado de una necrosis controlada de forma similar a la apoptosis o muerte celular programada conocida en los tejidos animales (Raff, 1998). No obstante, aun quedan preguntas sin responder sobre el tipo de reacción y el programa de muerte celular que deben ser abordadas con técnicas genéticas, bioquímicas y citológicas (Kombrink y Schmelzer, 2001).

### 1.1.5.2 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (SAR)

En los noventas, Ross mostró que las plantas de tabaco sufrían cambios con el virus mosaico del tabaco (TMV, por sus siglas en inglés) posteriormente éstas desarrollaron una mayor resistencia a una segunda infección en los tejidos distales (Figura 1.8A y B) (Ross, 1961). Esta propagación de resistencia por todos los tejidos de la planta fue denominada resistencia sistémica adquirida. SAR es una respuesta de defensa activa, sistémica, de amplio espectro que es asociada a una alta expresión de genes *PR* (Hammerschmidt, 1999b).



**Figura 1.8.** El mecanismo de defensa SAR es determinado por una primera infección en la cual se observa mayor daño (A) y posteriormente en una segunda infección en la cual se observa un menor daño (B).

SAR, es un mecanismo de defensa inducido que confiere una larga protección contra un amplio espectro de patógenos incluyendo virus, bacterias, hongos, Oomicetos (Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997) y fitoplasmas, ya que, actualmente en un estudio en la planta de *Chrysanthemum carinatum* se observó que cuando estas plantas eran asperjadas con 2.4 mM de BTH (análogo sintético de SA), se inducía el mecanismo de defensa SAR, y posteriormente estas plantas mostraba cierta resistencia a fitoplasmas, retrasando el desarrollo de los síntomas de la enfermedad y evitando la multiplicación de los mismos (D'Amelio *et al.*, 2010). SAR requiere la señal molecular del ácido salicílico (SA) y está asociado con acumulación de proteínas relacionadas a patogénesis (PR), las cuales se cree que contribuyen para la resistencia. La inoculación localizada con patógenos virulentos y avirulentos capaces de producir lesiones necróticas puede resultar en la inducción local o sistémica de resistencia. En ambos fenómenos, la planta muestra resistencia local (LAR) o sistémica a un ataque subsecuente del patógeno.

Los primeros estudios acerca del fenómeno SAR se realizaron en plantas de tabaco infectadas con virus (Ross 1961). Sin embargo, se trabaja intensivamente con la planta modelo *Arabidopsis* (Glazebrook *et al.* 1997) y en menor grado con especies monocotiledóneas (Morris *et al.* 1998, Molina *et al.* 1999). La manifestación de SAR de manera sistémica en la planta implica la existencia de algún sistema de señales capaces de transmitirse a través de los tejidos. Las investigaciones realizadas indican que el ácido salicílico es la molécula para la cual se ha obtenido mayor evidencia de estar involucrada en las vías de SAR (Mauch-Mani y Traux, 1998). De esta forma, la inducción de SAR generalmente se correlaciona con incrementos en la acumulación de SA tanto localmente como sistémicamente (Lawton *et al.*, 1995).

La acumulación debida a la síntesis de *novο* de las proteínas PR como parte de los mecanismos de resistencia inducida, está estrechamente asociada a la manifestación de SAR (Ryals *et al.*, 1996, Uknes *et al.*, 1996). Usando la planta modelo *Arabidopsis*, fue descubierto que la vía de Isocorismato es la principal fuente de ácido salicílico en SAR (Durrant and Dong, 2004).

### 1.1.5.3 ÁCIDO SALICÍLICO

Por más de 200 años, la hormona vegetal ácido salicílico (SA, por sus siglas en inglés) ha sido estudiada por su uso medicinal en humanos (aspirina). Sin embargo, su papel principal en plantas, particularmente en defensa contra patógenos, ha llegado a ser evidente durante los últimos 20 años. El SA es uno de los compuestos fenólicos de la amplia variedad relacionados al grupo hidroxilo y sus derivados que son sintetizados por plantas. El SA en particular, influencia en la germinación de semillas, crecimiento celular, respiración, cierre de estomas, etc. Los esfuerzos por identificar la señal responsable para la activación de resistencia local y SAR, revelaron los importantes papeles que tiene el SA y su derivado, metil salicilato (MeSA) (Vlot *et al.*, 2009). En los 90's un posible vínculo entre la acumulación de ácido salicílico y SAR, fue descubierto (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990; Rasmussen, Hammerschmidt and Zook, 1991). Estas primeras observaciones abrieron el campo a numerosas investigaciones y eventos moleculares involucrados en señalización de resistencia inducida. La importancia de SA en la inducción de SAR fue documentado con subsecuentes experimentos en plantas transgénicas sobrepresando un gen salicilato hidroxilasa (*nahG*) (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994). En respuesta al SA, la proteína positiva reguladora NPR1 se mueve al núcleo donde interactúa con factores de transcripción para inducir la expresión de genes de defensa, activando así SAR (Durrant and Dong, 2004).

### 1.1.6 NPR1 (NO-EXPRESIVO DE GENES PR-1)

NPR1 es una proteína reguladora positiva que se activa en respuesta al SA, se mueve a los núcleos donde interactúa con factores de transcripción (*TGA*, *WRKY1*) para inducir la expresión de genes *PR* y activar SAR (Durrant and Dong, 2004). La proteína NPR1 puede mediar el entrecruzamiento entre la vía de señalización del SA y la vía de señalización del ácido jasmónico (JA).

Estudios realizados por diferentes investigadores para identificar componentes que envuelven señales de transducción de SA, utilizan una selección de mutantes en los cuales identificaron múltiples alelos de un gen simple *NPR1/NIMI* (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995, Glazebrook *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1997). Además la caracterización mostró que el papel de NPR1 no es limitar a SAR. NPR1 es importante para restringir el crecimiento de los patógenos en el sitio de infección (Cao *et al.*, 1994, Delaney *et al.*, 1995, Glazebrook *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1997) y es requerido para otra respuesta conocida como Resistencia Sistémica Inducida (ISR), el cual es inducido por bacterias no patogénicas y confiere resistencia a bacterias y hongos en las partes aéreas de la planta. NPR1 también media el entrecruzamiento de las vías de señalización de ácido jasmónico y etileno, estas vías de señalización que confieren resistencia a insectos y algunos patógenos necrótrofos. Como se ha discutido anteriormente, NPR1 reduce la toxicidad por SA y acumula altos niveles endógenos, sugiriendo así, que tiene un papel importante en ambos, destoxificar y regular la biosíntesis de SA. Además, NPR1 tiene otras funciones que no son directamente relacionados con resistencia, tal como la regulación de la división celular y/o endoreduplicación. *NPR1* es expresado totalmente a niveles bajos en las plantas y sus niveles de mRNA en arroz son duplicados o triplicados después de la infección por el patógeno o tratamiento con SA (Ryals *et al.*, 1997).

La expresión de *NPR1* es mediada probablemente por factores de transcripción *WRKY*, ya que mutaciones en los sitios de unión *WRKY* eliminan la expresión de *NPR1*. La sobreexpresión de *NPR1* en *Arabidopsis* mejora la resistencia a *P. Parasitica*, *P. syringae*, y *Erysiphe cichoracearum* sin efectos perjudiciales aparentes en la planta (Cao H *et al.*, 1998; Friedrich *et al.*, 2001). El mejoramiento de la resistencia es probablemente causado por la fuerte y rápida inducción de genes *PR* observados en las líneas sobreexpresadas. Esto indica que cuando los niveles de expresión son altos, la proteína NPR1 podría ser activada para inducir SAR. Estudios funcionales muestran que la acumulación de la proteína NPR1 en el núcleo después del tratamiento con inductores de SAR, es esencial para la inducción de genes *PR* (Kinkema *et al.* 2000). Homólogos de *NPR1* han sido identificados en *Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa*, *Mussa*, *Ipomoea batatas*, *Nicotiana Bentamiana*, *Lycopersicum sculentum*, *Citrus sinensis* y sugieren que su función es conservada a través de especies de plantas.

### 1.1.6.1 CARACTERIZACIÓN Y CLONACIÓN DEL GEN *NPR1*

Fue en el año de 1994 cuando Cao y colaboradores reportan por primera vez la caracterización de una mutante de *Arabidopsis npr1*, la mutante fue identificada de un grupo de plantas transformadas con el constructo BGL2-GUS y mutagenizadas con Etilmetanosulfonato (EMS), luego fueron seleccionados aquellas plantas insensibles al ácido salicílico, así como al 2,6-dicloroisonicotínico (INA). La mutante *npr1* presentó las características, de no ser responsiva a SA e INA, al igual se observó una disminución en los niveles de expresión del gen *PR-5* (5 veces) y *PR-1* (20 veces) comparado con las plantas silvestres (Figura 1.9). Esta fue la razón por la cual a la mutante se le denominó NPR1 o "No expresivo de genes *PR-1*" (Cao *et al.*, 1994).



**Figura 1.9.** Análisis de expresión de genes *PR* en respuesta a tratamiento con SA o INA (Cao *et al.*, 1994).

Posteriormente en el año de 1997, Cao y colaboradores, lograron identificar y clonar al gen *NPR1*, usando un mapa-basado en aproximaciones y fue encontrado que codifica para una nueva proteína con repeticiones de ankirina (Figura 1.10, 1,11). La lesión en un alelo mutante de *npr1* interrumpió la secuencia consenso de Ankirina, sugiriendo que estas repeticiones son importantes para la función de *NPR1*. Además la transformación de la mutante con el gen silvestre *NPR1* no solo completó las mutaciones, sino que también restauró las respuestas a la inducción de SAR con respecto a la expresión de genes *PR* y resistencia a infecciones, también propinó a las plantas transgénicas más resistencia a infecciones por *P. syringae* en ausencia de inducción de SAR (Cao *et al.*, 1997).

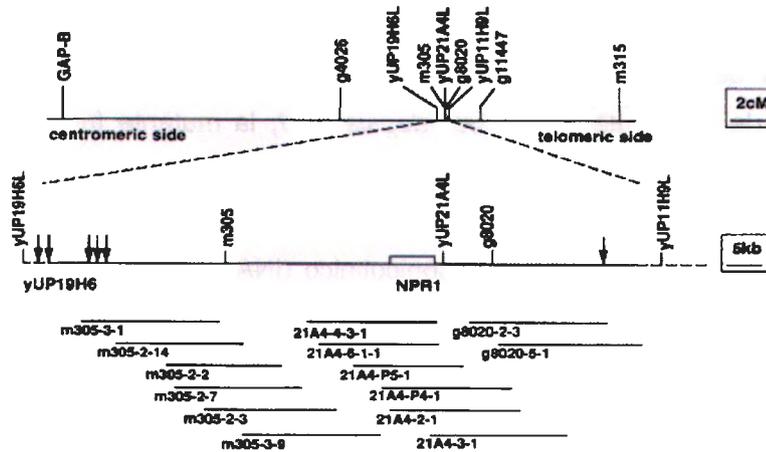
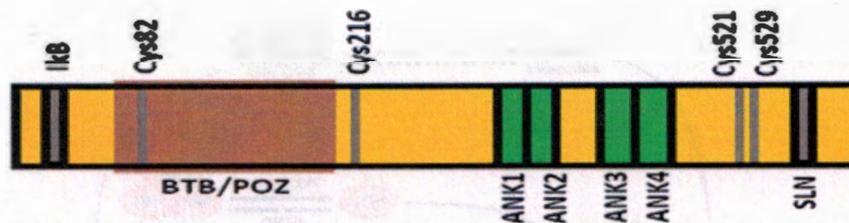


Figura 1.10. Mapa genético utilizado para la clonación del gen *NPR1* (Cao *et al.*, 1997).

### 1.1.6.2 ESTRUCTURA CARACTERÍSTICA DE LA PROTEÍNA NPR1

Varios estudios ha mostrado que la proteína NPR1 (no-expresor de genes *PR-1*, también conocido como *NIM1* y *SAI1*) funciona como un regulador positivo de la expresión de genes *PR* mediado por SA y de la resistencia a enfermedad en *Arabidopsis thaliana* (Zhao *et al.*, 2008; Guan-Shui *et al.*, 2009). El gen *NPR1* codifica una proteína que posee una secuencia de localización nuclear bipartita (NLS) y dos dominios conservados de interacción proteína-proteína: un dominio BTB/POZ (Broad-complex, Tramtrack and Bric-abrac/Pox virus and Zinc Finger) el cual encuentra en el N-terminal, es un dominio característico de proteínas de unión a actina y que está involucrado en la oligomerización de proteínas y en la formación de heterodímeros (Collins *et al.*, 2001).

Al igual este gen funciona como sustrato para ligasas de ubiquitina las cuales son base para el complejo Cullin3 (Spoel *et al.*, 2009) y el otro dominio es un dominio característico de la proteína, es un dominio repetido de Ankirinas (Zhao *et al.*, 2008; Guan-Shui *et al.*, 2009), que le permiten interactuar con factores de transcripción tipo B-Zip (TGA2, TGA3, TGA5 y TGA6) (Rochon *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 1999). Esta proteína presenta también, en el C-terminal un motivo fosfodegrón tipo IκB (Collins *et al.*, 2001), residuos de Cys que controlan el estado de oligomerización y la localización nuclear de la proteína (Rochón *et al.*, 2006), y se ha identificado que la C-terminal es importante para su localización nuclear (Figura 1.11) (Rochon *et al.*, 2006; Kinkema *et al.*, 2000).

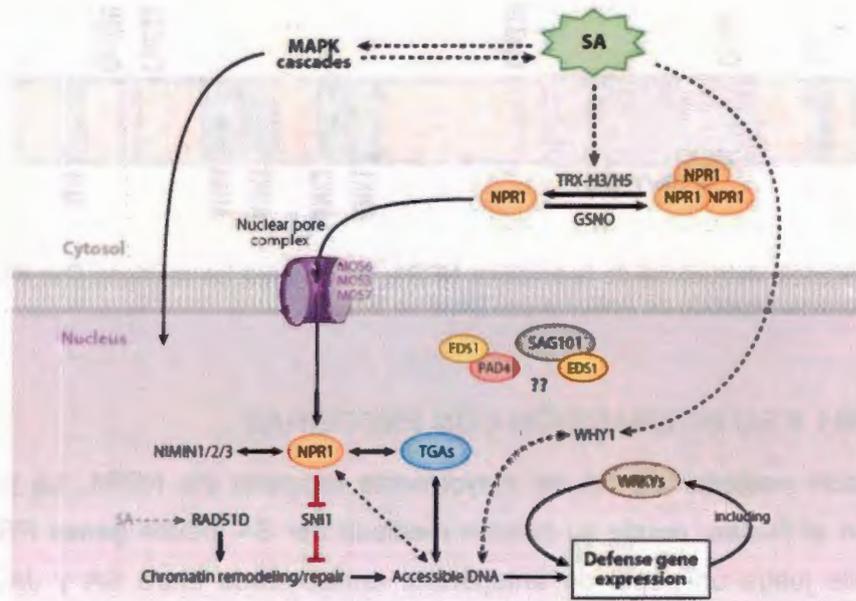


**Figura 1.11.** Modelo estructural de la proteína NPR1. Se observa los residuos Cys 82 y Cys 216, junto con el dominio repetido de Ankirina y el Dominio BTB/POZ.

### 1.1.6.3 NPR1 Y SU INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS

La señalización posterior de SA es mayormente regulada vía NPR1. La proteína se encuentra en el núcleo, donde su función mediada por SA induce genes *PR-1* y en el citosol, donde juega un papel de antagonista entrecruzado entre SA y JA. El NPR1 oligomérico que se encuentra en el citosol se mantiene unido por puentes disulfuro y se monomeriza por cambios inducidos por SA en el estado celular Rédox permitiendo la reducción de dos residuos de cisteína (Cys82 y Cys216) por THIOREDOXIN-H5 (TRX-H5) y/o TRX-H3. Los monómeros de NPR1 son subsecuentemente transportados del citosol al núcleo donde se activa la transcripción de genes de defensa; en algunos reportes se han hecho las mutaciones de estos dos residuos de Cys82 y Cys216 elevando el nivel monomérico y la localización nuclear de NPR1, el cual correlaciona con la constitutiva expresión regulada de *PR-1*. Además, una forma mutante de NPR1 que está constitutivamente monomérico y presente en el núcleo ha mostrado recientemente un aumento en la resistencia.

Sin embargo las plantas que expresaban solo esta forma mutante de NPR1 fueron incapaces de mantener una respuesta propia de SAR dependiente de SA para la rápida degradación de NPR1. Estos descubrimientos sugirieron que tanto la monomerización y oligomerización de NPR1 son requeridos para el completo arreglo de mecanismos de resistencia mediado por SA y provee además una unión entre SA y señales Rédox porque la oligomerización es facilitado por S-Nitrosilación de Cys156 de NPR1 (Figura 1.12).



**Figura 1.12.** Esquema que representa la ruta de señalización del SA y la activación con NPR1 (Vlot et al., 2009).

Se han hecho ensayos de dos híbridos y se han descubierto que existen interacciones directas entre NPR1 y varios miembros de la familia de factores de transcripción TGA de bZIP, así como con otras tres proteínas, NIMIN1, 2 y 3 (NIM1-interacting1, 2, 3). Aunque *NIMIN1, 2 y 3* son inducidos transitoriamente temprano después del tratamiento con SA en *Arabidopsis*, *NIMIN1* parece regular negativamente las señales SA/NPR1; la sobreexpresión de *NIMIN1* resultó en comprometer ETI y SAR, mientras la expresión reducida de algunos genes aumentó la inducción de expresión de *PR-1* por SAR. NPR1 interactúa con cinco diferentes factores TGA de *Arabidopsis* en levadura y más de 7 en plantas. En plantas la interacción entre NPR1 y TGA1 o TGA4 fue detectado únicamente en tratamiento de hojas con SA. La interacción depende de los cambios inducidos por SA para el ambiente redox que resulta en la reducción de dos residuos de cisteína que son conservados en TGA1 y TGA4.

En plantas la interacción entre NPR1 y TGA2 puede ser detectado sin la presencia de SA, pero es mejorado por tratamiento de hojas con SA, mientras la habilidad de TGA2 y TGA3 para activar la transcripción requiere SA y NPR1. Porque *NIMIN1* un complejo con TGA2 o TGA6, NPR1, y elemento promotor *PR-1* en levaduras, esto puede modular la activación

transcripcional dependiente de TGA de genes regulados por SA. En adición a los TGA's, varios miembros de la familia de factores de transcripción WRKY son regulados diferencialmente por señales de SA. La habilidad de SA para inducir expresión de genes vía ruta independiente de *NPR1* puede requerir miembros de la familia de factores de transcripción WHIRLY (WHY); estas proteínas se unen a simples cadenas de ADN en una manera independiente de *NPR1*.

#### 1.1.6.4 PROTEÍNAS RELACIONADAS A PATOGÉNESIS (PR)

Estas proteínas también llamadas proteínas PR, son un grupo variable que se acumulan en las plantas después y durante la infección con patógenos. Las proteínas PR se identificaron inicialmente en tabaco durante la interacción con el virus del mosaico del tabaco. Estas se caracterizan por su bajo peso molecular, resistencia a las proteasas, de localización extracelular y con valores de pH extremos (Van Loon y Van Kammen, 1970). La clasificación más simple se basa en los cinco grupos originalmente identificados para las proteínas PR de tabaco. Sin embargo, éstas han sido identificadas tanto en dicotiledóneas como en monocotiledóneas, lo que ha generado una nueva clasificación (Van Loon y Van Strien, 1999). Algunas de las proteínas PR poseen actividades definidas tal como las PR-2 (1,3  $\beta$ -glucanasas) y PR-3 (quitinasas). Esto sugiere que la alta expresión de las glucanasas y las quitinasas durante la patogénesis tiene una función importante en la defensa contra patógenos que contienen 1,3  $\beta$ -glucano y quitina. De hecho, plantas de trigo y arroz manipuladas genéticamente para sobreexpresar ciertas quitinasas demostraron ser más resistentes a los hongos *Erysiphe graminis* y *Magnaporthe grisea* respectivamente (Bliffeld *et al.*, 1999, Nishizawa *et al.*, 1999).

A pesar de que algunas proteínas PR como las PR-2 y PR-3 poseen actividad antimicrobiana, aún se desconoce la función que tienen el resto de ellas durante las respuesta de defensa a patógenos y particularmente a patógenos virales. En adición se han identificado varios genes clave en respuestas de defensas y, la proteína reguladora de *NPR1* producto del gen *NONEXPRESSER OF PR GENES 1/NONINDUCIBLE IMMUNITY 1 (NPR1/NIM1)* se mueve al núcleo donde interacciona con factores de transcripción para inducir la expresión de genes de defensa (Durrant y Dong, 2004).

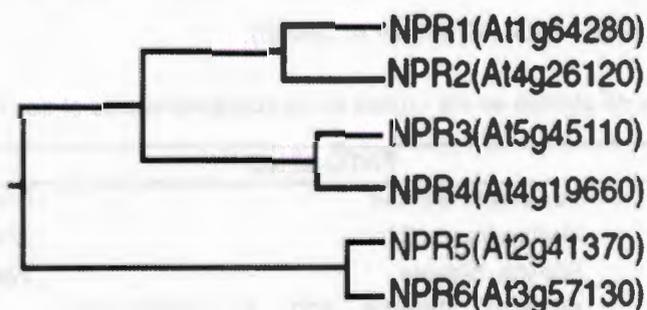
Esto incluye a las proteínas PR de las cuales hasta la fecha se conocen 17 familias PR-1 a PR17, siendo la familia PR-1 una de las más estudiadas (ver cuadro 1.2), es altamente conservada y parece estar representada en cada especie de planta estudiada. Son notables porque se usan como marcadoras de capacidad de defensa mejorada durante la respuesta de SAR inducida por patógenos.

**Cuadro 1.2.** Familias de genes *PR*, que se han visto se encuentran involucradas en respuestas de defensa.

Familia	Tipo de Miembro	Propiedades	Símbolo del gen
PR1	Tabaco Pr-1 <sup>a</sup>	Antifúngico	<i>Ypr1</i>
PR2	Tabaco Pr2	B-1-3 glucanasa	<i>Ypr2, Gns2(Glb)</i>
PR3	Tabaco P Q	Quitinasa tipo II, IV V VI VII	<i>Ypr3, Chia</i>
PR4	Tabaco R	Quitinasa tipo II, III	<i>Ypr4, Chid</i>
PR5	Tabaco S	Tipo-Taumatina	<i>Ypr5</i>
PR6	Tomate Inhibidor I	Inhibidor- Proteinasa	<i>Ypr6, Pis (Pln)</i>
PR7	Tomate P <sub>69</sub>	Endo proteinasa	<i>Ypr7,</i>
PR8	Calabasa Quitinasa	Quitinasa tipo III	<i>Ypr8, Chic</i>
PR9	Tabaco	Peroxidasa	<i>Ypr9, Prx</i>
PR10	Parsley PR1	Tipo-Ribonucleasa	<i>Ypr10</i>
PR11	Tabaco Class V	Quitinasa tipo I	<i>Ypr11, chic</i>
PR12	Radish Rs-AFP3	Defencina	<i>Ypr12</i>
PR13	Arabidopsis THI 2.1	Tionina	<i>Ypr13, Thi</i>
PR14	Cebada LTP4	Proteína de transferencia de lípidos	<i>Ypr14, Lpt</i>
PR15	Cebada OxOa	Oxalato oxidasa	<i>Ypr15</i>
PR16	Cebada OxOLP	Tipo-Oxalato oxidasa	<i>Ypr16</i>
PR17	Tabaco PRp27	Desconocido	<i>Ypr17</i>

### 1.1.6.5 GENES TIPO *NPR1* CARACTERIZADAS EN OTRAS ESPECIES DE PLANTAS

En la especie de *Arabidopsis thaliana* se ha encontrado que el gen *NPR1* pertenece a una pequeña familia génica que comprende a otros cinco miembros *NPR2*, *NPR3*, *NPR4*, *NPR5* y *NPR6* (Figura 1.13) (Zhang *et al.*, 2006; Hepworth *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005). *NPR1* es el único gen de la familia que ha demostrado tener una función como regulador positivo de la SAR y ser dependiente de SA (Malnoy *et al.*, 2007; Makandar *et al.*, 2006; Chern *et al.*, 2005; Fitzgerald *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 1998). *NPR3* y *NPR4* al parecer son reguladores negativos de la SAR y no son dependientes de SA (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo, un estudio reciente en la planta modelo *Arabidopsis*, se descubrió que estos dos genes, funcionan como receptores de SA y se encargan de regular la expresión de *NPR1* en la planta (Fu *et al.*, 2012). Los genes *NPR5* y *NPR6* poseen funciones en los patrones de desarrollo de las zonas distal y proximal de la lámina de la hoja, en los patrones de simetría floral e interviene en la regulación de la abscisión de este órgano. Tanto *NPR5* como *NPR6* no se relacionan con la resistencia a patógenos (Hepworth *et al.*, 2005).



**Figura 1.13.** Árbol filogenético de la familia de genes tipo *NPR1* en *Arabidopsis* (Lui *et al.*, 2005).

Actualmente existen otras especies de plantas en las cuales se han caracterizado familias de genes tipo *NPR1*, como es el caso de *Oriza sativa*, *Populus trichocarpa*, *Vitis Vinifera* y actualmente *Carica papaya* (Cuadro 1.3).

**Cuadro 1.3.** Familias de genes tipo *NPR1*, que han sido caracterizados en otras especies de plantas.

Especie	Proteínas tipo NPR1	Referencias Bibliográficas
<i>Arabidopsis thaliana</i>	6	The <i>Arabidopsis</i> Genome Initiative, 2005
<i>Populus trichocarpa</i>	5	Tuskan <i>et al.</i> , 2006
<i>Vitis vinifera</i>	2	Henanff <i>et al.</i> , 2009
<i>Oryza sativa</i>	5	Yuang <i>et al.</i> , 2007
<i>Carica papaya</i>	4	Peraza-Echevería <i>et al.</i> , 2012

### 1.1.6.6 BIOTECNOLOGÍA DE NPR1

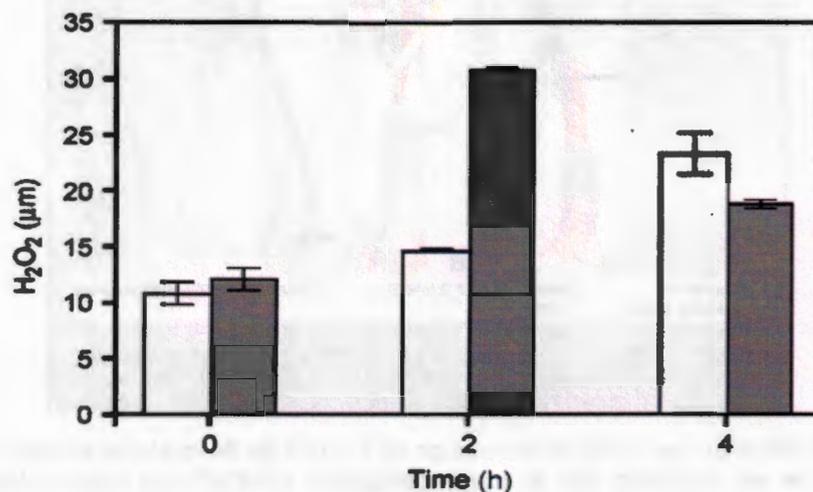
En varios estudios se ha logrado la sobreexpresión del gen *NPR1* en diferentes especies (Cuadro 1.4). Los resultados de la sobreexpresión de este gen en algodón (Parkhi *et al.*, 2010), naranja (Zhang *et al.*, 2010), zanahoria (Wally *et al.*, 2009), canola (Potlakayala *et al.*, 2007), *arabidopsis* (Cao *et al.*, 1998), trigo (Fitzgerald *et al.*, 2004), tomate (Lin *et al.*, 2004) y manzana (Malnoy *et al.*, 2007) han permitido llegar a la conclusión de que el aumento en el número de copias de *NPR1* aumenta la resistencia a bacterias y hongos. En el caso particular de la sobreexpresión de *NPR1* en arroz, donde se observa un incremento en la resistencia a bacterias, aunque se produce un efecto pleiotrópico, este efecto se origina debido a los niveles constitutivamente altos de SA presentes en esta especie (Fitzgerald *et al.*, 2004; Chern *et al.*, 2005).

**Cuadro 1.4.** Especies de plantas en las cuales se ha sobreexpresado el gen *NPR1*.

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

### 1.1.7 MECANISMOS DE DEFENSA EN COCOTERO (*Cocos nucifera* L.)

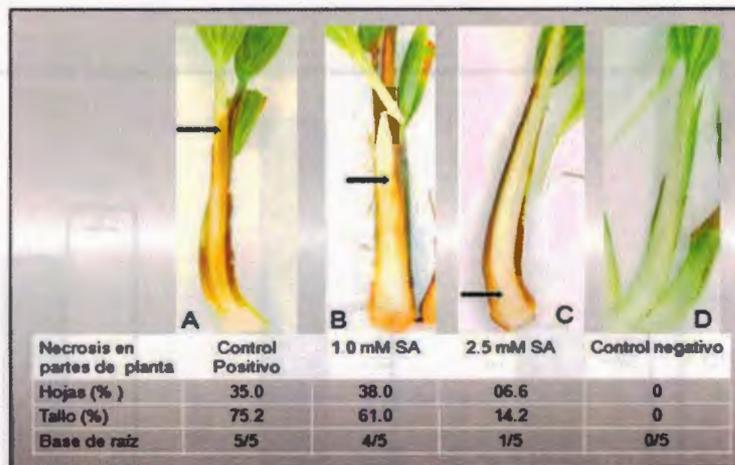
Hasta el momento se conocen dos estudios en los cuales se han reportado la presencia de mecanismos de defensa en palmas de cocotero. En el primer estudio se trataron cultivos *in vitro* de cocotero (callos) con quitosano, el cual funciona como un inductor general de mecanismos de defensa. Los resultados mostraron que el tratamiento con quitosano a una concentración de 10 mg/mL resultó en un incremento en la actividad de *1,3 β-glucanasas*, los cuales son proteínas del grupo PR-2 que han sido aceptadas como parámetros inductivos de defensa en plantas. Además se observó la acumulación de peróxido de hidrogeno, que como se sabe el incremento de este compuesto es uno de los eventos que se desencadenan durante la respuesta de hipersensibilidad (Figura 1.14).



**Figura 1.14.** Grafica que muestra los niveles de peróxido de hidrógeno. Se observa que el nivel de peróxido de hidrógeno, fue aumentando al momento de que los callos fueron tratados con quitosano (Lizama *et al.*, 2007).

Al igual la adición de quitosano modificó diferencialmente la expresión de algunos genes, cuya secuencia de ADN mostró alta similitud a receptores tipo quinasa, proteínas tipo *Verticillium* y sustitutos de oxidasa mitocondrial 1b. La adicción de Ácido salicílico a los callos también modificó abundantemente la transcripción para estos genes, mientras el metil jasmonato (MeJa) no pareció influir en su expresión, lo cual implica que el SA en callos de cocotero puede participar en las respuestas de defensa (Lizama *et al.*, 2007).

En el segundo estudio se evaluó la presencia del mecanismo de defensa SAR en cocotero y su posible inducción mediante la aplicación de SA, para posteriormente realizar pruebas de resistencia con el hongo patógeno *Phytophthora capsici*. Las plantas *in vitro* de cocotero fueron expuestas a concentraciones de 0.1 y 2.5 mM de SA y posteriormente inoculadas con el hongo *P. capsici*. Los resultados mostraron que el sistema de plantas *in vitro* Cocotero-*P. capsici* (patógeno modelo) podría funcionar para evaluar mecanismos de defensa en cocotero. Las plantas *in vitro* no tratadas y las que fueron tratadas con 1 mM de SA, desarrollaron una enfermedad tipo pudrición de cogollo con daño en hojas y tallo al ser inoculadas con el patógeno (Figura 1.15B), mientras que las plantas tratadas con 2.5 mM de SA, presentaron una reducción de estos síntomas (Fig. 1.15C).



**Figura 1.15.** Se observa que a una concentración de 2.5 mM de SA la planta de coco sufrió menos daño después de ser inoculado con el hongo patógeno *Phytophthora capsici* (Narváez, 2010. Tesis de Maestría).

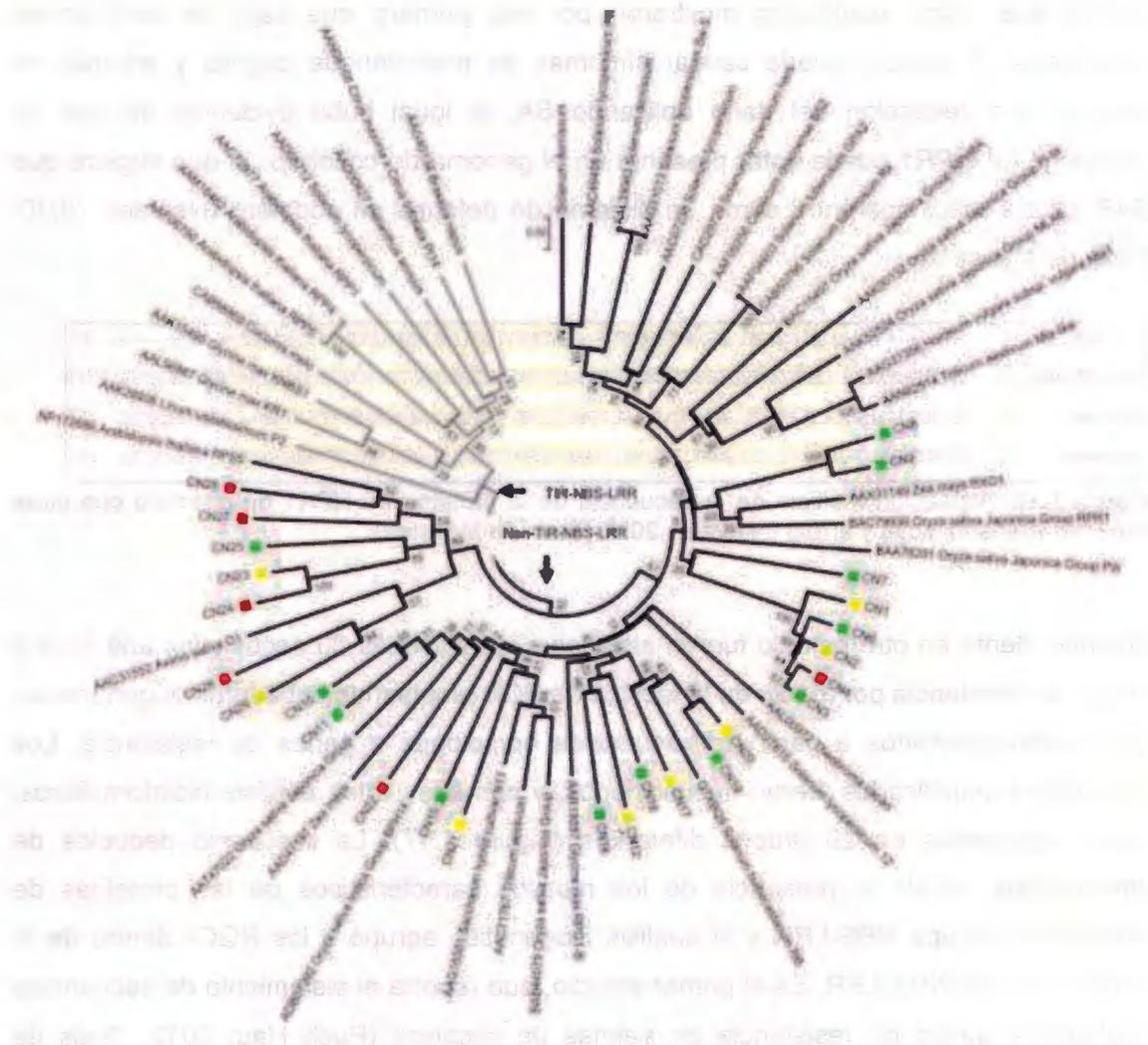
Otro de los objetivos de este estudio fue verificar si un homólogo del gen *NPR1* se encontraba presente en el genoma de cocotero. Para esto, se usó un par de cebadores degenerados diseñadas a partir de secuencias homólogas de *NPR1* de las especies de *Arabidopsis*, Tabaco, Tomate, Arroz y Maíz (F1-AGGCAYTGGAYTCDGATGATGTTGA, R1-TCTYTHCKCATYGCAGCCAKRTGRAG). El resultado fue que se obtuvo la secuencia de un fragmento homólogo del gen *NPR1* de *Arabidopsis* en cocotero, el cual mostró un 82% de identidad con el gen *NPR1* de *Musa* del grupo ABB del cultivar *Dongguan Dajiao*, molécula tipo mRNA (Figura 1.16).

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

<i>C. nucifera</i>	1	-----ALDSDDELVKLLSESNITLDDANALHYAAAYCDKVVVAELLEMGSANVNLNRDRGYTPLHMAAMRKE-----	69
<i>Musa ABB Group</i>	248	DPMLEKRIKRIHRAALDSDDELVKLLNESGVTLDDTYALHYAAAYCDKVIALLDLGSANVNLKNDRGYTPLHAAAMRREPAVIVSLLTKGAS	343
<i>Glycine max</i>	261	DALSLKRITRIHKALDSDDELVKLLNESDITLDEANALHYAAAYCDPKVWSEVGLGLANVNLNRSRGYTVLHIAAMRKEPSIIVSLLTKGAC	356
<i>Oryza sativa</i>	300	DPVHEKRVRIHRAALDSDDELVKLLNESEITLDDANALHYAAAYCDKVVSELLDLRLANLNLKNSRGYTVLHIAAMRREPAIMCLLNGAA	395

Figura 1.16. Alineación múltiple de la secuencia de la proteína de NPR1 de cocotero con otras especies (banano, soya y arroz) (Narváez, 2010. Tesis de Maestría).

Posteriormente en otro estudio fueron aisladas e identificadas 80 secuencias análogas a genes de resistencia por medio de la técnica de PCR empleando cebadores degenerados, que fueron diseñados a partir de secuencias homologas a genes de resistencia. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados, y con base a los análisis bioinformáticos, fueron agrupadas en 29 grupos diferentes (Figura 1.17). La secuencia deducida de aminoácidos, reveló la presencia de los motivos característicos de las proteínas de resistencia del tipo NBS-LRR y el análisis filogenético agrupó a los RGCs dentro de la familia non-TIR-NBS-LRR. Es el primer estudio, que reporta el aislamiento de secuencias análogas a genes de resistencia en palmas de cocotero (Puch Hau, 2012. Tesis de Maestría).



**Figura 1.17.** Árbol filogenético en el cual se observan los clados en los que fueron agrupados las secuencias aisladas en ese trabajo (Puch Hau, 2012. Tesis de Maestría).

## 1.2 HIPÓTESIS

Los niveles de expresión del gen *NPR1* en plantas de cocotero incrementan después de ser tratadas con 2.5 mM de ácido salicílico.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 GENERAL

- Caracterizar la expresión del gen tipo *NPR1* en plantas de cocotero después de ser tratadas con ácido salicílico.

### 1.3.2 ESPECÍFICOS

- Estudiar el curso temporal de expresión del gen tipo *NPR1* en tejidos de hoja de plantas de cocotero después de ser tratadas con 2.5 mM de ácido salicílico.
- Obtener la secuencia del extremo 3' terminal del ADNc del gen tipo *NPR1* a partir del tejido de una planta de cocotero sometida a tratamiento con ácido salicílico 2.5 mM.

1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

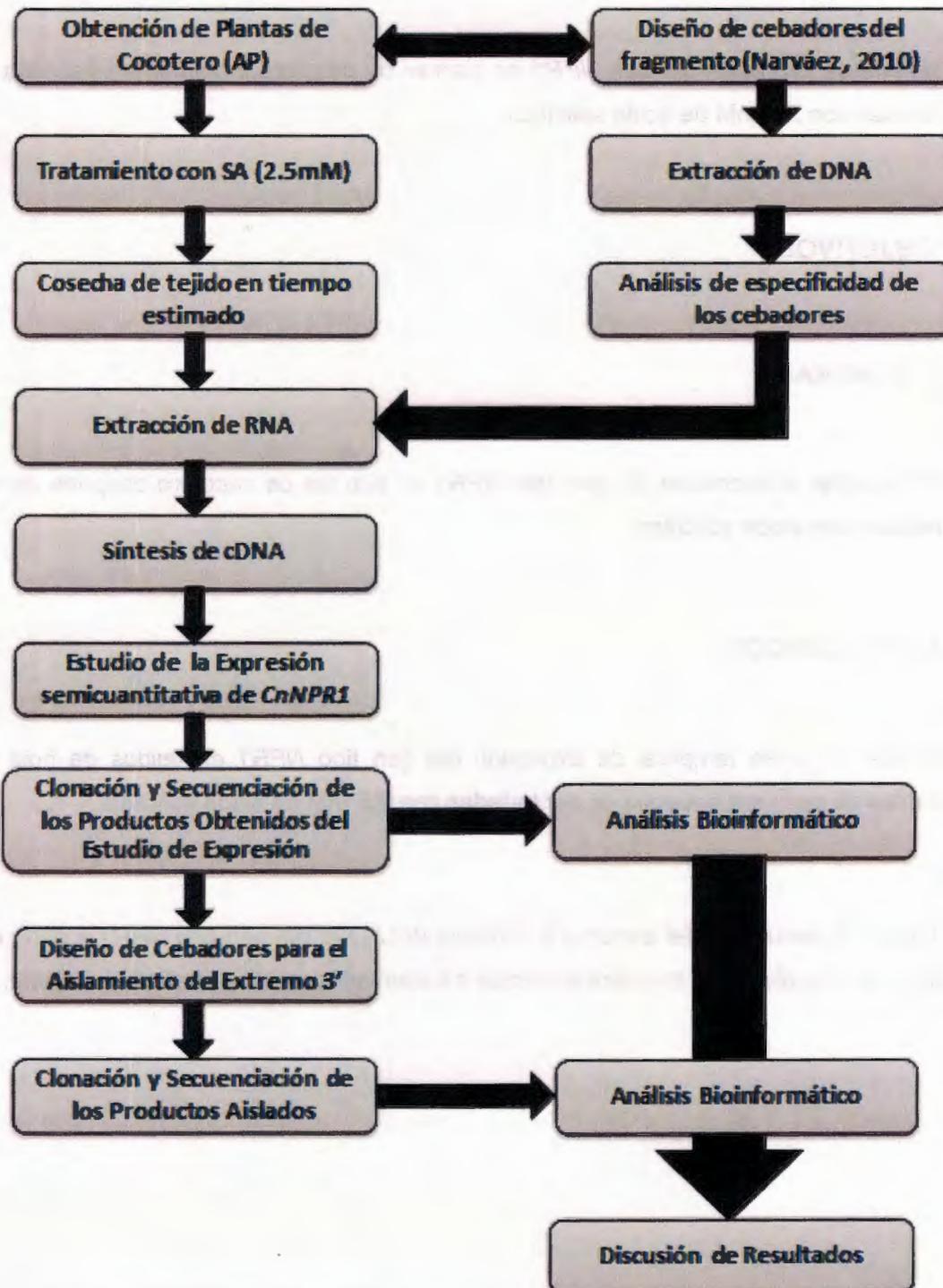


Figura. 1.18. Diagrama de cada uno de los pasos realizados durante el trabajo de investigación.

## 1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashburner, GR., Córdoba, I., Oropeza, C., C.M. Illingworth, R. and Harrison, N.A. (1996). First report of lethal yellowing in Honduras. *Plant Disease*. 80:960.
- Beakbane, A., Slater, C., and Posnette, A. (1972). Mycoplasma in phloem of coconut *Cocos nucifera* L. with yellowing disease. *J. Hort. Sci.* 47: 265-267.
- Been, BO. (1995). Observation on field resistance to lethal yellowing in Jamaica. *Oleagineux* 36: 9-11.
- Bliffeld, M., Mundy, J., Potrykus, I., Futterer, J. (1999). Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. *Theoretical and Applied Genetics* 98:1079-1086.
- Cao H., Bowling S., Gordon A., Dong X. (1994). Characterization of an Arabidopsis mutant that is non-responsive to inducer of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6:1583-1592.
- Cao H., J. Glazebrook, J.D. Clarke, S. Volko y X. Dong (1997). The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*. 88(1), 57- 63.
- Cao H, Li X, Dong X. (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:65 31-36.
- Catinot J, Buchala A, Abou-Mansour E, Métraux J-P. (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochlorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Lett.* 582:473–78.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Stakawicz BJ. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803–14.
- Collins T., J.R. Stone y A.M. Williams. (2001). MINIREVIEW: All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN Domains. *Molecular and Cellular Biology*, 21(11), 3609-3615.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833.
- Dean, J.V., Mills J.D. (2004). Uptake of salicylic acid 2-O-β-D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiol Plant*. 120:603-12.

- Dean, J.V., Mohammed LA, Fitzpatrick T. (2005). The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco cell suspension cultures. *Planta* 221:287–96.
- Deb Roy, S., Thilmony R., Kwack, YB, Nomura K, He SY. (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:9927–32.
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weyman K, Negrotto D, Gaffney T, Gutrella M, Kessmann H, ward E, Ryals J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance response. *Cell* 77:565-577.
- Delaney TP, Friedrich L, Ryals JA. (1995). Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of América 92:6602-6606.
- Dempsey DA, Shah J, Klessig DF. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18:547–75.
- Dominguez E, López J, Castillo R, Ruiz P. (1999). El cocotero (*Cocos nucifera* L.). Manual para la producción en México. INIFAP. Libro técnico. No 6. 133 p.
- Durner J, Shah J, Klessig DF. (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* 2:266–74.
- Durrant W.E. and Dong X. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annu. Rev. Phytopathology.* 42:185-209.
- Escamilla, A., Harrison, N., Núñez, H., Alpizar, L. Córdova, I., Islas-Flores, I., and Oropeza C. (1995). Practical use of ADN probe for detection of lethal yellowing of *Cocos nucifera* L. in Mexico. In: C. Oropeza., WF Howard and GR Ashburner (eds.) lethal yellowing: Research and practical aspect. Pp. 93-99. Kluwer academia publishers. Dordrecht, the Netherlands.
- FAOSTAT. 2000. Estadísticas de producción de cocotero de 1990-1999. Disponible en línea: <http://apps.fao.org>
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology* 9, 275–296.
- Friedrich L, Lawton K, Dietrich R, Willits M, Cade R, Ryals J, (2001). *N1M1* overexpression in Arabidopsis potentiates plant disease resistance and results in enhanced effectiveness of fungicides. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14:1114-24.
- Fu Zheng Qing, Shunping Yan, Abdelaty Saleh, Wei Wang, James Ruble, Nodoka Oka, Rajinikanth Mohan, Steven H. Spoel, Yasuomi Tada, Ning Zheng & Xinnian Dong (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *NATURE.* VOL000.

- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Nerotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryaals J. (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261:754-756.
- García E.P. y Lozoya E.G. (2004). Genes de resistencia a enfermedades en plantas. *Revista, Mexicana de Fitopatología* vol. 22 núm. 003 p 414-422.
- GESPLAN, 2008. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Gobierno de Canarias. Taxonomía de las palmeras susceptibles.
- Glazebrook j, Rogers EE, Ausubel FM. (1996). Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* 143:973-82.
- Glazebrook, J; Rogers, EE; Ausubel, FM. (1997). Use of Arabidopsis for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Review of Genetics* 31:547-569.
- Gobierno del Estado de Colima. (2005). Paquetes Tecnológicos para cultivos Agrícolas, en el estado de Colima. Disponible en línea: seder.col.gob.mx/paquetes/COCO.pdf.*
- Gurr S.J. and Rushton P.J. (2005). Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? *TRENDS in Biotechnology* Vol.23 No.6. Pp. 275-282.
- Gutiérrez CY (2009). Proyecto de desarrollo productivo cadena de valor frutícola. Análisis del mercado para coco. Millennium Challenge Corporation. Pp. 1-6.
- Hammerschmidt, R. (1999b). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55:77-84.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-91.
- Harries H. (1995). Coconut. In: J. Smart and D.W. Simmonds. *Evolution of crop plants*, Second Edition. Logman Scientific & technical. London.351-357.
- Harrison, N. A., Cordova, I., Richardson, P. And Dibonito, R. (1999). Detection and diagnosis of lethal yellowing In: *Cient advances in coconut biotechnology*, Oropeza, C., verdeil, J. L., Ashburner, G. R., Cardefia, R. And Santamria, J. S., Eds.; Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, The Netherlands., pp 183-196.
- Harrison, NA.; Oropeza, C. (2008). Coconut lethal yellowing. In: NA Harrison, GP Rao y C Marcone (Eds.). *Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas*. Studium Press LLC. Houston, USA pp 219-248. Howard, 1995.
- Heath, MC. (2000b). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44:321-334.
- Heinze K., H. Petzold, and R. Marwitz, (1972). Beitrag zur etiologie der todlichen vergiftung der kokospalme. *Phytopathologie Zeitung*. 74:230-237.

- Henanff G.L., T. Heitz, P. Mestre, J. Mutterer, B. Walter y J. Chong. (2009). Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. *BMC Plant Biology*, 9: 54.
- Hennig J, Malamy J, Gryniewicz G, Indulski J, Klessig DF. (1993). Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *Plant J.* 4:593–600.
- Howard F.W., McCoy R.E. (1980). Reduction in spread in mycoplasma-like organism associated lethal decline of the palm *Veitchia merrillii* by use of insecticides. *J. Econ Entomol* 73:268-270.
- Howard, F. W., Norris, R., Thomas, D. (1983). Evidence of transmission of palm yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus*. *Tropical Agric. (Trinidad)* 60:168-171.
- Innes RW. (2004). Guarding the Goods. *New Insights into the Central Alarm System of Plants. Plant Physiology*, Vol. 135, pp. 695–701.
- James W. Tregear, Fabienne Morcillo, Frederique Richaud, Angelique Berger, Rajinder Singh, Suan Choo Cheah, Caroline Hartmann, Alain Rival and Yves Duval. (2002). Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. *JouARNI of Experimental Botany*. Vol. 53, No. 373, pp. 1387-1396.
- Jie-Tang Zhao, Xia Huang, Ya-Ping Chen, Yun-Feng Chen, Xue-Lin Huang. (2008). Molecular cloning and Characterization of an Ortholog of *NPR1* Gene From *Dongguan Dajiao* (*Musa Spp.* ABB). *Plant Molecular Biology Rep.*
- Jones JDG, Dangl JL. (2006). The plant immune system. *Nature* 444:323–29.
- Kinkema M, Fan W, Dong X, (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell* 12:2339-50.
- Klessig DF, Malamy J. (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.* 26:1439–58.
- Kombrink, E; Schmelzer, E. (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European JouARNI of plant Pathology* 107:69-78.
- Lawton, K; Weymann, K; Friedrich, L; Vernooij, B; Uknes, S; Ryals, J. (1995). Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8:863-870.
- Lao Da. (2008). *Bioenergy Forum 2008*, Bangkok, 2008.
- Liu G., E.B. Holub, J.M. Alonso, J.R. Ecker y P.R. Fobert. (2005). An *Arabidopsis* NPR1-like gene, *NPR4*, is required for disease resistance. *The Plant JouARNI* 41(2), 304-318.

- Lizama, UG, Iván A. Estrada-Mota, María Goretty Caamal-Chan, Ramón Souza-Perera, Carlos Oropeza-Salín, Ignacio Islas-Flores, José' Juan Zúñiga-Aguilar (2007). Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 70. Pp. 130–141
- Loake G, Grant M. (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:466–72.
- Malamy J. Carr JP, Klessing DF, Raskin I. (1990). Salicylic acid a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250:1002-1004.
- Mandal S., Nirupama Mallick, Adinpunya Mitra (2009). Salicylic acid-induced resistance to *fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in tomato. *Plant Physiology and Biochemistry.* 47. 642-649.
- Maruyama, K., and Sugano, S. (1994). Oligo-capping. A Simple Method to Replace the Cap Structure of Eukaryotic mARNs with Oligoribonucleotides. *Gene* 138,171-174.
- Mauch-Mani, B; M.traux, JP. (1998). Salicylic acid and systemicacquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany* 82:535-540.
- Maust B. E, F. Espadas, C. Talavera, M. Aguilar, J. M. Santamaría, and C. Oropeza. (2003). Changes in Carbohydrate Metabolism in Coconut Palms Infected with the Lethal Yellowing Phytoplasma. *Phyto.* 93: 976-981.
- Mc Coy, R., Norris, R., Vieyra G., and Delgado S. (1982). México: lethal yellowing disease of coconut palm. *FAO Plant Protection Bulletin.* 30: 79-80.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295–298.
- Métraux JP, Signer H, Ryals J, Ward E, Wyss-Benz M, Gaudin J, Raschdorf K, Schmid E, Blum W, Inverardi B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250:1004-1006.
- Mishina TE, Zeier J (2007b). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant J* 50:500–513.
- Molina, A; G.rlach, J; Volrath, S; Ryals, J. (1999). Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen i n d u c i b l e, but not respond to activators of systemic acquired resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:53-58.
- Morris, SW; Vernooij, B; Titatam, S; Starrett, M; Thomas, S; Wiltse, CC; Frederiksen, RA; Bhanhufalck, A; Julbert, S; Uknes, S. (1998). Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7:643-658.

- Narváez, M. (2010). Tesis de maestría: Inducción de SAR en Plantas de Cocotero Infechadas con *Phytophthora capsici*.
- Nicaise Valerie, Milena Roux, and Cyril Zipfel. (2009). Recent Advances in PAMP-Triggered Immunity against Bacteria: Pattern Recognition Receptors Watch over and Raise the Alarm. *Plant Physiology*. Vol. 150, Pp. 1638-1647.
- Nishizawa, Y; Nishio, Z; Nakazono, K; Soma, M; Nakajima, E; U g a k i ; M; H i b i , T. (1999). Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic Japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. *Theoretical and Applied Genetics* 99:383-390.
- Nürnbergger, T. and Scheel, D. (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Science* 6, 372–379.
- Nürnbergger, T. and Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* 6, 335–345.
- OIRSA (2010). PLAN DE CONTINGENCIA ANTE UN BROTE DE AMARILLAMIENTO LETAL DEL COCOTERO EN UN PAIS DE LA REGION DEL OIRSA.SANIDAD VEGETAL. San Salvador, El Salvador.
- Ohler J. (1999). Modern Coconut Management. Palm Cultivation and Products.FAO.Pag.Web.http://ecoport.org/exes\$PassCheckStart?ID=E127
- Oropeza, C and D Zizumbo. (1997). The history of Lethal Yellowing in México. Pp 69-76. In: Sj Eden-Green and F Ofori (eds). *Proceedings of the InteARNtional Workshop on Lethal Yellowing-like Diseases of*.
- Parkhi V. arkhi, Vinod inod Kumar umar, LeeAnne nne M. Campbell ampbell, Alois lois A. Bell ell and Keerti eerti S. Rathore athore (2010). Expression of Arabidopsis NPR1 in Transgenic Cotton Confers Resistance to Non-defoliating Isolates of *Verticillium dahliae* but not the Defoliating Isolates. *J Phytopathol* 158:822–825.
- Peraza Echeverría Santy, Santamaría Fernández Jorge, Fuentes Ortiz Gabriela, Menéndez Cerón Mariana de los Ángeles, Vallejo Reyna Miguel Ángel, Herrera Valencia Virginia Aurora (2012). The NPR1 family of transcription cofactors in papaya: insights into its structure, phylogeny and expression. *Genes & Genomics*, DOI 10.1007/s13258-011-0218-7
- Pérez-Núñez M.T., Chan J.L., Sáenz L., Gonzalez T., Verdeil J.L., Oropeza C. (2006). Improved somatic embryogenesis from coconut (cocos nucífera L.) plumule explant cultivated in vitro. *In vitro Cell Dev Biol Pant.* 42:37-43.
- Pieterse C.M.J., Leon-Reyes A., Sjoerd Van der Ent & Saskia C M Van Wees. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology*. Vol. 5 No. 5. Pp. 309-316.

- Pieterse, CMJ; Van Loon, LC. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 4:52-58.
- Piña-Quijano P.E. (1994). Estudio poblacional de *Myndus crudus* Van Duzee (Homoptera: Cixiidae) vector del Amarillamiento Letal del Cocotero en el estado de Yucatán. Bachelor Dissertation. Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México.
- Plavsic-Banjac, G., P. Hunt, K. Maramorosch. (1972). Mycoplasma-like bodies associated with lethal yellowing disease of coconut palms *Phytopathology* 62: 298-299.
- Potlakyala SD, Delong C, Sharpe A, Fobert PR. (2007). Conservation of NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 functions between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. Vol 71. Pp. 174-183.
- Puch Hau Carlos Alberto (2012). Tesis de Maestría. Aislamiento y Caracterización de Secuencias Candidatas a Genes de Resistencia en Cocotero.
- Punchihewa, P.G. (1999). Current status of the coconut industry. In: Oropeza, C., verdeil, J.L., Ashburner, G.R., Cardeña, R. and Santamaría, J.M. (eds). *Current Advances in Coconut Biotechnology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, Pp. 3-17.
- Raff, M. (1998). Cell suicide for beginners. *Nature* 396:119-122.
- Rasmussen JB, Hammerschmidt R, Zook MN. (1991). Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae pv syringae*. *Plant physiology* 97:1342-1347.
- Rochon A., P. Boyle, T. Wignes, P.R. Fobert y C. Després. (2006). The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of c-terminal cysteines. *The Plant Cell*, 18,3670-3685.
- Ross AF. (1961). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14:340-58
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner H-Y, Hunt MD. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809-19.
- Ryals J, Weymann K, Lawton K, Friedrich L, Ellis D, et al. (1997). The *Arabidopsis* N1M1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I $\kappa$ B. *Plant Cell* 9:425-39.
- Schaefer, B.C. (1995). Revolutions in Rapid Amplification of ADNc Ends: New Strategies for Polymerase Chain Reaction Cloning of Full-Length ADNc Ends. *Anal. Biochem.* 227,255-273.

- Seon-Hee. Hwang, Duk-Ju Hwang. (2010). Isolation and Characterization of the rice NPR1 Promoter. *Plant Biotechnology* 4:29-35.
- Shah J, Tsui F, Klessing DF. (1997). Characterization of a salicylic acid insensitive mutant (Sail) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the tms2 gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:69-78.
- Shui CG, Fei ZY, Sheng L, Zheng Z and Ren PD. (2009). Isolation and Characterization of *lbNPR1* Gene from Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *ACTA AGRONOMICA SINICA*. 35 (12): 2218-2224.
- Spoel S.H., Z. Mou, Y. Tada, N.W. Spivey, P. Genschik and X. Dong. (2009). Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell*, 137(5), 860-872.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP. (1997). Systemic acquired resistance. *Annu Rev. Phytopathology*. 35:235-70.
- Tuskan G. A., S. Difazio, S. Jansson, J. Bohlmann, I. Grigoriev, U. Hellsten, N. Putnam, S. Ralph, S. Rombauts, A. Salamov, J. Schein, L. Sterck, A. Aerts, R. R. Bhalerao, R. P. Bhalerao, D. Blaudez, W. Boerjan, A. Brun, A. Brunner, V. Busov, M. Campbell, J. Carlson, M. Chalot, J. Chapman, G.-L. Chen, D. Cooper, P. M. Coutinho, J. Couturier, S. Covert, Q. Cronk, R. Cunningham, J. Davis, S. Degroeve, A. Déjardin, C. Depamphilis, J. Detter, B. Dirks, I. Dubchak, S. Duplessis, J. Ehrling, B. Ellis, K. Gendler, D. Goodstein, M. Gribskov, J. Grimwood, A. Groover, L. Gunter, B. Hamberger, B. Heinze, Y. Helariutta, B. Henrissat, D. Holligan, R. Holt, W. Huang, N. Islam-Faridi, S. Jones, M. Jones-Rhoades, R. Jorgensen, C. Joshi, J. Kangasjärvi, J. Karlsson, C. Kelleher, R. Kirkpatrick, M. Kirst, A. Kohler, U. Kalluri, F. Larimer, J. Leebens-Mack, J.-C. Leplé, P. Locascio, Y. Lou, S. Lucas, F. Martin, B. Montanini, C. Napoli, M. Marra, G. Sandberg, Y. Van De Peer y D. Rokhsar. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313(5793), 1596 – 1604.
- Uknes, S; Vernooij, B; Morris, S; Chandler, D; Steiner, H-Y; Specker, N; Hunt, M; Neuenschwander, UH; Lawton, K; Starrett, M ; Friedrich, L ; Weymann, K ; Negrotto, D ; Grlach, J; Lanahn, M; Salmeron, J; Ward, E; Kessmann, H; Ryals, J. (1996). Reduction of risk for growers: Methods for development of disease-resistant crops. *New Phytologist* 133:3-10.
- Uppalapati SR, Ishiga Y, Wangdi T, Kunkel BN, Anand A, *et al.* (2007). The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20:955–65.
- Van Loon, LC; Van Kammen, RT. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var "Samsum NN". Changes in proteins constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40:199-211.

- Van Loon, LC; Van Strien, EA. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 85-97.
- Vlot AC, Dempsey D'A, Klessing DF. (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annu. Rev. Phytopathology*. Vol. 47. Pp. 177-206.
- Volloch, V., Schweitzer, B., and Rits, S. (1994). Ligation-Mediated Amplification of ARN from Murine Erythroid Cells Reveals a Novel Class of Beta-Globin mRNA with an Extended 5'-Untranslated Region. *Nucleic Acids Res.* 22, 2507-2511.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414:562-71.
- Yuan Y, Zhong S, Li Q, Zhu Z, Lou Y, Wang L, Wang J, Wang M, Li Q, Yang D and He Z. (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnology Journal*. Vol. 5. Pp. 313-324.
- Zhang Y., W. Fan, M. Kinkema, X. Li y X. Dong. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 96 (11). 6523-6528.
- Zhang Y., J. Shi, J. Y. Liu, Y. Zhang, J. D. Zhang and X.Q. Guo. (2009). Identification of a novel NPR1-like gene from *Nicotiana glutinosa* and its role in resistance to fungal, bacterial and viral pathogens. *Plant Biology*. 12. Pp 23-34.
- Zhang Xudong & Marta I. Francis & William O. Dawson & James H. Graham & Vladimir Orbović & Eric W. Triplett & Zhonglin Mou. (2010). Over-expression of the Arabidopsis NPR1 gene in citrus increases resistance to citrus canker. *Eur J Plant Pathol.* 128:91-100.
- Zhao JT, Huang X, Chen YP, Chen YF and Huang XL. (2008). Molecular cloning and Characterization of an Ortholog of *NPR1* Gene from Dongguan Dajiao (*Musa* spp.ABB). *Plant Mol Biol Rep.*



**CAPÍTULO II****ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE UN GEN TIPO *NPR1* EN PLANTAS DE  
COCOTERO TRATADAS CON ÁCIDO SALICÍLICO****2.1 INTRODUCCIÓN**

El coco es una planta que pertenece a la familia *Aracaceae*, cuyo nombre científico es *Cocos nucifera* y es conocido comúnmente como palma de coco. El coco es la palmera más cultivada e importante del mundo, ya que actualmente es la principal especie productora de grasa vegetal. Es una de las plantas que proporciona una mayor diversidad de productos del mundo, siendo una fuente primaria de alimento y bebida (Gutiérrez, 2009). Además, un producto nuevo con un gran potencial es el coco-biodiesel (obtenido a partir del aceite), que en Filipinas se usa para producir comercialmente un aditivo para mejorar el desempeño del diesel fósil, eliminando prácticamente las emisiones nocivas de su combustión y contribuyendo con ello a mejorar el medio ambiente (Lao 2008; 2009).

La producción mundial de coco está localizada en países tales como Indonesia, Filipinas e India, los cuales en conjunto suman el 75% de la producción mundial del coco. En lo referente a la producción del cocotero en América Latina, se observa que son básicamente Brasil y México los países que sobresalen en cuanto a volumen de la producción se refiere, los cuales en el 2004 participaron con el 5.54% y 1.79% de la producción respectivamente ubicándose como el cuarto y séptimo productor a nivel mundial (COECOCO, 2005). El mercado más interesante del coco es el agua envasada tanto en Asia como en Europa y Norteamérica ya que se trata de una bebida con mucha aceptación y el mercado consume cantidades mayores cada año (FAOSTAT, 2009). El cocotero se encuentra ampliamente distribuido en todos los países tropicales de América Latina y el Caribe y en Florida en Estados Unidos. Desafortunadamente, una de las principales plagas que lo afecta en esta región es el Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC), enfermedad devastadora que ha matado millones de palmas en Jamaica, Cuba, Islas caimán, Estados Unidos, México Belice, Honduras, Guatemala (Harrison y Oropeza, 2008).

El ALC es una enfermedad causado por fitoplasmas (Beakbane *et al.*, 1972; Mc Coy 1972) se dispersa muy rápidamente (Mc Coy *et al.*, 1983), pues es transmitido por un insecto volador, el homóptero *Myndus crudus*, identificado como vector en estudios realizados en Florida (Howard *et al.*, 1982; Harrison y Oropeza, 1997) y en México (CICY, México; resultados no publicados). Este insecto se encuentra ampliamente distribuido en los países tropicales de Latinoamérica y el Caribe (Kramer, 1979; Villanueva-Barradas, 1991). El uso de antibióticos e insecticidas para controlar al patógeno y al vector tiene una utilidad parcial, pero no suficiente para el control de la enfermedad (Mc Coy *et al.*, 1983), el empleo de germoplasma resistente ha sido eficiente en el combate de ALC (Harrison y Oropeza, 2008). Por otro lado, recientemente se reportó en Jamaica que al usar una combinación de prácticas culturales, que incluyen principalmente detección temprana del AL en las plantas, derribo y destrucción de palmas infectadas y la eliminación de malezas hay una reducción en la incidencia de la enfermedad (Oropeza *et al.*, 2009). Estas mismas practicas han dado el mismo resultado en una enfermedad similar al ALC en Ghana (Nkansah-Poku *et al.*, 2009)

Las plantas poseen de forma natural, barreras de defensa contra patógenos, y una de ellas es la resistencia sistémica adquirida (SAR), la cual es una de las armas más importantes que poseen las plantas para defenderse ante el ataque de patógenos (Durrant y Dong, 2004; Cao *et al.*, 1997). La resistencia mediada por SAR se produce cuando la célula vegetal identifica ciertas moléculas producidas por los patógenos llamadas efectores, lo que desencadena una respuesta primaria conocida como la HR (Heat, 2000; Pruski *et al.*, 2000) que a su vez desencadena la SAR (Durrant y Dong, 2004). Molecularmente la SAR, se caracteriza por un incremento en la expresión de genes *PR* que son considerados marcadores de esta respuesta (Durrant y Dong, 2004). Actualmente se considera al gen *NPR1* (no expresivo de genes *PR-1*) como un regulador maestro de la SAR (Pieterse y Van Loon, 2004; Cao *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1994). Este gen fue aislado por primera vez en 1997 a partir de una mutante de *Arabidopsis thaliana* insensible a SA e INA con bajos niveles de expresión de los genes marcadores de la SAR, *PR1* y *PR5*, denominando a este gen “no expresivo de genes *PR-1*” (*NPR1*) (Cao *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1994). En *Arabidopsis*, el gen *NPR1* pertenece a una pequeña familia génica que comprende a otros cinco miembros *NPR2*, *NPR3*, *NPR4*, *NPR5* y *NPR6* (Zhang *et al.*, 2006; Hepworth *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005).

Existen pocos reportes sobre análisis de expresión basal de los genes tipo *NPR1*. En 1998 el grupo de Cao reporta la presencia de la proteína NPR1 detectada mediante Inmuno Blot en muestras de hojas de plantas silvestres de arabis. En plantas como arabis, arroz, así como también en otras de importancia económica se ha reportado que la expresión de *NPR1* está relacionado con la resistencia a una amplia gama de patógenos como virus, bacterias y hongos. En cacao, se ha evaluado el efecto de SA en contra del patógeno *Phytophthora capsici*, las plántulas de cocotero fueron tratadas con 0.5, 1, y 2.5 mM de SA de forma independiente previo a la inoculación con el micelio patogénico. El tratamiento con 2.5 mM de SA fue el que mejor resultado dio, ya que, las plántulas de cocotero con este tratamiento previo tuvieron una mayor tolerancia a *Phytophthora capsici* en comparación con la plántulas control. En ese punto del trabajo los resultados sugieren que posiblemente SA está relacionado con la tolerancia conferida a cocotero en contra de *Phytophthora capsici*, anexo a este trabajo, también se obtuvo un fragmento de la secuencia del gen tipo *NPR1* (217pb) usando cebadores degenerados, diseñados a partir de secuencias homólogas de *NPR1* en arabis, tabaco, tomate, arroz y maíz (Narváez, 2010. Tesis de Maestría). De acuerdo a estos resultados previos, se planteó como objetivo, analizar los niveles de expresión del gen tipo *NPR1* en plantas de cocotero tratadas con 2.5 mM de SA, empleando cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia conocida de este gen tipo *NPR1*.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 MATERIAL VEGETAL

Las plantas empleadas para realizar los estudios de la expresión del gen tipo *NPR1* fueron palmas de coco de la variedad Alto del Pacífico (AP) provenientes de cultivo *in vitro* con una talla aproximada de 27 cm (Figura 2.1). Estas palmas han mostrado cierta resistencia a la enfermedad del AL, pero se desconoce cual sea la causa de esta resistencia.



**Figura 2.1.** Imagen representativa de una de las palmas que fueron sometidas a una concentración de 2.5 mM de ácido salicílico.

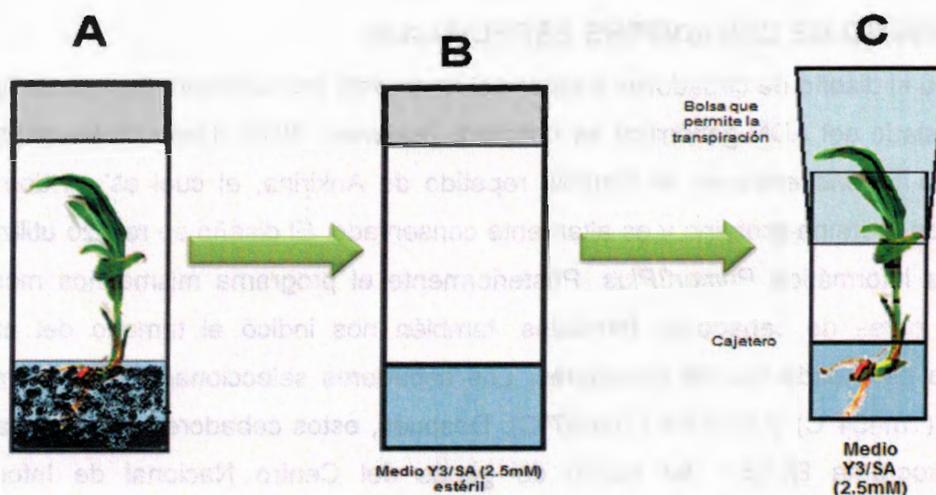
### 2.2.2 TRATAMIENTO DE LAS PLANTAS CON ÁCIDO SALICÍLICO (2.5 mM)

Las palmas provenientes de cultivo *in vitro* fueron lavadas con abundante agua estéril y transferidas a medio Y3 el cual contenía 2.5 mM de SA. Basados en la información de la literatura, se decidió tomar un rango de tiempo de 0 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas y 120 horas para la evaluación de la expresión de este gen en plántulas tratadas con 2.5 mM de SA. Estas pruebas fueron realizadas por triplicado. Se tomaron como controles (a) plántulas que contenían etanol (2 mL/L) en el medio Y3 en ausencia de SA (b) y plántulas que solo contenían el medio Y3 en ausencia de SA (Cuadro 2.1).

**Cuadro 2.1.** Condiciones empleadas para el ensayo del estudio de la expresión semicuantitativa del gen tipo *NPR1* de cocotero.

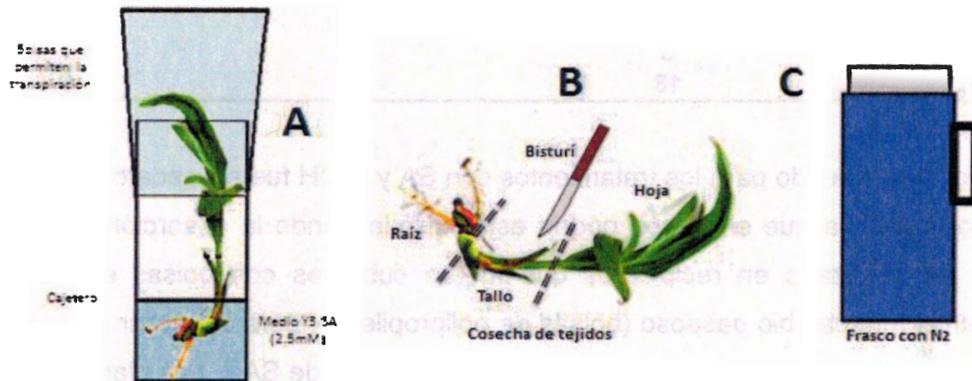
Tiempo del Tratamiento (Horas)	Número de Plantas Tratadas con SA (2.5 mM)	Número de Plantas Control (a)	Número de Plantas Control (b)
0	3	3	1
24	3	3	1
48	3	3	1
72	3	3	1
96	3	3	1
120	3	3	1
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>6</b>

El medio Y3 empleado para los tratamientos con SA y EtOH fue sin sacarosa y sin carbón activado (debido a que el carbón podría estar disminuyendo la absorción del SA). Este ensayo fue realizado en recipientes que fueron cubiertos con bolsas especiales que permitían el intercambio gaseoso (bolsas de polipropileno), para así evitar la acumulación de etileno, el cual como se sabe es un regulador negativo de SAR. Las plantas estuvieron en contacto con los medios SA y EtOH. Hasta el tiempo en que los tejidos fueron cosechados (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Representación esquemática del proceso de tratamiento de plantas con SA. A). Se observa una planta antes de ser sometida al tratamiento con SA. B). Cajetero conteniendo medio de cultivo líquido Y3 con una concentración de 2.5 mM de SA estéril. C). Imagen representativa de una la planta durante el tiempo sometido al tratamiento.

Posteriormente de acuerdo a los tiempos establecidos, se realizó la cosecha de los tejidos a cada una de las plantas. Los tejidos cosechados fueron hoja, tallo y raíz y posteriormente fueron congelados en nitrógeno líquido, para, evitar la degradación del ARN. Seguidamente los tejidos fueron puestos en congelación en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para la posterior extracción del ARN (Figura 2.3).



**Figura 2.3. Esquema representativo de la cosecha de los tejidos.** A). Aspecto de la planta hasta antes de ser cosechado; B). Proceso de cosecha de cada uno de los diferentes tejidos. C). Contenedor con nitrógeno líquido en el cual eran puestos los tejidos cosechados antes de ser almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.3 DISEÑO DE CEBADORES ESPECÍFICOS

Se realizó el diseño de cebadores a partir del fragmento previamente clonado del gen tipo *NPR1* aislado del ADN genómico de cocotero (Narváez, 2010. Tesis de Maestría). Este fragmento se encuentra en el dominio repetido de Ankirina, el cual es un dominio de interacción proteína-proteína y es altamente conservado. El diseño se realizó utilizando el programa informático *Primer3Plus*. Posteriormente el programa mismo nos mostró los posibles pares de cebadores formados, también nos indicó el tamaño del amplicón esperado para cada par de cebadores. Los cebadores seleccionados se denominaron NPR1-a ( $T_m=54^{\circ}\text{C}$ ) y NPR1-b ( $T_m=57^{\circ}\text{C}$ ). Después, estos cebadores, fueron analizados en el programa BLAST del banco de genes del Centro Nacional de Información Bioinformática (NCBI por sus siglas en inglés) para ver si mostraban cierta similitud con alguna secuencia de *NPR1* que haya sido caracterizada en alguna especie de planta.

## 2.2.4 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PCR PARA EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE *NPR1*

Antes de iniciar con el estudio de expresión se realizó la extracción de ADN de una planta que no fue sometida a tratamiento, para las pruebas de amplificación. La extracción del ADN se realizó con un protocolo empleando sílica.

### 2.2.4.1 EXTRACCIÓN DE ADN

Se tomó 0.5 g de tejido de hoja, luego se maceró con N<sub>2</sub> líquido y se agregó 1 mL de amortiguador de extracción (100 mM Tris pH 8, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -mercapto-etanol), durante la maceración se agregó 0.5 g de PVP (PolyVinyl-Pyrrolidone). Se colocó la mezcla en un tubo eppendorf de 2 mL y se agregó 100  $\mu$ L de la solución SDS al 20%, se incubó a 65°C por 10 minutos. Pasado el tiempo de incubación se adicionó 500  $\mu$ L de acetato de potasio 5 M, se incubó en hielo por 20 minutos. Seguidamente se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos a 10°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo 2 mL. Posteriormente se adicionó 300  $\mu$ L de sílica (homogéneamente mezclado) y se mezcló manualmente por 3-5 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500  $\mu$ L de etanol al 70%, se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos y luego se desechó el sobrenadante, repitiendo nuevamente el lavado. Por último se secó la pastilla por 20-25 minutos a temperatura ambiente y se disolvió la pastilla con 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, luego se incubó a 55°C durante 5-10 minutos. Por último se centrifugó a 14000 rpm por 3 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo *eppendorf* de 2 mL. Para verificar la integridad de la muestra se corrió en un gel de agarosa al 1% en una cámara electroforética a 95V y 175A.

### 2.2.4.2 ESTANDARIZACIÓN DE LAS TEMPERATURAS DE HIBRIDACIÓN DE LOS CEBADORES

Luego de la extracción de ADN, se estandarizó las condiciones de hibridación de los cebadores, para lo cual, se probaron cuatro temperaturas diferentes para cada cebador. Las temperaturas probadas se basaron de acuerdo a la temperatura de hibridación a las que se diseñaron estos cebadores, las temperaturas probadas fueron: 62°C, 60°C, 58°C y 56°C.

### 2.2.5 EXTRACCIÓN DE ARN

**CTAB/Kit Comercial:** Se maceró 0.5 g de tejido de hoja con nitrógeno líquido en un mortero previamente esterilizado (ARNsaway). Se le adicionó 600  $\mu$ L de buffer CTAB+12  $\mu$ L de  *$\beta$ -mercaptoetanol* (previamente calentado a 65°C) y la mezcla fue transferida a un tubo eppendor de 2 mL. El extracto se incubó a 65°C por 10 minutos. Después se adicionó 600  $\mu$ L de la mezcla Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1). Luego se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo agregando 1 volumen de isopropanol frío (-20°C) + 100  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M para precipitar los ácidos nucleicos y se incubó en hielo por 5 minutos. Posteriormente la muestra fue centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos desechando el sobrenadante (observar la pastilla). La pastilla fue lavada con 1 mL de etanol al 70% y resuspendida en 40  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Luego se le dio un segundo lavado agregando 700  $\mu$ L de SSTE + 700  $\mu$ L de Fenol Cloroformo-Alcohol Isoamílico (25:24:1) + 100  $\mu$ L de acetato de sodio 3 M, se mezcló y centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se adicionó un volumen de Isopropanol y se incubó 5 minutos a -20°C. El precipitado se aplicó a una columna proporcionada por el kit de extracción (ARNspin Mini Column) y se centrifugó a 10,000 rpm 1 minuto. El producto filtrado fue desechando. Luego se adicionó 350  $\mu$ L del buffer MDB del kit (Membrane Desalting Buffer) y nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm por 1 minuto para secar la membrana y el filtrado fue desechando. Después se aplicó 95  $\mu$ L de la mezcla de reacción de DNasa del kit (10  $\mu$ L de ADNasa I + 90  $\mu$ L de buffer reacción de DNasa) a la columna y se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Posterior a eso se inactivó la enzima ADNasa I con 200  $\mu$ L de buffer RA2. Luego se adicionó 600  $\mu$ L del buffer RA3 centrifugando durante 1 minuto a 10,000 rpm y desechando el filtrado, luego se dio un lavado con 250  $\mu$ L de buffer RA3 nuevamente pero esta vez centrifugando por 2 minutos a 10,000 rpm. Posterior el ARN fue eluido en tubo nuevo y aplicando 30  $\mu$ L agua libre de nucleasas al centro de la columna y centrifugando a 13,000 rpm durante 1 minuto. Finalmente el ARN fue fraccionado en un gel de agarosa al 1% en una cámara electroforética a 95V y 175A.

### 2.2.6 TRATAMIENTO CON LA ENZIMA ADNasa I

Con el fin de eliminar cualquier ADN contaminante de las muestras de ARN, se realizó un tratamiento con la enzima ADNasa I (Ambión). Se tomaron 10 $\mu$ L de ARN total a los que se le agregaron 1  $\mu$ L de Buffer de DNasa 10X, 1  $\mu$ L de ADNasa I (10 U/ $\mu$ L) y 1  $\mu$ L de inhibidor de ARNsa (RNAsaOut). Luego se dejó incubar 30-40 minutos a 37°C. Posteriormente se agregó 1  $\mu$ L del inactivador (DNase Inactivation Reagent, Ambión) y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente, finalmente se centrifugó 1 minuto a 11,000 rpm y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Las muestras tratadas fueron fraccionadas en un gel de agarosa al 1%, cargando 1  $\mu$ L de la muestra tratada y fue corrido en una cámara electroforética a 95V y 175A. Finalmente las muestras de ARN fueron cuantificadas con un *Nanodrop*.

### 2.2.7 SÍNTESIS DE ADNC

Para la síntesis de ADNc, se empleó la enzima Retrotranscriptasa *SuperScript II* (Invitrogen), a partir de 500 ng del ARN total, en un volumen total de 20  $\mu$ L, el cual contiene: 4  $\mu$ L del buffer 5X (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% (v/v) NP-40, 50% (v/v) glicerol), 1  $\mu$ L de la mezcla de dNTPs (10 mM), 2  $\mu$ L de DTT (0.1 M), 1  $\mu$ L de ARNseOUT (40 U/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L Random Primers (250 ng). La mezcla fue incubada a 42°C por 1 hora y luego se inactivó la Retrotranscriptasa a 70°C durante 15 minutos.

### 2.2.8 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *NPR1* DE COCOTERO

El análisis de la expresión de *NPR1* se realizó por PCR punto final. En el cuadro 2.2, se observan las condiciones empleadas de la preparación de la mezcla de reacción para la amplificación del transcrito con el cebador NPR1-a.

**Cuadro 2.2.** Mezcla de reacción, para el análisis de la expresión del gen tipo *NPR1* de cocotero,

REACTIVO	VOLUMEN
ADNc	2 µL
Agua estéril	12.3 µL
10X Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 µL
Mezcla de dNTPs (10 mM)	0.5 µL
F-NPR1-a (20 pMol)	2 µL
R-NPR1-a (20 pMol)	2 µL
Taq DNA Polymerasa	0.2 µL
<b>Volumen Total</b>	<b>25 µL</b>

Posteriormente en el cuadro 2.3, se observan las condiciones de temperatura empleados para tal amplificación. Para esto se empleó una temperatura de hibridación de 60°C por 1 minuto (Ver estandarización de la condiciones de PCR).

**Cuadro 2.3.** Condiciones de temperatura empleadas para la amplificación del gen tipo *NPR1* de coco, durante el estudio de la expresión semicuantitativa.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	4 minutos	1
94	1 minuto	
<b>60</b>	<b>1 minuto</b>	30
72	30 segundos	
72	10 minutos	1



Las colonias positivas fueron crecidas en 5 mL de medio líquido con ampicilina (100 mg/L) e incubadas a 37°C y 200 rpm durante toda la noche (16 horas aproximadamente) con el objetivo de multiplicar la cantidad de plásmido recombinante. Luego, se tomaron 2 mL del cultivo para realizar la subsecuente extracción del plásmido mediante el kit comercial Miniprep QIAprep (QIAGEN). El plásmido extraído fue cuantificado con la ayuda del marcador de masas High Mass (Invitrogen) para así determinar la concentración requerida para la secuenciación. El proceso de secuenciación fue realizado por la Universidad de Davis en California (Davis Sequencing), con el método dideoxi, ideado por Sanger, basado en el empleo de didesoxinucleótidos que carecen de uno de los grupos hidroxilo.

### 2.2.10 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS SECUENCIADOS

Los Productos secuenciados se nombraron como PRODUCTO A (24 horas) y PRODUCTO B (96 horas). Después de obtener la secuencia de estos productos, se procedió a realizar el análisis. Para empezar, se inició con la obtención del Marco de Lectura de Abierto (ORF's, por sus siglas en inglés), empleando el programa TRASLATE de Biotoools-Expasy (<http://expasy.org/tools/>). Después de obtener la ORF de estas secuencias, se realizó una alineación entre ellas, con la finalidad de saber si estos fragmentos poseen la misma secuencia y si pertenecen al gen tipo *NPR1* de coco. También se realizó un alineamiento entre las secuencias de nucleótidos con el mismo fin. Luego, se realizó un análisis de las ORF's empleando el programa BLASTP del banco de genes NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 PLANTAS TRATADAS CON ÁCIDO SALICÍLICO (2.5 MM).

En cuanto a las plantas tratadas con SA, se pudo observar que las plantas no presentaron ningún tipo de daño por intoxicación. Al igual no se observó daño alguno que pudiera desencadenar algún otro tipo de respuesta, tal como la ruta de jasmónico o etileno. En cuanto a la cosecha de los tejidos (hoja, tallo y raíz), estos fueron congelados y almacenados en el ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la posterior extracción del ARN.

### 2.3.2 SELECCIÓN DE CEBADORES

Después de someter los parámetros requeridos para el diseño de los cebadores en el programa *Primer3Plus*, se seleccionaron 2 juegos de cebadores. En el cuadro 2.4, se observan las características emitidas por el programa para cada cebador.

**Cuadro 2.4.** Características de los 2 cebadores seleccionados para el estudio del nivel de expresión del gen tipo *NPR1* de coco.

Cebador	Secuencia	Tamaño	(Tm)	Amplicón
(F) NPR1-a	CTGGACTCGGATGATGTTGA	20	54	189 pb
(R) NPR1-a	AGCCATGTGGAGGGGTGT	18	59	
(F) NPR1-b	TAGGCACTGGACTCGGATGA	20	57	134 pb
(R) NPR1-b	TCTAACAACTCGGCCACAAC	20	55	

En cuanto al análisis de estos 2 cebadores con el programa BLASTN, el cebador NPR1F-a mostró 100% de identidad con un gen tipo *NPR1* de *Populus trichocarpa* (Álamo Balsámico de California) y un valor de  $E=0.066$  y 100% de identidad con el *NPR1* de *Cydonia oblonga* (Membrillero) y un valor de  $E=0.26$ , al igual presentó 95% de identidad con un gen de *NPR1* de Musa (Cuadro 2.5).

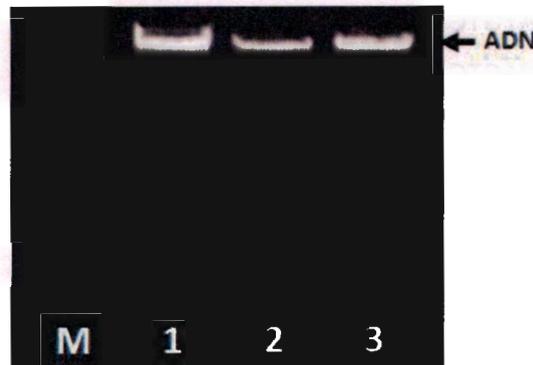
**Cuadro 2.5.** Resultados del análisis del cebador NPR1F-a con el programa BLAST.

Accesión	Descripción	Expect	% Identidad
XM002308245.1	<i>Populus trichocarpa</i> NPR1/NIM1_like regulatory protein, mRNA	0.066	100
DQ152833.1	<i>Cydonia oblonga</i> clone co-2c10 NPR1-like protein mRNA, partial Cds	0.26	100

El cebador NPR1-b, no mostró ninguna similitud con algún tipo de *NPR1*. Sin embargo, a pesar de esto, este cebador fue empleado para la estandarización de la temperatura de hibridación y especificidad.

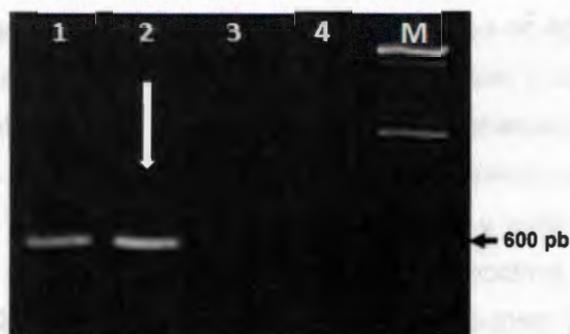
### 2.3.3 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

En la Figura 2.5, se observa el fraccionamiento del ADN genómico extraído de una palma de cocotero (no sometida a SA), empleando el protocolo de extracción con sílica. El ADN fue extraído por triplicado, para tener suficiente ADN durante las pruebas. Observamos que este método de extracción resultó ser eficiente ya que obtuvimos ADN de buena integridad con una banda bien definida sin presencia de barrido y ausencia de ARN.



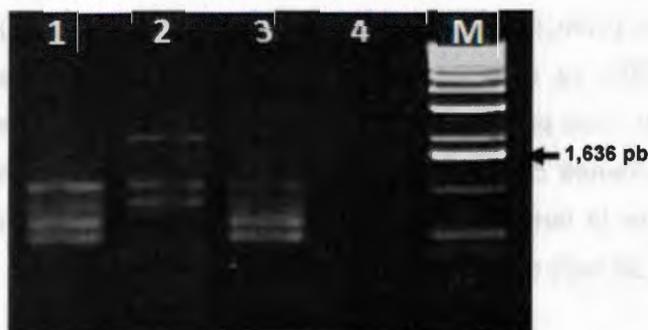
**Figura 2.5.** Fraccionamiento de ADN genómico de cocotero. Imagen representativa de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que muestra el ADN extraído para la estandarización de los cebadores. Carriles 1, 2, 3. Réplicas del ADN extraído.

El resultado de la estandarización de las condiciones de PCR del cebador NPR1-a, se presenta en la figura 2.6, donde se observa que para la temperatura de 58°C y 56°C no hubo una amplificación específica y en cuanto a la temperatura de hibridación que mejor resultado mostró para este cebador, fue la de 60°C, ya que se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado bien definido y con una buena concentración (Figura 2.6, Carril 2).



**Figura 2.6.** Imagen que muestra los productos obtenidos con el cebador NPR1-a, empleando las diferentes temperaturas de hibridación. Carril 1. Temperatura de 62°C; Carril 2. Temperatura de 60°C; Carril 3. Temperatura de 58°C y Carril 4. Temperatura de 56°C. M. Marcador molecular de 100 pb. La flecha indica, el producto que mostró la mejor temperatura de hibridación.

Contrario al cebador NPR1-a, el cebador NPR1-b, no mostró ningún fragmento específico. Como se observa en la figura 2.7, carril 1, 2 y 3, a temperaturas de hibridación de 60, 62 y 58°C se obtuvieron productos inespecíficos, mientras que a una temperatura de 56°C no hubo amplificación alguna (Figura 2.7, Carril 4).

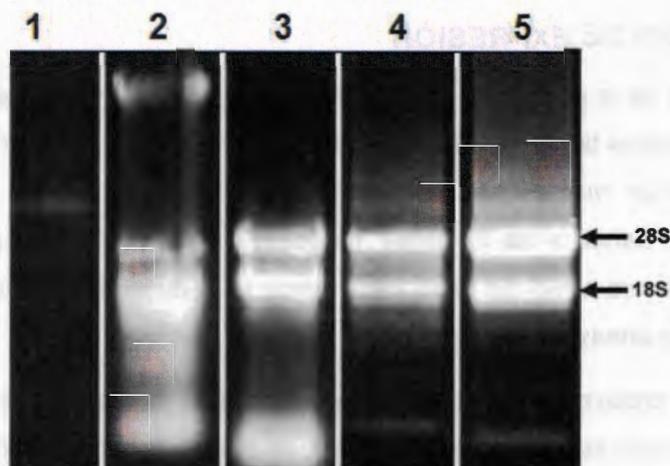


**Figura 2.7.** Imagen que muestra el producto obtenido con el cebador NPR1-b. Carril 1. Temperatura de 62°C; Carril 2. Temperatura de 60°C; Carril 3. Temperatura de 58°C; Carril 4. Temperatura de 56°C y M. Marcador molecular de 1 kb.

En base a estos resultados obtenidos, tanto de los del análisis en BLASTN y así como los productos inespecíficos amplificados con el cebador NPR1-b, se optó por emplear el cebador NPR1-a para el posterior estudio de los niveles de expresión del gen tipo *NPR1* de cocotero.

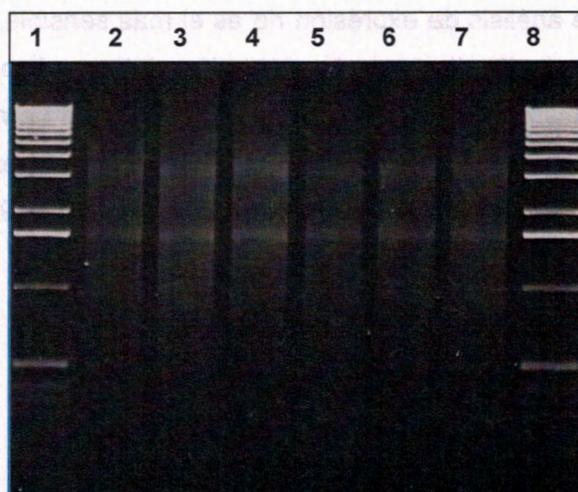
### 2.3.4 EXTRACCIÓN DE ARN

Debido a que en coco no se existe un protocolo estandarizado para extracción de ARN de tejidos de hojas, tallo y raíz, se probaron varios protocolos para determinar cual de ellos mostraba mejores resultados. Por lo tanto, se emplearon 4 protocolos: el primero fue un protocolo el cual empleaba el reactivo Trizol, pero debido a que las muestras se fenolizaban rápidamente y por lo tanto el ARN se degradaba (Figura 2.8, Carril 1), se decidió utilizar otro protocolo. El segundo protocolo empleado fue el Concert (*Concert Plant ARN Reagent*), pero el problema fue que se extraía más ADN que ARN, por lo tanto era necesario emplear más enzima ADNsa I (5-10  $\mu$ L) y más tiempo de incubación, por lo que el ARN se degrada (Figura 2.8, carril 2). Para el tercer protocolo se utilizó el buffer CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide), con este protocolo se obtuvo una buena cantidad de ARN, el inconveniente fue que era más tardado y también se empleaba demasiada enzima ADNsa I para eliminar el ADN contaminante (Figura 2.8, carril 3). Por último se probó un Kit comercial (ARNspin Mini ARN Isolation Kit, *General Electric*), pero igual que los otros protocolos, tuvo un inconveniente, no se obtenía suficiente ARN (Figura 2.8, carril 4), por lo se optó realizar una combinación del protocolo con CTAB y el Kit Comercial. Como se observa en la figura 2.8, carril 5, se puede ver que las muestras extraídas con este protocolo modificado (Ver materiales y métodos) presentan una buena integridad de ARN, ya que se logra observar tanto la subunidad mayor así como la subunidad menor. Este protocolo fue realizado en menor tiempo comparado con los otros, al igual mostró menos contaminación con ADN y en cuanto a la calidad del ARN fue mucho mejor. Por lo tanto se optó por emplear este protocolo para extraer el ARN de todos los tejidos de hoja cosechados durante el ensayo.



**Figura 2.8.** ARN extraído con distintos protocolos. Carril 1. Protocolo empleando el reactivo Trizol; Carril 2. Empleando el Reactivo Concert; Carril 3. Empleando el Reactivo CTAB; Carril 4. Empleando el Kit comercial; Carril 5. Protocolo combinado de CTAB/Kit.

Posteriormente se realizó la síntesis de ADNc de las muestras extraídas, en la Figura 2.9, se presenta una imagen representativa de algunas muestras de ADNc después de ser fraccionados en un gel de agarosa al 1%, la característica de una buena síntesis de ADNc es un barrido, que va de las pozas hasta aproximadamente los 100 pb, ya que representa la presencia de la población de mensajeros los cuales son de diversos tamaños.



**Figura 2.9.** ADNc de plantas tratadas con SA y sintetizado con la enzima SuperScript II. Carril 1 y 8. Marcador de 1 kb; Carril 2. 0 Horas; Carril 3. 24 Horas; Carril 4. 48 Horas; Carril 5. 72 Horas; Carril 6. 96 Horas; Carril 7. 120 Horas.

### 2.3.5 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

Para el análisis de la presencia de los transcritos de *NPR1* en los tejidos tratados con SA empleando diversos tiempos, se usó la PCR de punto final. En el primer ensayo realizado se logró observar que el transcrito del gen *NPR1* se observó un incremento en la intensidad de la banda a las 72 horas respecto a la de 48 horas y el tiempo cero (Figura 2.10.A). Lo que nos sirvió de base para tomar la decisión de que tiempos considerarían para el segundo ensayo.

En el segundo ensayo se observó la presencia basal de los transcritos de *NPR1* ya que, en ambos controles se detectó la misma intensidad de banda, no hubo una variación en la concentración del producto de PCR en los diferentes tiempos del análisis para ambos controles. En el análisis de las muestras provenientes de las plántulas tratadas con SA, se observa la presencia basal de *NPR1* en el tiempo 0, sin embargo se observa una mayor intensidad de la banda en la muestra correspondiente a 24 horas después del tratamiento, esta intensidad decae a las 48 y 72 horas, observando un incremento a las 96 horas después del tratamiento. Cada muestra fue analizada a la misma concentración, esto fue demostrado al amplificar el gen de mantenimiento *18S* ya que todas las muestras se presentaron a la misma concentración (Figura 2.10B), cabe destacar que se tuvo 3 repeticiones de cada muestra analizada.

Si bien este método de análisis de expresión no es el más sensible, el resultado muestra que si hubo cambios significativos en la expresión del gen tipo *NPR1* de cocotero, comparado con las muestras control que fueron sometidas a tratamiento con 2.5 mM de SA, por lo que se concluye que el tratamiento con SA induce la expresión del gen tipo *NPR1* de cocotero, mostrando una mayor expresión a las 24 y 96 horas después del tratamiento (Figura 2.10C).

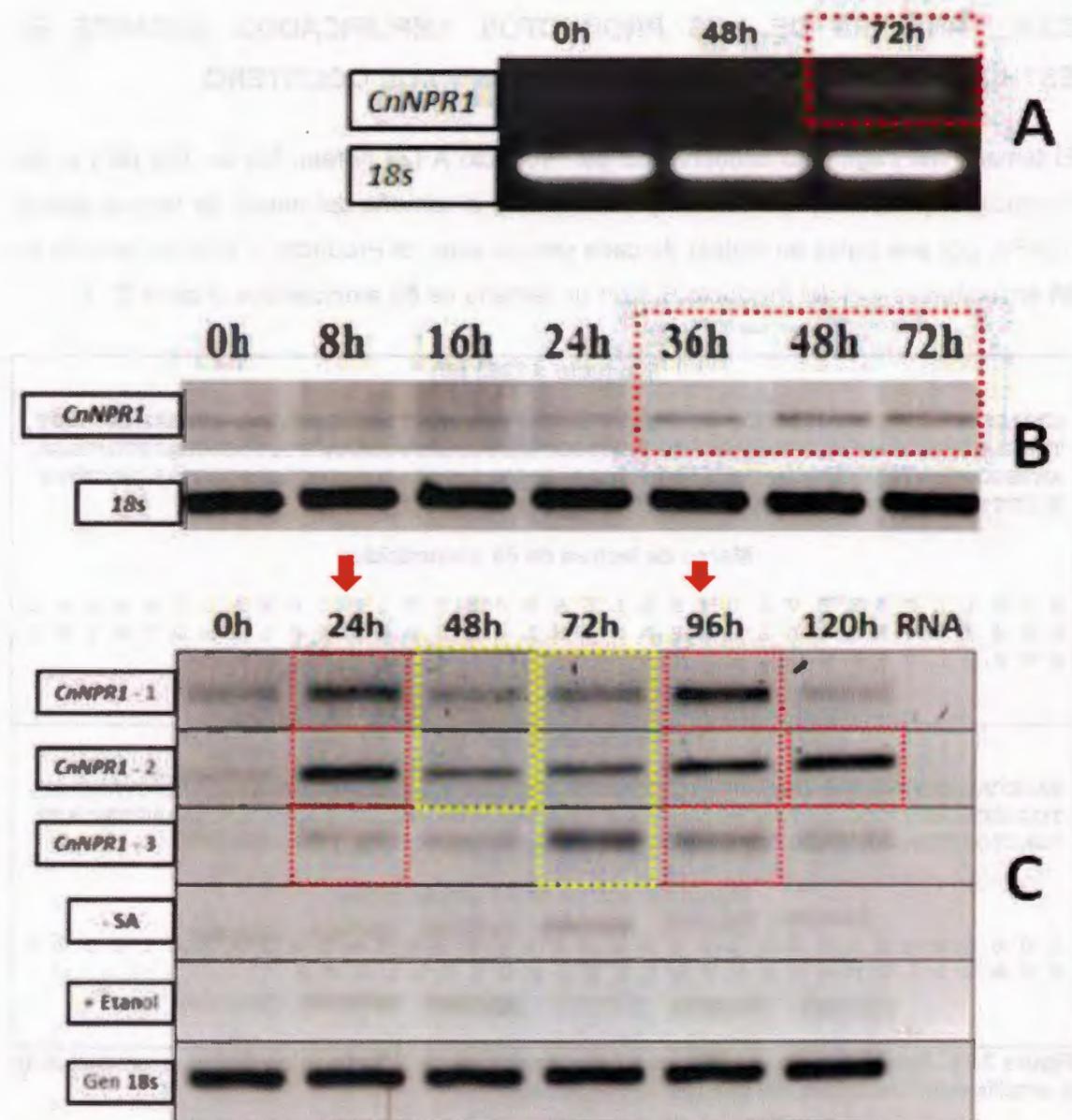
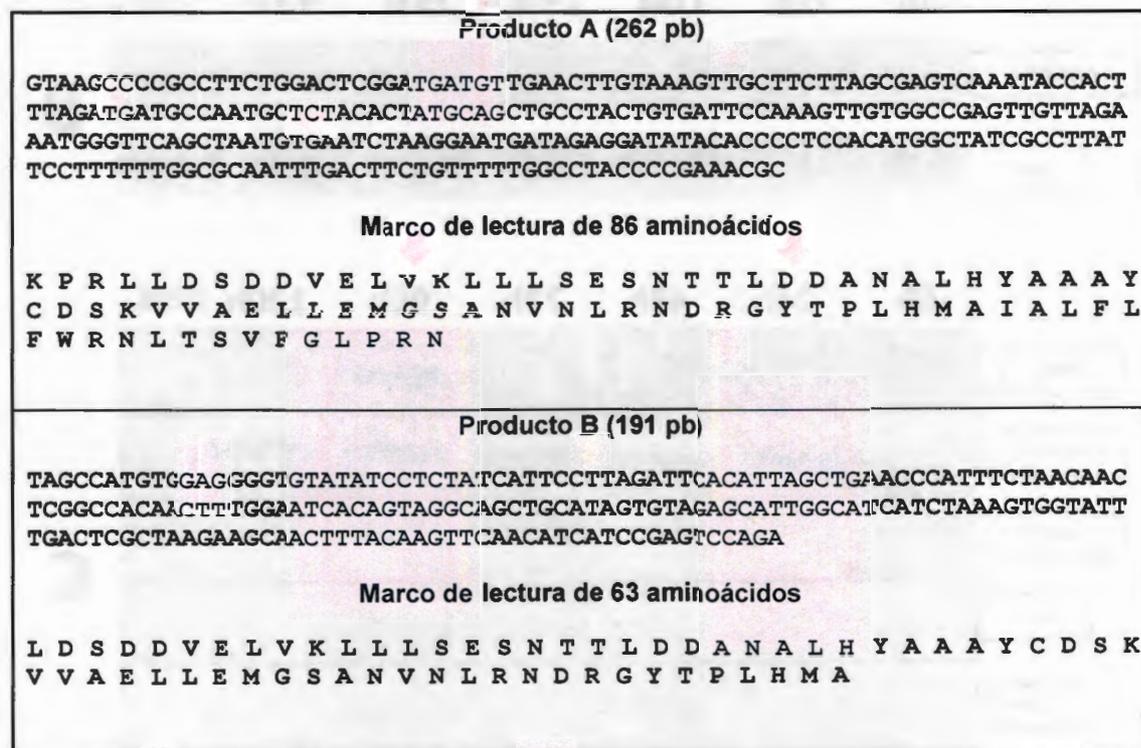


Figura 2.10. Nivel de transcritos del gen tipo *NPR1* en tejido de hoja de plantas de *C. nucifera*. Los amplicones fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. **A. Primer ensayo**, en el recuadro rojo señala que a las 72 h hubo un mayor nivel de transcritos comparado con las 0 h y 48 h; **B. Segundo ensayo**, el recuadro rojo señala los tiempos en el cual el nivel de transcrito del gen tipo *NPR1* fue mayor; **C. Tercer ensayo**; el recuadro rojo señala los tiempos donde el nivel del transcrito del gen tipo *NPR1* fue mayor comparado con los controles; los recuadros amarillos señalan aumento del nivel de transcrito de *NPR1* igual que en el segundo ensayo. El tamaño esperado del amplicón del gen tipo *NPR1* es de 189 pb y 18s: 190 pb. Las Flechas en rojo, indican los dos fragmentos clonados.

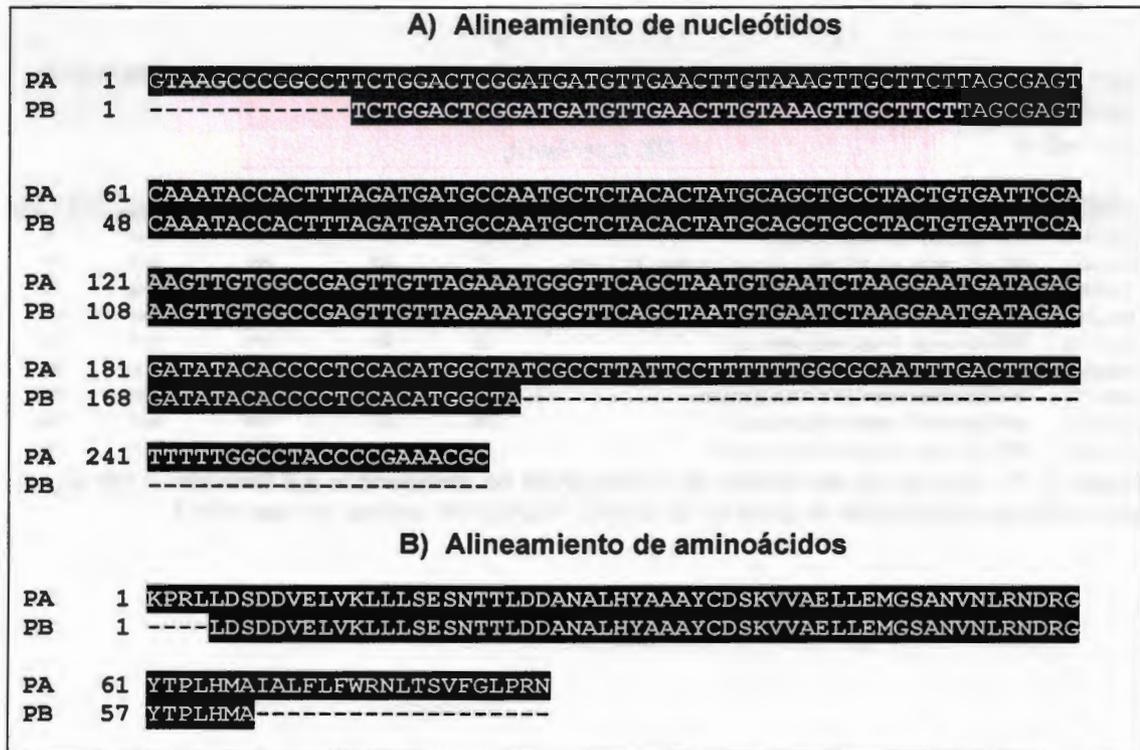
### 2.3.6 ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS DURANTE EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN DEL GEN TIPO *NPR1* DE COCOTERO

El tamaño del fragmento secuenciado del Producto A (24 horas), fue de 262 pb y el del Producto B (96 horas) fue de 191 pb. En cuanto al tamaño del marco de lectura abierto (ORF's, por sus siglas en inglés) de cada uno de ellos, el Producto A, tuvo un tamaño de 86 aminoácidos y el del Producto B, tuvo un tamaño de 63 aminoácidos (Figura 2.11).



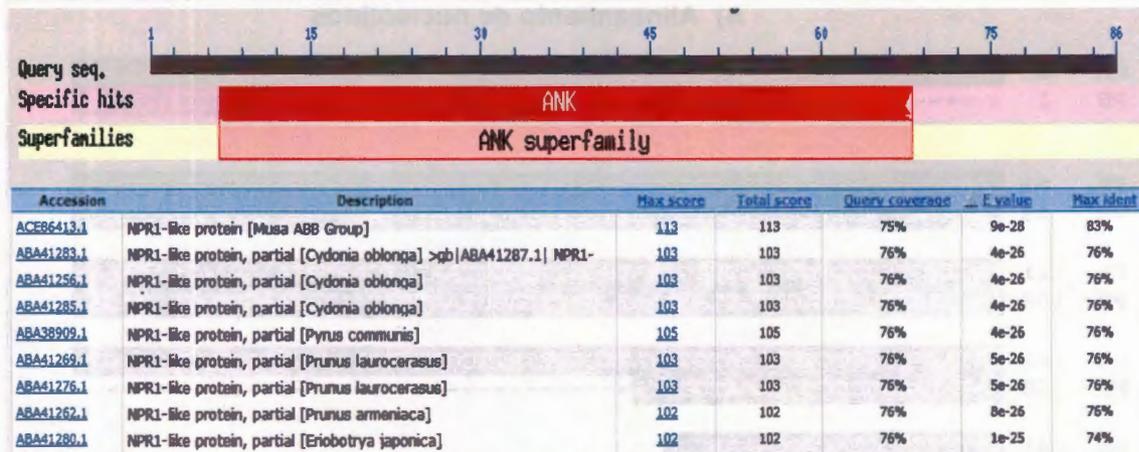
**Figura 2.11.** Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los 2 fragmentos clonados, productos de la amplificación del ADNc, del gen tipo *NPR1* de coco.

Posteriormente, con el propósito de saber si se trataban del mismo gen tipo *NPR1* de coco, se realizó el alineamiento de la secuencias nucleótidos (Figura 2.12A) y el alineamiento de la secuencia de aminoácidos (Figura 2.12B), empleando el programa CLUSTALW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) y fueron sombreados con el programa BOXSHADE ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).



**Figura 2.12.** Alineamiento de los 2 productos secuenciados, productos amplificados durante el estudio de expresión del gen *NPR1* de coco. a) Alineamiento de Nucleótidos. b). Alineamiento de Aminoácidos. PA. Producto A; PB. Producto B.

De acuerdo a estos resultados, se dedujo que se trataban del mismo fragmento (Producto A y Producto B), ya que se obtuvo un porcentaje del 100% en el alineamiento, tanto para nucleótidos como para aminoácidos. El análisis de la secuencia de aminoácidos (Producto B) con el Programa BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), nos mostró que la secuencia posee un 83% de identidad con una proteína NPR1 de Musa del grupo ABB y un valor de  $E=9e-28$ , al igual mostró similitud con la proteína NPR1 de *Cydonia oblonga* (76% de identidad y  $E=4e-26$ ), *Pyrus communis* (76% identidad,  $E=4e-26$ ), *Prunus laurocerasus* (76% identidad,  $E=5e-26$ ). Por lo que se deduce que los fragmentos amplificados durante el análisis de la expresión corresponden a un gen tipo *NPR1* de cocotero (Figura 2.13).



**Figura 2.13.** Resultados del análisis de la secuencia de aminoácidos del Producto A (86 aa). La secuencia de aminoácidos se ubica en el dominio repetido de ankirina del gen *NPR1*.

## 2.4 DISCUSIÓN

Múltiples estudios hechos en monocotiledóneas y dicotiledóneas han mostrado que el ácido salicílico juega un papel principal como molécula señal en SAR (Cao *et al.*, 1994; Le Henanff *et al.*, 2009). Después del ataque del patógeno, los niveles de SA incrementan local y sistemáticamente en plantas infectadas. Además, el SA es requerido para inducir la expresión de un conjunto de genes relacionados a patogénesis (*PR*) (Cao *et al.*, 1994, Gaffney *et al.*, 1993; Loake *et al.*, 2007). El principal regulador de esta resistencia mediada por SA, es el gen *NPR1*, el cual es funcionalmente conservado en diversas especies de plantas (Durrant and Dong, 2004), tales como: uva (Le Henanff *et al.*, 2009), tomate (Chen *et al.*, 2009), manzana (Malnoy *et al.*, 2007), banano (Endah *et al.*, 2008), algodón (Zhang *et al.*, 2008), tabaco (Liu *et al.*, 2002) y arroz (Yuan *et al.*, 2007). El alto grado de conservación funcional sugiere que la función de *NPR1* evolucionó muy pronto en el desarrollo de plantas superiores y que juega un papel fundamental en el desarrollo de la planta y su exitosa reproducción (Zi *et al.*, 2010). Sin embargo, los reportes previos sobre análisis de expresión basal de *NPR1* se enfocan a servir como una herramienta para identificar la presencia de este gen en estudios dirigidos a identificar los niveles de expresión de *NPR1* ante algún inductor (Cao *et al.*, 1998; Le Henanff *et al.*, 2009), o al ser sobreexpresadas (Manloy *et al.*, 2007).

En este trabajo, se reporta el estudio de la expresión semicuantitativa del gen tipo *NPR1* en plantas de cocotero, luego de ser sometidos a un tratamiento con ácido salicílico aplicando una concentración de 2.5 mM al medio líquido de cultivo Y3. El estudio de expresión fue hecho empleando cebadores diseñados a partir de un fragmento de 217 pb aislado de ADN genómico de un gen tipo *NPR1* de. En cuanto al nombre de esta pequeña secuencia aislada de cocotero (Narváez, 2010. Tesis de Maestría), se le nombró como gen tipo *NPR1*, debido al nombre científico de la especie de la cual fue aislada (*Cocos nucifera*) tal como se ha hecho con otros genes *NPR1* aislados de otras especies, por ejemplo *AtNPR1* de *Arabidopsis thaliana* y *MdNPR1* de *Musa spp. ABB* (Cao *et al.* 1997; Zhao *et al.*, 2008). El gen *NPR1* de arabidopsis, fue encontrado constitutivamente expresado en plantas no tratadas y fue moderadamente inducido mediante la aplicación de SA exógeno o análogo (Cao *et al.* 1997; Yuan *et al.*, 2007; Meura *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2007; Weigel *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2005).

En este estudio, igual que *NPR1* de arábidopsis, banano y cacao (Cao *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2008; Zi Shi *et al.*, 2010) el gen tipo *NPR1* de cocotero, se ha visto expresado constitutivamente en tejido de hoja y se ha observado un aumento en el nivel de expresión mediante la aplicación de SA exógeno. En cuando a los perfiles de expresión del gen tipo *NPR1* de cocotero, solamente fueron estudiados en tejido de hoja. El resultado observado de los tejidos de hoja tratados con SA, muestran un aumento en el nivel de expresión tal como ha visto en otras especies estudiadas, en cuanto que los controles, solamente se observó una constitutiva expresión basal. A pesar de haber observado una expresión variable del gen tipo *NPR1* de cocotero en las plantas tratadas con SA, se pudo determinar que en dos de los tejidos de hoja cosechados a las 24 h y 96 h, mostraron un nivel de expresión muy definido (Figura 2.10). El primer pico de expresión del gen tipo *NPR1* de cocotero, fue observado a las 24 h, similar al tiempo observado en arábidopsis (Cao *et al.*, 1997). Sin embargo, posteriormente, se observa que el pico de expresión disminuye a las 48 y 72 h, pero manteniendo siempre un nivel de expresión por encima de los controles. Posteriormente se observa, que a las 96 h, el pico de expresión aumenta nuevamente, algo muy poco visto en otras especies, donde se ha visto que después de alcanzar un máximo nivel de expresión, nuevamente disminuyen hasta alcanzar un nivel basal (Zhao *et al.*, 2008).

Nuestros resultados indican que el gen tipo *NPR1* de cocotero, fue constitutivamente expresado en bajos niveles, sin embargo, estos niveles pueden ser aumentados dos a tres veces después de ser sometido a tratamiento con SA, tal como se reporta en arábidopsis (Cao *et al.*, 1997; Ryals *et al.*, 1997). Posteriormente para descartar la posible duda de haber estado amplificando fragmentos inespecíficos, se secuenciaron dos de los productos observados de mayor expresión en este ensayo (24 y 96 horas) y de acuerdo a los resultados obtenidos después del análisis con el programa BLASTP de la base de datos del GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), los dos fragmentos mostraron un 100% de alineación entre ellas y un 83% de identidad con la proteína *NPR1* de Musa del grupo ABB y un valor de  $Expect=9e-28$ , al igual mostró similitud con la proteína *NPR1* de *Cydonia oblonga* (76% de identidad y  $Expect=4e-26$ ), *Pyrus communis* (76% identidad,  $E=4e-26$ ), *Prunus laurocerasus* (76% identidad,  $E=5e-26$ ). Por lo tanto, se dedujo que los fragmentos amplificados durante el estudio de expresión corresponden al fragmento de un gen tipo *NPR1* de cocotero, ubicado dentro del dominio conservado de ankirina.

Cabe recalcar que, el método de aplicación del SA y la concentración empleada en la planta de cocotero para el estudio de expresión del gen tipo *NPR1* de cocotero, fue diferente a los reportados en estudios anteriores, donde la aplicación de SA ha sido de manera asperjada sobre las hojas de las plantas y empleando una concentración de 1 mM, tal como banano (Zhao *et al.*, 2008), cacao (Zi Shi *et al.*, 2010), camote y arabidopsis (Chen *et al.*, 2009, Cao *et al.*, 1997) por mencionar algunos. Sin embargo, este trabajo contribuye al conocimiento de una forma alterna de aplicación de SA a la planta. Además de conocer, si los perfiles de expresión del gen tipo *NPR1* de cocotero se expresan similarmente a los reportados en estudios previos.

---

---

## 2.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alba Stella Riveros Angarita. (2001). Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 61 p. 4-11.
- Beakbane AB, Slater CHW, Osnette AF (1972). Mycoplasma in the phloem of coconut, *Cocos nucifera* L., with lethal yellowing disease. J. Hort. Sci. 47:265.
- Blanco F, Garretón V, Frey N, Dominguez C, Pérez-Acle T, Vander Straeten D, Jordana X, Holuigue L (2005). Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in Arabidopsis. Plant Mol Biol, 59: 927-944.
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X (1994). Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. Plant Cell, 6(11):1583-1592.
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. Cell, 88(1):57-63.
- Cao H, Li X, Dong X (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proc Natl Acad Sci USA, 95(11):6531-6536.
- Chen YY, Lin YM, Chao TC, Wang JF, Liu AC, Ho FI, Cheng CP (2009). Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. Physiol Plant, 136(3):324-335.
- Dong X: NPR1, all things considered (2004). Curr Opin Plant Biol, 7(5):547-552.
- Durrant WE, Dong X: Systemic acquired resistance (2004). Annu Rev Phytopathol. 42:185-209.
- Endah R, Beyene G, Kiggundu A, van den Berg N, Schluter U, Kunert K, Chikwamba R (2008). Elicitor and Fusarium-induced expression of NPR1-like genes in banana. Plant Physiol Biochem, 46(11):1007-1014.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. Science, 261(5122):754-756.
- Gobierno del Estado de Colima. (2005). Paquetes Tecnológicos para cultivos Agrícolas, en el estado de Colima. Disponible en línea: [seder.col.gob.mx/paquetes/COCO.pdf](http://seder.col.gob.mx/paquetes/COCO.pdf).
- Gutiérrez, CY (2009). Proyecto de desarrollo productivo cadena de valor frutícola. Análisis del mercado para coco. Millennium Challenge Corporation. Pp. 1-6.

- Harrison N., Oropeza, C. (1997). Recent advances in diagnosis and detection of lethal yellowing in the Americas. Pp 221-234 in International Workshop on Lethal Yellowing-Like Disease of Coconut, Elmina, Ghana, November 1995 (S. J. Eden-Green y F. Ofori, eds.). Natural Resources Institute, Chatham, UK.
- Harrison NA, Oropeza C (2008). Coconut lethal yellowing In: NA Harrison GP, Rao y C Marcone (Eds.). Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas. Studium Press LLC, Houston, USA pp 219-248.
- Heath MC (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol.* 44(3):321-334.
- Hepworth S.R., Y. Zhang, S. Mckim, X. Li y G.W. Haughn. (2005). Blade-On-Petiole-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17, Pp. 1434-1448.
- Howard, W, Noris RC, Thomas DL (1982). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus*. *Trop Agric.* 60:168-171.
- Kramer, J. P. (1979). Taxonomic study of the planthopper genus *Myndus* in the Americas (Homoptera: Fulgoroidea: Cixiidae). *Trans. American Entomol. Soc.* 105: 3 Plan de Contingencia contra el ALC.
- Lao DA (2008). Coco Biodiesel more than a Diesel Replacement. Bioenergy Forum 2008, Bangkok OK, 28 April 2008.
- Lao DA. (2009). Coco-biodiesel in the Philippines. In: Coconut Philippines
- Le Henanff G, Heitz T, Mestre P, Mutterer J, Walter B, Chong J (2009). Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. *BMC Plant Biol.* 9:54.
- Liu G., E.B. Holub, J.M. Alonso, J.R. Ecker y P.R. Fobert. (2005). An *Arabidopsis* NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. *The Plant Journal* 41(2), 304-318.
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP (2002). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, 30(4):415-429.
- Loake G, Grant M (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol*, 10(5):466-472.
- Malnoy M, Jin Q, Borejsza-Wysocka EE, He SY, Aldwinckle HS (2007). Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Mol Plant Microbe Interact*, 20(12):1568-1580.
- McCoy RE, (1972). Remission of lethal yellowing in coconut palms treated with tetracycline antibiotics. *Plant Disease Reporter* 56: 1019-1021.

- McCoy RE, Howard FW, Tsai M, Donselman HM, Thomas DL, Basham HG, Atilano RA, Eskafi FM, Britt L, Collins ME, (1983). Lethal yellowing of palms. Univ. Florida Agric. Exp. Sta. Tech Bull No 834.
- Meura G, Budathab M, Guptab AD, Prakashc S, Kirti P B (2006). Differential induction of NPR1 during defense responses in Brassica juncea. *Physiol Mol Plant Pathol*, 68: 128–137.
- Mukhtar MS, Nishimura MT, Dangl J (2009). NPR1 in plant defense: It's not over 'til it's turned over. *Cell*, 137(5):804-806.
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot*, 59(3):501-520.
- Narváez Cab, M. (2010). Tesis de maestría: INDUCCIÓN DE SAR EN PLANTAS DE COCOTERO INFECTADAS CON *PHYTOPHTHORA CAPCISI*.
- Nkansah Poku, J., Philippe, R., Quaicoe, RN., Dery, SK., Arthur, R (2009). Cape Saint Paul Wilt Disease of Coconut in Ghana: Surveillance and management of disease spread. In: Jean-Claude Legoupil (Ed.), *Proceedings of the International Workshop on Lethal yellowing Diseases on Coconut*. Ghana, Accra 3-6 June 2008. FARA, Accra, Ghana Pp. 144-152.
- Oropeza, C., Mora, G., Harrison, N.A., Roca, M.M., Myrie, W., Sáenz, L., Narváez, M., Córdova, L (2009). Epidemiological Studies of Floema Lethal Yellowing in the Americas. In: Jean Claude Legoupil (Ed.), *Proceedings of the International workshop on Lethal Yellowing Diseases on coco in Ghana*, Accra 3-6 June 2008. FARA, Accra, Ghana Pp. 183-193.
- Pieterse C.M.J. y L.C. Van Loon. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 456–464.
- Prusky D., I. Kobiler, R. Ardi, D. Beno-Moalem, N. Yakoby y N.T. Keen. (2000). *Resistance mechanisms of Subtropical Fruits to Colletotrichum gloesporioides*. Cap 14. En: *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction*. D. Prusky, S. Freeman y M. Dickman (eds). American Phytopathological Society Press, 232-244.
- Ryals J, Weymann K, Lawton K, Friedrich L, Ellis D, Steiner HY, Johnson J, Delaney TP, Jesse T, Vos P, *et al* (1997): The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *Plant Cell*, 9(3):425-439.
- Tang Y-M (唐益苗), Zhang Z-Y (张增艳), Xin Z-Y (辛志勇) (2007). Isolation and characterization of NPR1 homolog gene TiNH1 in *Thinopyrum intermedium*. *Sci Agric Sin (中国农业科)*, 40(6): 1101–1107 (in Chinese with English abstract).
- Villanueva-Barradas, J. (1991). Informe de la visita del Dr. Juan Villanueva Barradas, Consultor de OIRSA, a los países de Centro América en relación con el

Amarillamiento letal del cocotero. Junio 30 al 26 de jio de 990. Organismo InteARNc Reg. De San. Agropec. México D. F., Méx.

Weigel R R, Bäuscher C, Pfitzner A J, Pfitzner U M (2001). NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from Arabidopsis that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. *Plant Mol Biol*, 46: 143–160

Yuan Y, Zhong S, Li Q, Zhu Z, Lou Y, Wang L, Wang J, Wang M, Yang D, He Z (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnol J* 2007, 5(2):313-324.

Zhang Y., Y.T. Cheng, N. Qu, Q. Zhao, D. Bi y X. Li. (2006). Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two *NPR1* paralogs. *The Plant JouARNI*, 48 8(5). 647-656.

Zhang Y, Wang X, Cheng C, Gao Q, Liu J, Guo X (2008).Molecular cloning and characterization of GhNPR1, a gene implicated in pathogen responses from cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Biosci Rep*, 28(1):7-14.

Zhao JT, Huang X, Chen YP, Chen YF and Huang XL (2008).Molecular cloning and Characterization of an Ortholog of *NPR1* Gene from Dongguan Dajiao (*Musa* spp.ABB). *Plant Mol Biol. Rep.*

Zi Shi 1, Siela N Maximova 2, Yi Liu 1, Joseph Verica 2, Mark J Guiltinan 1,2\* (2010). Functional analysis of the theobroma cacao NPR1 gene in Arabidopsis. Shi *et al.* *BMC Plant Biology* 2010, 10:248. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/248>.



## CAPÍTULO III

AISLAMIENTO DEL EXTREMO 3' TERMINAL DEL GEN *NPR1* DE LA PALMA DE COCOTERO

## 3.1 INTRODUCCIÓN

Actualmente se sabe que el gen *NPR1*, es un gen clave en la resistencia sistémica adquirida (SAR). Este gen fue identificado por primera vez en 1994 y posteriormente fue clonado en 1997, a partir de una planta mutante de *Arabidopsis*, la cual falló en la expresión de genes *PR*, después de la inducción de SAR, por lo que se le denominó "No-expresivo de genes *PR-1*" (Cao *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1994). Posteriormente se ha logrado dilucidar la estructura de la proteína *NPR1*, la cual posee una secuencia de localización nuclear bipartita y dos dominios de interacción proteína-proteína: un dominio repetido de ankirina y un dominio BTB/POZ (Cao *et al.*, 1997). La localización nuclear de *NPR1* es esencial para su función en la inducción de la expresión de genes *PR* (Kinkema *et al.*, 2000). *NPR1* se encuentra localizado en el citoplasma en una forma oligomérica (inactivo) y dentro del núcleo en su forma monomérica (activa), los cambios conformacionales son inducidos debido a que la acumulación de SA provoca un cambio en el potencial redox dentro del citoplasma, induciendo el rompimiento de los puentes disulfuro del oligómero y activando de esta manera a la proteína *NPR1* (Liu *et al.*, 2005; Durant and Dong, 2004; Pieterse y Van Loon, 2004; Kinkema *et al.*, 2000).

De acuerdo a la información que se tiene del gen *NPR1*, se han venido realizando varios trabajos de sobreexpresión tal es el caso, en donde el gen *AtNPR1* de *Arabidopsis thaliana* fue sobreexpresado en las especies de arroz, tomate, trigo y manzana, mostrando un aumento de resistencia contra hongos y bacterias (Cao *et al.*, 1998; Chern *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2004; Makandar *et al.*, 2006; Malnoy *et al.*, 2007). Por lo tanto, *NPR1* representa un blanco ideal para la ingeniería en resistencia de amplio espectro a patógenos en la agricultura. Además, un estudio con *NPR1* de arroz reveló, que aunque arroz y *Arabidopsis* comparten rutas de defensa conservadas, la regulación de esas rutas y la unión a otras rutas de plantas pueden ser divergentes (Chern *et al.*, 2005).

Por lo que es necesario la identificación, aislamiento y caracterización de homólogos de *NPR1* en otras especies de plantas, particularmente plantas monocotiledóneas. Como se mencionó en el capítulo anterior, se ha logrado aislar un fragmento de un gen tipo *NPR1* en cocotero, el cual es inducido por SA, teniendo con ello las primeras evidencias de este gen en *Cocos nucifera* L.

Por lo tanto el objetivo de este capítulo, fue el aislamiento e identificación del extremo 3' terminal del gen tipo *NPR1* de cocotero a partir de ADNc, empleando el kit comercial GeneRacer (Invitrogen). Como primer paso se diseñaron nuevos cebadores específicos de esta secuencia previamente aislada con cebadores degenerados (Narváez, 2010. Tesis de Maestría). Posteriormente se empleó ARN de una planta que anteriormente en los análisis de expresión mostró un mayor nivel del gen tipo *NPR1*. Luego los fragmentos amplificados, fueron secuenciados y posteriormente analizados con el Programa BLASTP, para determinar el porcentaje de identidad con secuencias homólogas de genes *NPR1* caracterizadas en otras especies de plantas. Por último, se identificaron los dominios conservados y se realizaron los análisis filogenéticos correspondientes para sustentar las relaciones filogenéticas con genes *NPR1* descritos.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 DISEÑO DE CEBADORES

Previo al aislamiento del extremo 3' terminal del gen tipo *NPR1* en cocotero, es de considerarse que para este aislamiento únicamente se requiere, la secuencia Forward (sentido) del cebador, de acuerdo a las recomendaciones sugeridas en el manual empleado del GeneRacer (Invitrogen). Por lo tanto, antes de iniciar con el aislamiento, se realizó el diseño de tres cebadores (Forward), a partir de la secuencia previamente aislada del ADN genómico de la palma de cocotero (Narváez, 2010. Tesis de Maestría). Los cebadores se diseñaron de acuerdo a las características sugeridas en el manual del GeneRacer (Invitrogen), el cual nos indica que cada cebador debe poseer las siguientes características:

- Un porcentaje de 50-70% de GC para obtener una alta temperatura de alineamiento.
- Una longitud de 23-28 nucleótidos para incrementar la especificidad.
- Bajo contenido de GC en el 3' terminal (no más que dos residuos de G o C en las últimas cinco bases).
- Una temperatura de alineamiento mayor a 72°C. Para aumentar la especificidad de la PCR y permita el uso de un Touchdown PCR.

Estos tres cebadores fueron previamente diseñados manualmente empleando la siguiente formula sugerida de acuerdo al manual del GeneRacer:

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$$

Posteriormente las secuencias de estos cebadores fueron introducidos a un programa denominado Oligo-Analyzer (V.1.0.2), para verificar que cumplan con las características antes mencionadas.

### **3.2.2 UBICACIÓN DE LOS CEBADORES EN EL FRAGMENTO DEL GEN TIPO *NPR1* DE COCOTERO AISLADO DE ADN GENÓMICO DE COCOTERO**

Los tres cebadores (Forward), fueron ubicados dentro la secuencia del fragmento del gen tipo *NPR1* aislado del ADN genómico de cocotero (Narváez, 2010. Tesis de Maestría). La ubicación de estos cebadores, fue con la finalidad de determinar cuál de ellos debía ser empleado para la primera reacción de amplificación (GeneRacer PCR) y de ser necesario, cuál de ellos iba a ser empleado en una posible segunda reacción de amplificación (GeneRacer Nestéd-PCR).

### **3.2.3 ANÁLISIS DE LOS CEBADORES EN EL GENE BANK**

Después del diseño y la ubicación de los cebadores, estos, fueron analizados empleando el programa BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con la finalidad de determinar el porcentaje de identidad de cada uno de los cebadores con genes homólogos de *NPR1* caracterizados en otras especies de plantas.

### **3.2.4 PREDICCIÓN DEL EXTREMO 3' TERMINAL DEL GEN TIPO *NPR1* DE COCOTERO**

Posteriormente, se optó por hacer un alineamiento de la secuencia de aminoácidos del fragmento aislado del ADN genómico de cocotero (Narváez, 2010. Tesis de maestría), con las secuencia de aminoácidos de los homólogos de MdNPR1 de musa spp. ABB [Dongguan Dajiao] (FJ357442) y OsNPR1 de arroz [*Oryza sativa* Japónica Group] (AY923983.1). Se seleccionaron estas dos secuencias homólogas, debido a que pertenecen al grupo de las monocotiledóneas, igual que la palma de cocotero (*Cocos nucífera* L.). Por lo tanto, el objetivo de este alineamiento fue para deducir el tamaño aproximado del extremo 3' terminal faltante. El alineamiento fue realizado empleando el programa BOXSHADE (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>).

### 3.2.5 EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción del ARN fue realizada empleando el protocolo estandarizado en el capítulo anterior (Ver materiales y métodos del capítulo 2), en el cual se observó que el ARN extraído de los tejidos de hoja sometidos a tratamiento con ácido salicílico (24 horas y 96 horas), mostró un cambio en el nivel de expresión del gen tipo *NPR1* de cocotero, respecto a los controles. Basándonos en este resultado, se descongeló únicamente el ARN extraído del tiempo de 96 horas (almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) y posteriormente fue tratado con la enzima ADNasa I (Ambión). Por último el ARN fue fraccionado en un gel de agarosa al 1%.

### 3.2.6 SÍNTESIS DE ADNc

Posteriormente se realizó la síntesis del ADNc, de acuerdo al manual del GeneRacer, en el cual se sugieren 2 protocolos: la Retrotranscriptasa SuperScript™ III RT y la Retrotranscriptasa Cloned AMV RT. En este caso se optó por el protocolo del Cloned AMV RT, en el cual fueron empleados Oligo dT (GeneRacer™ Oligo dT Primer Sequence) para la síntesis de la primera cadena. Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de Oligo dT (50  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla de dNTP (10 mM) a 2  $\mu\text{L}$  del ARN total (3  $\mu\text{g}$ ) y seguidamente se aforó a un volumen de 12  $\mu\text{L}$  (agua libre de nucleasas), seguidamente se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Luego se colocó en hielo por 2 minutos y se centrifugó brevemente; posteriormente se agregó 4  $\mu\text{L}$  del buffer 5X RT (250 mM Tris acetato, pH 8.4; 375 mM acetato de potasio; 40 mM acetato de magnesio; estabilizador y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA), 1  $\mu\text{L}$  de la enzima Cloned AMV RT (15 U/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  agua estéril y 1  $\mu\text{L}$  de ARNsaOut™ (40 U/ $\mu\text{L}$ ) para un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ , seguidamente se mezcló brevemente y fue incubado a  $45^{\circ}\text{C}$  por 1 hora y luego se inactivó la enzima Cloned AMV RT a  $85^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. El ADNc fue fraccionado en un gel de agarosa al 1%.

### 3.2.7 AISLAMIENTO DEL EXTREMO 3' TERMINAL DEL GEN TIPO *NPR1* (FRAGMENTO 1)

#### 3.2.7.1 PRIMERA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN (GeneRacer PCR)

La primera reacción de amplificación (GeneRacer PCR) fue hecho empleando el Forward del cebador *NPR1-A*. Las condiciones para la preparación de la mezcla, fueron tomadas del manual del GeneRacer (Invitrogen) para un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  (Cuadro 3.1).

**Cuadro 3.1.** Condiciones para la preparación de la mezcla de la primera reacción para el aislamiento del extremo 3' terminal.

Reactivos	Volumen
RT Templado	2 $\mu\text{L}$
Agua estéril	12.3 $\mu\text{L}$
10X Buffer (- $\text{MgCl}_2$ )	5 $\mu\text{L}$
$\text{MgCl}_2$ (50 mM)	1 $\mu\text{L}$
Mezcla de dNTPs (10 mM)	0.5 $\mu\text{L}$
GeneRacer™ 3' Primer, 10 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{L}$
(Forward) A. 10 $\mu\text{M}$	2 $\mu\text{L}$
Taq ADN Polymerasa	0.2 $\mu\text{L}$
<b>Volumen Total</b>	<b>25 <math>\mu\text{L}</math></b>

En cuanto a las condiciones de temperatura de hibridación para este cebador, se emplearon dos temperaturas (70°C y 72°C), para así, poder determinar cual de ellas mostraba mejores resultados. El programa empleado para esta primera reacción, se basó del recomendado en el manual del GeneRacer (Cuadro 3.2). Posteriormente, el producto amplificado fue fraccionado en un gel de agarosa al 2%, empleando una cámara electroforética a 90V y 175°A.

**Cuadro 3.2.** Condiciones de temperatura empleadas para la primera reacción de amplificación del extremo 3' terminal.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	2 minutos	1
94	30 segundos	5
72	1:30 minutos	
94	30 segundos	5
70	1:30 minutos	
94	30 segundos	
<b>70 / 72</b>	30 segundos	25
72	1:30 minutos	
72	10 minutos	1

### 3.2.7.2 SEGUNDA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN (GeneRacer-Nested PCR)

De acuerdo al resultado observado en la primera reacción de amplificación (no hubo ningún fragmento definido), se optó por realizar una segunda reacción de amplificación (GeneRacer-Nested PCR). Para esta segunda reacción de amplificación, se optó por emplear el cebador NPR1-B (debido a la posición en la que fue diseñado ver figura 3.1). Las condiciones para la preparación de la mezcla de reacción, fueron tomadas del manual del GeneRacer para un volumen final de 25  $\mu$ L (Ver cuadro 3.3).

**Cuadro 3.3.** Condiciones empleadas para la preparación de la mezcla en la segunda de reacción de amplificación del extremo 3' terminal.

Reactivos	Volumen
Producto de la 1ª Amplificación	2 µL
Agua estéril	12.3 µL
10X Buffer (-MgCl <sub>2</sub> )	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 µL
Mezcla de dNTPs (10 mM)	0.5 µL
GeneRacer™ 3' Nested (10 µM)	2 µL
<b>(Forward)-B (10 µM)</b>	2 µL
Taq ADN Polimerasa	0.2 µL
<b>Volumen Total</b>	<b>25 µL</b>

El programa de temperaturas para esta segunda reacción de amplificación fue tomado del manual del GeneRacer, sin embargo, para este cebador, se probaron tres diferentes temperaturas de hibridación: 66°C, 68°C y 70°C (Ver cuadro 3.4), con la finalidad de determinar cual de ellas mostraba mejores resultados. El producto amplificado fue fraccionado en un gel de agarosa al 1.5%.

**Cuadro 3.4.** Condiciones de temperatura empleadas para la segunda reacción de amplificación del extremo 3' terminal.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	2 minutos	1
94	30 segundos	
<b>66, 68, 70</b>	30 segundos	25
72	2 minutos	
72	10 minutos	1

Posteriormente, también se empleó el cebador NPR1-C, para reamplificar el producto obtenido con el cebador NPR1-A. Las condiciones para la preparación de la mezcla y las temperaturas de hibridación fueron las mismas que se emplearon para el cebador NPR1-B (Ver cuadro 3.3 y cuadro 3.4).

### 3.2.8 AISLAMIENTO DEL EXTREMO 3' TERMINAL DEL GEN TIPO *NPR1* DE COCOTERO (FRAGMENTO 2)

Luego de observar el tamaño del fragmento que se obtuvo en las amplificaciones anteriores (FRAGMENTO 1), se optó por intentar aislar nuevamente otro fragmento del extremo 3' terminal, partiendo nuevamente del ADNc (96 horas). Las condiciones para la preparación de la mezcla para esta primera reacción de amplificación (GeneRacer PCR), fueron las mismas empleadas con anterioridad, excepto que para esta reacción, se empleó el cebador *NPR1-B* (ver cuadro 3.1). El programa de temperatura fue el mismo, sin embargo, la temperatura de hibridación empleada fue solo la de 68°C (ver cuadro 3.2). El producto amplificado fue fraccionado en un gel de agarosa al 1.5%, empleando una cámara electroforética a 95V y 175A.

Posteriormente de acuerdo al resultado obtenido de esta primera reacción de amplificación, se logró observar un fragmento de un tamaño aproximado de 1,200 pb, sin embargo, hubo ciertos fragmentos inespecíficos, por lo que fue necesario realizar una reamplificación del primer producto (GeneRacer-Nested PCR). En cuando a las condiciones para la preparación de la mezcla y las condiciones de temperaturas hbridación fueron las mismas empleadas anteriormente (Ver cuadro 3.3 y 3.4), excepto que en esta segunda reacción de amplificación se empleó el cebador *NPR1-C* en la mezcla y la temperatura de hibridación empleada fue de 68°C. Por último, el producto de esta amplificación, fue fraccionado en un gel de agarosa al 1.5%.

### 3.2.9 CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DEL EXTREMO 3' TERMINAL

En total, fueron tres los fragmentos amplificados del extremo 3' terminal, los cuales fueron nombrados de acuerdo al orden en el cual fueron amplificados (Fragmento 1, fue el de aproximadamente 500 pb; Fragmento 2, es el de aproximadamente 1,200 pb y el Fragmento 3, es el de aproximadamente 1,100 pb). Previo a la clonación, los productos amplificados fueron purificados con el kit de purificación QIAquick (QIAGEN). El protocolo de clonación, fue el mismo que se empleó para clonar los fragmentos amplificados en la expresión del gen tipo *NPR1* de cocotero en el capítulo anterior (Ver Materiales y métodos del capítulo 2, Sección 2.2.9)

### **3.2.10 ANÁLISIS Y OBTENCIÓN DE LAS ORF'S DE LOS FRAGMENTOS CLONADOS**

Para obtener el marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) de las secuencias aisladas, éstas, fueron sometidas al programa TRASLATE de BIOTOOL-Expasy (<http://web.expasy.org/translate/>) posteriormente fueron alineadas, empleando el programa CLUSTALW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) y sombreadas con el programa BOXSHADE ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)), con la finalidad determinar el tamaño total de la secuencia de aminoácidos del extremo 3' terminal aislado.

### **3.2.11 ALINEAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS CONSERVADOS DEL EXTREMO 3' TERMINAL DEL GEN TIPO *NPR1* DE COCOTERO**

Se realizó el alineamiento de la secuencia de aminoácidos la proteína tipo *NPR1* de cocotero, con las secuencias de aminoácidos de las proteínas de *MdNPR1* (FJ357442), *OsNPR1* (AY923983.1), *ZmNPR1* (NM001154115.1) y *AtNPR1* (U76707.1), con la finalidad de identificar si este extremo aislado presenta alguno de los dominios conservados de la proteína *NPR1* (Dominios BTB/POZ y ANKIRINA). El alineamiento fue realizado con el programa CLUSTALW (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) y posteriormente sombreado con el programa BOXSHADE ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

### **3.2.12 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL EXTREMO 3' TERMINAL DEL GEN TIPO *NPR1* DE COCOTERO**

Para análisis filogenético se emplearon 35 secuencias homólogas *NPR1* de diferentes especies de plantas. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) y un análisis de bootstrap con 1000 réplicas. Este análisis filogenético fue realizado utilizando el software MEGA v. 5.0. Para este análisis, se emplearon las secuencias de aminoácidos de las familias de proteínas tipo *NPR1* de *Arabidopsis thaliana* (seis miembros), *Oryza sativa* (cinco miembros) y *Carica papaya* (cuatro miembros).

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 CEBADORES DISEÑADOS PARA EL AISLAMIENTO DEL EXTREMO 3' TERMINAL DEL GEN TIPO *NPR1* DE COCOTERO

Los tres cebadores diseñados fueron nombrados como: NPR1-A, NPR1-B y NPR1-C. Las características de los tres cebadores, luego de ser analizados con el programa Oligo-Analyzer, se describen a continuación (Cuadro 3.5).

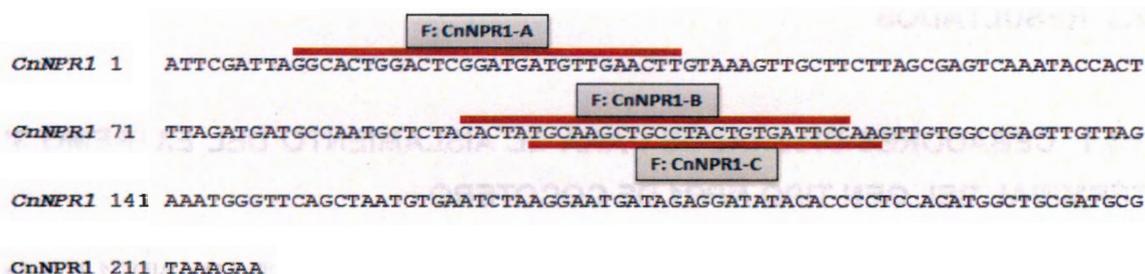
**Cuadro 3.5.** Características de los cebadores empleados para el aislamiento del extremo 3' terminal del gen tipo *NPR1*.

Cebador	Secuencia (Forward)	Tamaño	Tm (°C)	%GC	ES
<b>NPR1-A</b>	GGCACTGGACTCGGATGATGTTGAACTT	28 pb	72	50	No
<b>NPR1-B</b>	CACTATGCAGCTGCCTACTGTGATTCC	27 pb	68	52	No
<b>NPR1-C</b>	TGCAGCTGCCTACTGTGATTCAA	24 pb	68	50	No

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

#### 3.3.2 POSICIÓN DE LOS CEBADORES EN EL FRAGMENTO DEL GEN TIPO *NPR1* AISLADO DEL ADN GENÓMICO

La posición de los tres cebadores, fue la siguiente, el primer cebador denominado NPR1-A, fue ubicado al inicio del fragmento, a partir del nucleótido 9 al nucleótido 37. El segundo cebador denominado NPR1-B, se ubicó en la parte central del fragmento, a partir del nucleótido 92 al nucleótido 119. El tercer cebador denominado NPR1-C, también fue ubicado en la parte central del fragmento, a partir del nucleótido 97 al nucleótido 121 (Figura 3.1). De acuerdo a las posiciones de los cebadores, se optó por emplear el cebador NPR1-A para la primera reacción de amplificación (GeneRacer PCR) y los Cebadores NPR1-B y NPR1-C para una segunda reacción de amplificación (GeneRacer-Nested PCR).



**Figura 3.1.** Imagen representativa de la posición de los tres cebadores diseñados (Forward), dentro de la secuencia del fragmento inicial del gen tipo *NPR1* de cocotero (amplicón de 217 pb) y posteriormente empleados en el aislamiento del extremo 3' terminal.

### 3.3.3 ANÁLISIS DE LOS CEBADORES EN EL GENE BANK

El resultado del análisis de los cebadores con la base de datos del GenBank, fueron los siguientes: El primer cebador NPR1-A, mostró un porcentaje de identidad de 96% con el gen *NPR1* de *Pyrus communis* ( $Exp= 0.001$ ) y 100% de identidad con el gen *NPR1* de *Cydonia oblonga* ( $Exp= 0.004$ ). El segundo cebador NPR1-B, mostró un porcentaje de identidad de 96% con el gen *NPR1* de *Mussa del grupo ABB* ( $Exp= 0.004$ ) y 92% de identidad con el gen *NPR1* de *Oryza sativa* ( $Exp= 4.2$ ). El tercer cebador NPR1-C, mostró un porcentaje de identidad de 96% con el gen *NPR1* de *Mussa del grupo ABB* ( $Exp= 0.17$ ). Esto nos indicó que los tres cebadores diseñados mostraron un cierto porcentaje de identidad con genes homólogos de *NPR1* caracterizados en otras especies de plantas (Cuadro 3.6).

**Cuadro 3.6** Resultados del análisis de los tres cebadores en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Cebador	# Accesoión	Especie	Valor de E	% Identidad
NPR1-A	DQ149930	<i>Pyrus communis-NPR1-like protein mRNA</i>	0.001	96
	DQ149962	<i>Cydonia oblonga-NPR1-like protein mRNA</i>	0.004	100
NPR1-B	EU747883	<i>Musa ABB Group NPR1-like protein mRNA</i>	0.004	96
	DQ152832	<i>Platanus x acerifolia NPR1-like protein mRNA</i>	0.27	96
NPR1-C	EU747883	<i>Musa ABB Group NPR1-like protein mRNA</i>	0.17	96
	XM003569852	<i>Brachypodium distachyon regulatory protein NPR3-like</i>	10	95

### 3.3.4 DEDUCCIÓN DEL EXTREMO 3' TERMINAL DEL GEN TIPO NPR1 DE COCOTERO

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los genes *NPR1* de arroz (*OsNPR1*) y banano (*MdNPR1*), junto con los 69 aminoácidos de la secuencia inicial del gen tipo *NPR1* de cocotero (Narváez, 2010. Tesis de Maestría), nos permitió determinar una aproximación del extremo 3' terminal faltante (Figura 3.2).

Mus sa	1	MENFTEPSSSISFASSSYLNGSSAYHPGCTADSPSPPPAAPGGTINLEVLSISKSSST
OsNPR1	1	-----MEPPTSHTVTFNSDSDSASVEEGDADADAVEAIVRLSDH
CnNPR1	1	-----
Mus sa	61	EHLLLOTG--FDCTRETAVECTPVG-----THRCTLAARSREFEEDTSS--EGSGGN
OsNPR1	41	AAAFRSPDFAFLADRIAMPGGGSGDLRVHRCVLSARSPELQVFAARRAAADSG
CnNPR1	1	-----
Mus sa	111	ROECKERVYVNSLDPGG-----RIGREALMFLSYLYTGKRAAEQDVSICVDFECAHDIC
OsNPR1	101	GECSSELEDFEILGCGCEVEVGVYADRIVLDYLYSCRIGDLKAAACGVDEDCAHVGC
CnNPR1	1	-----
Mus sa	167	RPAIGFAVELLYRNSVFTAEIVSLICORRLINLVDRAMTDDVITLQVASHS--KLNQIT
OsNPR1	161	HPAVAFMAQVLEAASFEVAVELINTECORRLIDVDKVEITNITLILSVANLCKNSCKMIL
CnNPR1	1	-----
Mus sa	225	SHVQPNARSCLLDVSELDLPOEVAEIRLLRESQPKESTATVDEMLETRIKGIRIHAL
OsNPR1	221	ERLDNVVRSNLDMIILERSLIPFNKQITDASLSGLISPENKGFEN--FHVRAIIEHAL
CnNPR1	1	-----AL
Mus sa	285	DSDDVELVKLLSESCTLDDAALHYAAAYCDSKVVAELLDLGSANVNLNRDGYTPLH
OsNPR1	279	DSDDVELVRLLEGGTINLDDAALHYAVEHCDSKITTELLDLADVNHRNDRGYTQLH
CnNPR1	3	DSDDVELVKLLSESCTTLDAAALHYAAAYCDSKVVAELLENGSANVNLNRDGYTPLH
Mus sa	345	LAAMREFAVTVSLLTFGASALSTADGQNAVRCORRLTRAKQYETRETCGQESNPNKIC
OsNPR1	339	LAARREPKLIVSLLTKGARPAVTEFGKAVQISKRLTKQCYEGVTDECKPSPEDRLC
CnNPR1	63	LAAMRKE-----
Mus sa	405	ITILERMNRLAVDSASPLLDIDIMKLLYLENRVAFARFFFAEAKLAMEIAHAN
OsNPR1	399	ITILEQAERNDFQLQEASVSLAACESSLNGLLLYLENRVALARIMFMEANVAMIAQVD
CnNPR1	70	-----
Mus sa	465	ITSEETG--ITKSRSSLRDVLNETFVQNKRLRSVDALSKTVELGRYFHCSTL
OsNPR1	459	CTLEENLGSGENPPPERRTTVDLNESEFMKEEHLARITLSKTVELCKRFPRCSNVL
CnNPR1	70	-----
Mus sa	523	DFLEDELFDNYLQKGTPEQKVELRQCELDKSDVRKAFSKQFAGSLLLGLSSSSSTSS
OsNPR1	519	DFIMDETDFNSLGR----ITSAEFKRPHDLOVLCARHEEHEENDRSGLSSSSSTSS
CnNPR1	70	-----
Mus sa	583	PKSEEKYEMVARN
OsNPR1	575	IGAIRP-----
CnNPR1	70	-----

Figura 3.2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos homólogos de NPR1 de banano, arroz y coco. El rectángulo rojo, muestra el sitio donde la secuencia conocida de coco (69 aa) se alinea con estas secuencias, mostrando así, el tamaño aproximado de los extremos terminales por aislar.

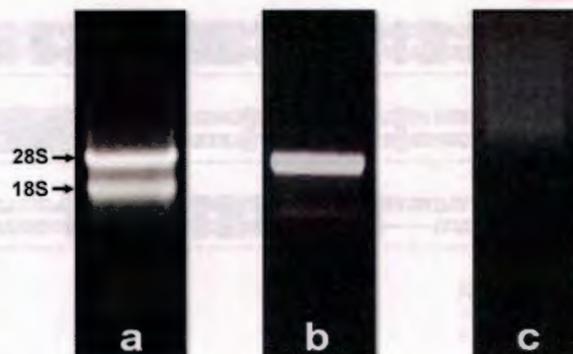
De acuerdo al alineamiento observado en la figura anterior, se dedujo el tamaño aproximado del extremo 3' terminal faltante, así como el extremo 5' terminal (Cuadro 3.7).

**Cuadro 3.7.** Secuencias empleadas como referencia para determinar el tamaño de los extremos 3' y 5' terminales del gen tipo *NPR1* de coco. El sombreado gris, muestra el tamaño del fragmento aislado del ADN genómico y las partes no sombreadas, muestran los tamaños aproximados de los extremos faltantes.

Gen	Extremo 3'	<i>NPR1</i>	Extremo 5'	Tamaño
Arroz (AY923983.1)	237 aa	69aa	276 aa	582 aa
Banano (FJ357442)	244 aa	69aa	282 aa	526 aa

### 3.3.5 EXTRACCIÓN DEL ARN Y SÍNTESIS DE ADNc

El ARN descongelado fue fraccionado en un gel de agarosa y se observó que presentaba una ligera contaminación con ADN (Figura 3.3a). Sin embargo después del tratamiento con la enzima ADNsa I (Ambión), se logró eliminar la presencia del ADN contaminante (Figura 3.3b). La cuantificación de este ARN total, mostró una concentración de 1.5 µg/µL, por lo que fue adecuado para la síntesis de ADNc. La síntesis de ADNc empleando el protocolo recomendado por el manual del GeneRacer (Cloned AMV RT) fue correctamente realizado, tal como se puede observar en la Figura 3.3c.

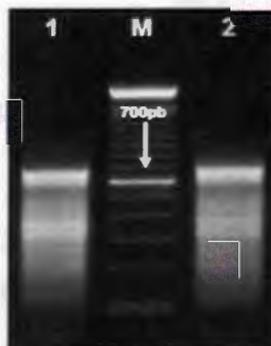


**Figura 3.3.** Muestra de ARN empleado para el aislamiento del extremo terminal 3'. a) ARN total después de ser descongelado (96 horas) con presencia de ADN contaminante. b) ARN previamente tratado con ADNsa I (Ambión). c) ADNc sintetizado con la enzima Cloned AMV RT empleando 3µg de ARN total.

### 3.3.6 AISLAMIENTO DEL EXTREMO 3' TERMINAL DEL GEN TIPO *NPR1* DE COCOTERO (FRAGMENTO 1)

#### 3.3.6.1 PRIMERA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN (GeneRacer PCR)

El resultado de la primera amplificación (GeneRacer PCR) empleando el cebador NPR1-A se observa en la figura 3.4, en el cual se muestra los productos obtenidos de las dos temperaturas de hibridación probadas. En el carril 1, se observa el producto amplificado con una temperatura de hibridación de 70°C y se observan algunos fragmentos amplificados de aproximadamente 700 pb. En el carril 2, se observa el producto amplificado con una temperatura de hibridación de 72°C, y al igual que el producto anterior, muestran fragmentos de aproximadamente 700 pb. Sin embargo, ambos productos amplificados no se observan completamente definidos, por lo que se realizó una segunda amplificación (GeneRacer-Nested PCR).

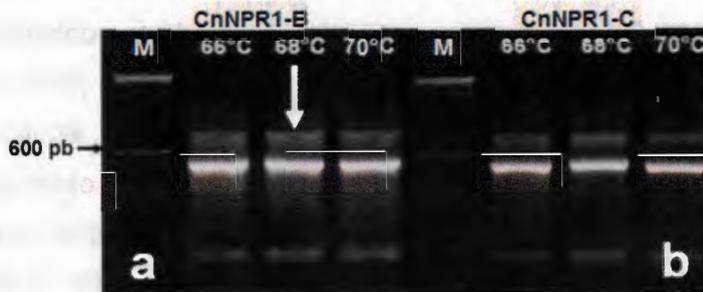


**Figura 3.4.** Productos amplificados con el cebador NPR1-A. **Carril 1.** Muestra el producto amplificado con una temperatura de hibridación de 70°C; **Carril 2.** Marcador de molecular de 100 pb. **Carril 2.** Producto amplificado con una temperatura de hibridación de 72°C.

#### 3.3.6.2 SEGUNDA REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN (GeneRacer-Nested PCR)

En la Figura 3.5, se observan dos geles de agarosa, que muestran los productos amplificados en esta segunda amplificación con los cebador NPR1-B y NPR1-C. El primer gel, muestra fragmentos amplificados de aproximadamente 500 pb con el cebador NPR1-B (figura 3.5a). El segundo gel muestra también un fragmento amplificado de aproximadamente 500 pb, con el cebador NPR1-C (figura 3.5b).

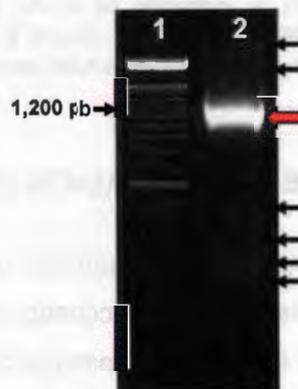
En cuanto a las tres temperaturas de hibridación probadas, la que mejor resultado mostró, fue la de 68°C para ambos cebadores. Debido a que los fragmentos amplificados con estos dos cebadores prácticamente eran del mismo tamaño, se optó por clonar y secuenciar solamente el fragmento amplificado con el cebador NPR1-B.



**Figura 3.5.** Productos de la segunda amplificación, empleando un gradiente de temperatura para ambos cebadores (NPR1-B y NPR1-C). a) Fragmentos amplificados con el cebador NPR1-B de aproximadamente 500 pb, la flecha, indica el fragmento clonado. b) Fragmento amplificado con el cebador NPR1-C de aproximadamente 500 pb.

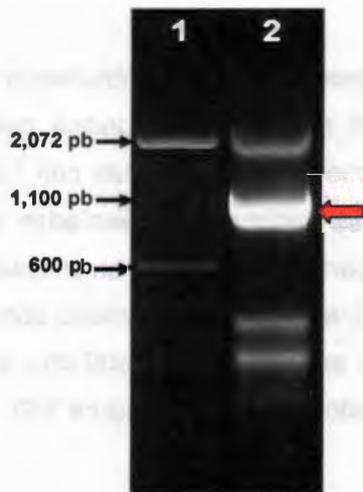
### 3.3.7 AISLAMIENTO DEL EXTREMO 3' TERMINAL DEL GEN TIPO *NPR1* DE COCOTERO (FRAGMENTO 2)

El resultado de la primera amplificación (GeneRacer PCR) empleando el cebador NPR1-B, fue un fragmento de aproximadamente 1,200 pb (flecha roja), que posteriormente fue clonado (Ver figura 3.6. Carril 2).



**Figura 3.6.** Fragmentos de la primera reacción de amplificación con el cebador NPR1-B. Carril 1. Marcador molecular de 100 pb; Carril 2. Fragmento amplificado de aproximadamente 1,200 pb (flecha roja) con el cebador NPR1-B. Las flechas negras, señalan posibles fragmentos inespecíficos.

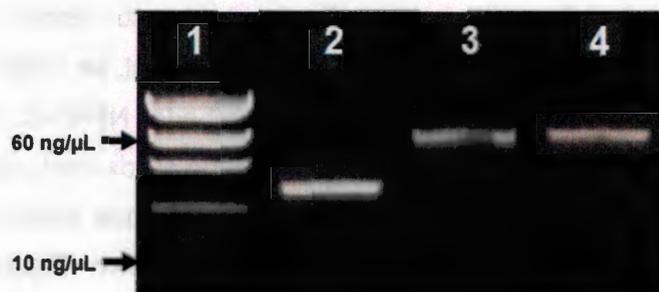
Sin embargo, también se observaron otros fragmentos poco visibles de diferentes tamaños, aproximadamente entre 200 pb y 2,000 pb, por lo cual, se realizó una segunda amplificación (GeneRacer-Nested PCR) empleando el cebador NPR1-C. El resultado de esta segunda amplificación, fue un fragmento de un tamaño aproximado de 1,100 pb (ver Figura 3.7). Sin embargo, también se observaron fragmentos que anteriormente habían sido amplificados con el cebador NPR1-B en la primera reacción (Figura 3.6, carril 2), pero debido a que mostraban tamaño menor al predicho, no fueron tomados en cuenta. En tanto que el fragmento amplificado (1,100 pb) fue clonado para su posterior secuenciación.



**Figura 3.7.** Producto de la segunda amplificación. Carril 1. Marcador molecular de 100 pb; Carril 2. Fragmento amplificado de aproximadamente 1,100 pb (flecha roja) con el cebador NPR1-C.

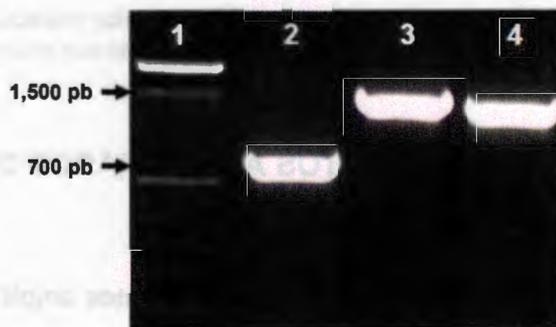
### 3.3.8 CLONACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DEL EXTREMO 3' TERMINAL

La cantidad de los productos purificados de los tres fragmentos amplificados (purificados con el kit de purificación QIAquick de QIAGEN) fue determinado empleando el marcador de masas HighMass (Invitrogen). En la figura 3.8, carriles 2, 3 y 4, se observan que los tres productos contenían la cantidad suficiente de ADN (60 ng/μL) para dar inicio con la ligación de los mismos, dentro del vector de transformación pGEM-T Easy.



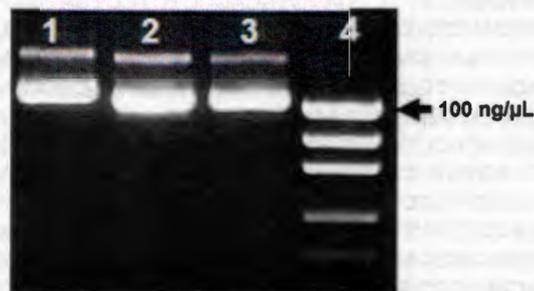
**Figura 3.8.** Imagen representativa de los 3 fragmentos purificados. **Carril 1.** Macador molecular de masas (High mass); **Carril 2.** Primer Fragmento purificado (500 pb); **Carril 3.** Segundo Fragmento purificado (1,200 pb) y **Carril 4.** Tercer Fragmento purificado (1,100 pb).

En la figura 3.9, se observan los productos que se obtuvieron de la PCR empleando los cebadores M13 (amplicón de 200 pb). Esto, nos indica que las colonias analizadas (colonias blancas), fueron exitosamente transformadas con los 3 fragmentos de interés (500 pb, 1,200 pb y 1,100 pb). Los fragmentos observados en la figura, contienen los fragmentos de interés, así como parte de la región amplificada por el cebador M13; es decir, para el Fragmento 1 (500 pb), se observa un tamaño aproximado de 700 pb, para el Fragmento 2 (1,200 pb) un tamaño aproximado de 1400 pb y para el Fragmento 3 (1,100 pb), se obtuvo un tamaño aproximado de 1,300 pb (Figura 3.9).



**Figura 3.9.** Productos de PCR con los cebadores M13. **Carril 1.** Marcador Molecular de 100 pb; **Carril 2.** Producto que contiene el fragmento 1 (500 pb); **Carril 2.** Producto que contiene el fragmento 2 (1,200 pb); **Carril 3.** Producto que contiene el fragmento 3 (1,100 pb).

Luego de haber multiplicado las colonias transformadas, se extrajo el plásmido. En la figura 3.10 se observan los resultados que se obtuvieron de esta extracción. El carril 1, muestra el plásmido que contiene el fragmento de 500 pb, el carril 2, muestra el plásmido que contiene el fragmento de 1,200 pb, el carril 3, muestra el plásmido que contiene el fragmento de 1,100 pb y por ultimo, el carril 4, muestra el marcador de masas Highmass empleado, para deducir la concentración (ng/ $\mu$ L) de cada una de las muestras. Al parecer, los 3 plásmidos extraídos muestran una concentración adecuada ya que poseen una concentración mayor a 100 ng/ $\mu$ L, lo cual es requerido para su posterior secuenciación.



**Figura 3.10.** Concentración de los plásmidos extraídos los cuales contienen los fragmentos de interés. **Carril 1.** Plásmido con el fragmento 1 (500 pb); **Carril 2.** Plásmido con el fragmento 2 (1,200 pb); **Carril 3.** Plásmido con el fragmento 3 (1,200 pb) y **Carril 4.** Marcador de Masas Highmass.

### 3.3.9 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DEL EXTREMO 3' TERMINAL

Los fragmentos secuenciados tuvieron los siguientes tamaños: el primer fragmento tuvo una secuencia total de nucleótidos de 485 pb, el segundo fragmento fue de 1,196 pb y el tercer fragmento fue de 1,134 pb. En el Figura 3.11, se observa las secuencias completas de nucleótidos de los tres fragmentos aislados.

## Fragmento 1 (485 pb)

TGTCACTGTGAAACTATTTTCAAAGTAATTGAAAATAAAAGCGGAATTGTTTACGAAGGCAGAAAGATTTT  
 TTTAAAAAAAACCTCTGTTTTCCAGGTACAGAAGCTTCATCTGAAGGTCATCAGCTAATAACGGTGATGT  
 GACCGAGTCTTCCACAGCCATGGGATTCCTCCGCATCTCTCTCTAGAAATGTCAATGCATATCCGGTCTT  
 TATTTGACTCTTGACACTGCTGAGTCTTTGTATTATAATCTTTTGGCCTTGTTAGCCTCCTACAAATCATA  
 ACAGCACTCTGCCCATCAGATGTTGTTTCTGATGCAGAAGCACCTTTGGTGAGAAGAGAAACAATAATAGC  
 TGGCTCCCTTCTCATGGCAGCTAAATGGAGGGGTGTGTATCCTCTATGATTC'TTCAGATTACATATAGATG  
 ACCCCAGTTCTAACAACCTCTGCTACAACCTTTGGAATCACAGTAGGCAGCTGCATAGTGA

## Fragmento 2 (1,196 pb)

TTTTTTACAAAAATAAGCTGCTATTAGCACTTCCATATAACTTACAGCCAATGGTATCACAGTCCATTAGG  
 TTATTATAGCAATAATGTTAACACCCATCCCAATGCCATTATCAGTTGAGAGCATGCTTCCAGTTCTGGTA  
 ATTGCTTGAAGGCCAGGAAAAGAGAGAGAGAGAGAAGCAAGAAAACAAAACACTCATGACATCGTTC  
 TGCAGCACGAAAAAAGCAACTACTCTGATGTGCAGCCTCTCCTGATGGTTTAGATTTAGGCAGCTAATA  
 TCACCTCATGTAGCATCTATCTATAATACATGTACCACAATAACTCTACAAC'TTCATTACAGCCTTGGAAAT  
 GCCCTTGTATCACCTTTCAATGAGGAGGATGATGATGATGATGAAGACAGCCCCGAGCGGACGCTATCAG  
 CCTTGTCTGGTTGAAGGCC'TTGC GAACATCCTCCTTTAACTCACAGAAACGCATCCGCTTGATCTTTTGC  
 TCATCGGGTGTCCCTTCTGAAGGTAGAACAGATCGTGCAAGTCTTCTTCGAGAACTTATCCAAAAC'TTG  
 TGAACAATGTGGGAAATAGCGCCTGCCAGCTCCACTGTTTTTACAAGGGCGTCAACCTCGAACGTAGCC  
 GTTTGTCTGCATTGTAGGTGTCTCATTTCAAATCAACCTCCCTCAGGTTACTTGAGCTCCTTGATGTCAAA  
 AGACCTCTGAGTTCTGATGTTGTCTCTGCTTGTGCAATTTCCATGGCTACCTTGGCTTCAGCAGGGAAGAA  
 TAATCTCGCAAATGCAACTCTGTTTTCCAGGTACAGAAGCTTCATTTGAAGGTATCAGCTAATAACGGTG  
 ATGTGACCGAGTCTTCCACAGCCATGGGATTCCTCCGCATCTCTCTCTAGAAATGTCAATGCATATCCGGT  
 TTTATTTGACTCTTGACACTGCTGAGTCTTTGTATTATAATCTTTTGGCCTTGTTAGCCTCCTACAAATCA  
 TAACAGCACTCTGCCCATCAGATGTTGTTTCTGATGCAGAAGCACCTTTGGTGAGAAGAGAAACAATAATA  
 GCTGGCTCCCTTCTCATGGCAGCTAAATGGAGGGGTGTGTATCCTCTATGATTC'TTCAGATTACATATAGA  
 TGACCCAGTTCTAACAACCTCTGCTACAACCTTNGGAATCACAGTAGGCAGCTGCATAGTG

## Fragmento 3 (1,134 pb)

TGCAGCTGCCTACTGTGGATTCCAAAGTTGTAGCAGAGTTGTTAGAAGTGGGGTCATCTAATGTGAATCTG  
 AAGAATCATAGAGGATACACACCCCTTCCATTTAGCTGCCATGAGAAGGGAGCCAGCTATTATTGTTTCC  
 TCTTCTCACCCAAAGGTGCTTCTGCATCAGAAAACAACATCTGATGGGCAGAGTGTGTTATGATTTGTAG  
 GAGGCTAACAAGGGCAAAGATTATAATACAAAGACTCAGCAGTGTCAAGAGTCAAATAAAGACCGGATAT  
 GCATTGACATTCTAGAGAGAGAGATGCGGAGGAATCCCATGGCTGTGGAAGACTCGGTACATCACCGTTA  
 TTAGCTGATGACCTTCAAATGAAGCTTCTGTACCTGGAAAACAGAGTTGCATTTGCGAGATTATTCTTCCC  
 TGCTGAAGCCAAGGTAGCCATGGAAATGCACAAGCAGAGACAACATCAGAATCAGAGGTCTTTTGACAT  
 CAAGGAGCTCAAGTAACCTGAGGGAGGTTGATCTGAATGAGACACCTACAATGCAGAACAAACGGCTACGT  
 TCGAGGGTTGATGCCCTTGTGAAAACAGTGGAGCTGGGCAGGCGCTATTTCCACATTTGTTACAAGTTTT  
 GGATAAGTTTTCTCGAAGAAGACTTGACGATCTGTTCTACCTTCAAGGAAGAACCCCGATGAGCAAAAGA  
 TCAAGCGGATGCGTTTTCTGCGAGTTAAAGGAGGATGTTGCAAGGCCTTCAACCAGGACAAGGCTGATAGC  
 GTCCGCTCGGGGCTGTCTTCATCATCATCATCCTCCTCATTGAAGGGTGATACAAGGCATTTCAAGGC  
 TGTAATGAAGTTGTAGAGTTATTTGTTGATCATGATTATAGATAGATGCTACATGAGGTGATATTAGCTGC  
 CTGAAATCTAAACCATCAGGAGAGGCTGCAACATCAGAGTAGTTGCTTTTTTTTCTGCTGCAGAACGATGT  
 CATGAGTGTGTTTTGTTTCTGCTTCTCTCTCTCTCTTTTCTGGCCTTCAAGCAATACCAGAACTGGAA  
 GCATGCTTTTTCAAAAAAAAAAATAAGAAAAAACCACTGTCAATGCCGGTTCGAAGCGAATTCGAAATT

Figura 3.11. Secuencia de nucleótidos de los 3 fragmentos aislados del extremo 3' terminal del gen tipo *NPR1* de cocotero.

En el cuadro 3.8, se observa el resultado del análisis de las tres secuencias aisladas, empleando el programa BLASTN. Se observa que las secuencias aisladas muestran mayor porcentaje de identidad con los genes *NPR1* de *Mussa ssp. ABB* (FJ357442.1), *Oriza sativa* (HM991166.1), *Zea Mays* (NM001154115.1), *Glycine max* (NM001251729.1), *Nicotiana tabacum* (AY640382.1) y *Populus trichocarpa* (XM002322315.1). También se observan los valores de E (probabilidad de que el alineamiento en BLAST, no fue al azar), los cuales son altos. En base a estos datos, se deduce que los fragmentos aislados pertenecen a un gen tipo *NPR1* de cocotero (*Cocos nucifera* L.).

**Cuadro 3.8.** Porcentajes de identidad de los fragmentos aislados y analizados con el programa BLASTN del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Secuencias	Especies (NPR1)	% Identidad	Valor de E
<b>Fragmento 1</b>	<i>Mussa ABB Group</i>	84	9e-120
	<i>Oriza sativa</i>	76	4e-74
	<i>Zea mays</i>	76	4e-73
	<i>Glycine max</i>	73	8e-57
	<i>Nicotiana tabacum</i>	70	5e-41
	<i>Populus trichocarpa</i>	69	3e-31
<b>Fragmento 2</b>	<i>Mussa ABB Group</i>	84	2e-114
	<i>Oriza sativa</i>	75	2e-140
	<i>Zea mays</i>	75	6e-146
	<i>Glycine max</i>	73	1e-128
	<i>Nicotiana tabacum</i>	71	5e-102
	<i>Populus trichocarpa</i>	72	8e-113
<b>Fragmento 3</b>	<i>Mussa ABB Group</i>	83	2e-106
	<i>Oriza sativa</i>	74	2e-132
	<i>Zea mays</i>	74	1e-140
	<i>Glycine max</i>	73	3e-124
	<i>Nicotiana tabacum</i>	72	1e-96
	<i>Populus trichocarpa</i>	68	9e-55

Después de determinar que estas secuencias corresponden a un gen tipo *NPR1* de cocotero, se procedió a la deducción del Marco de Lectura Abierto (ORF, por sus siglas en inglés) de cada secuencia, empleando el programa TRASLATE de ExPasy (<http://expasy.org/tools/>). El Fragmento 1 (485 pb), tuvo una ORF de 154 aminoácidos, el Fragmento 2 (1,196 pb), una ORF de 177 aminoácidos y el Fragmento 3 (1,134 pb), una ORF de 261 aminoácidos (Figura 3.12).

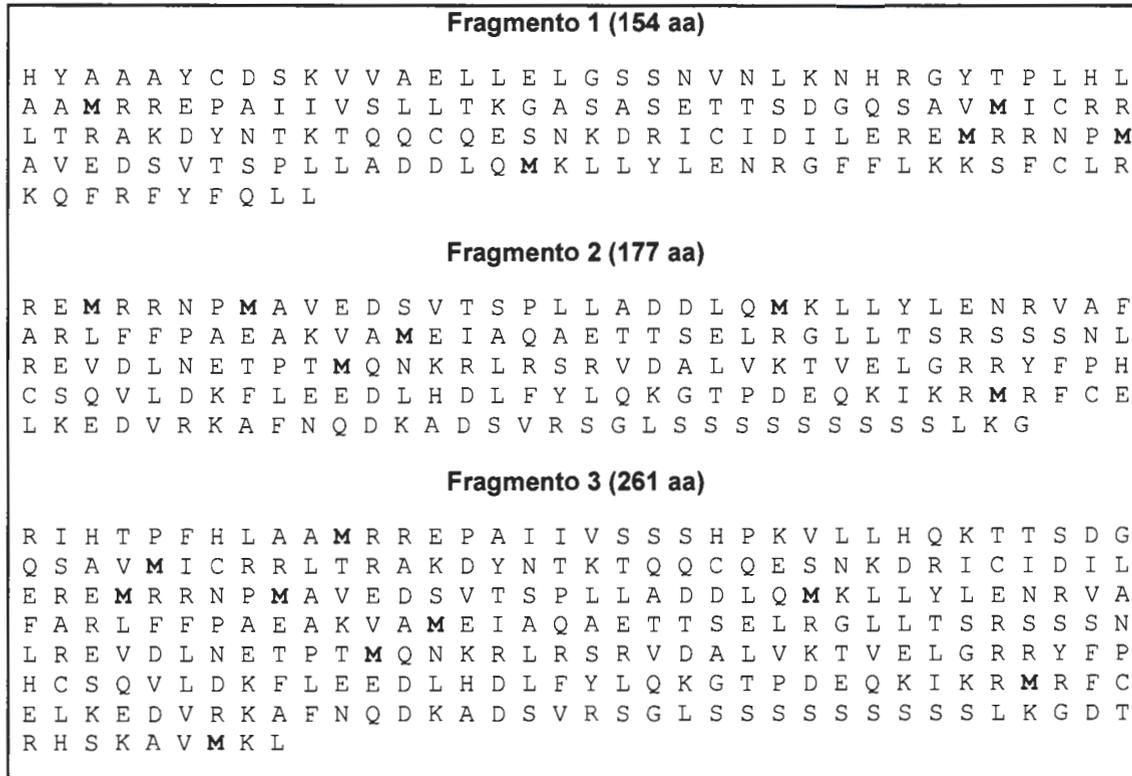
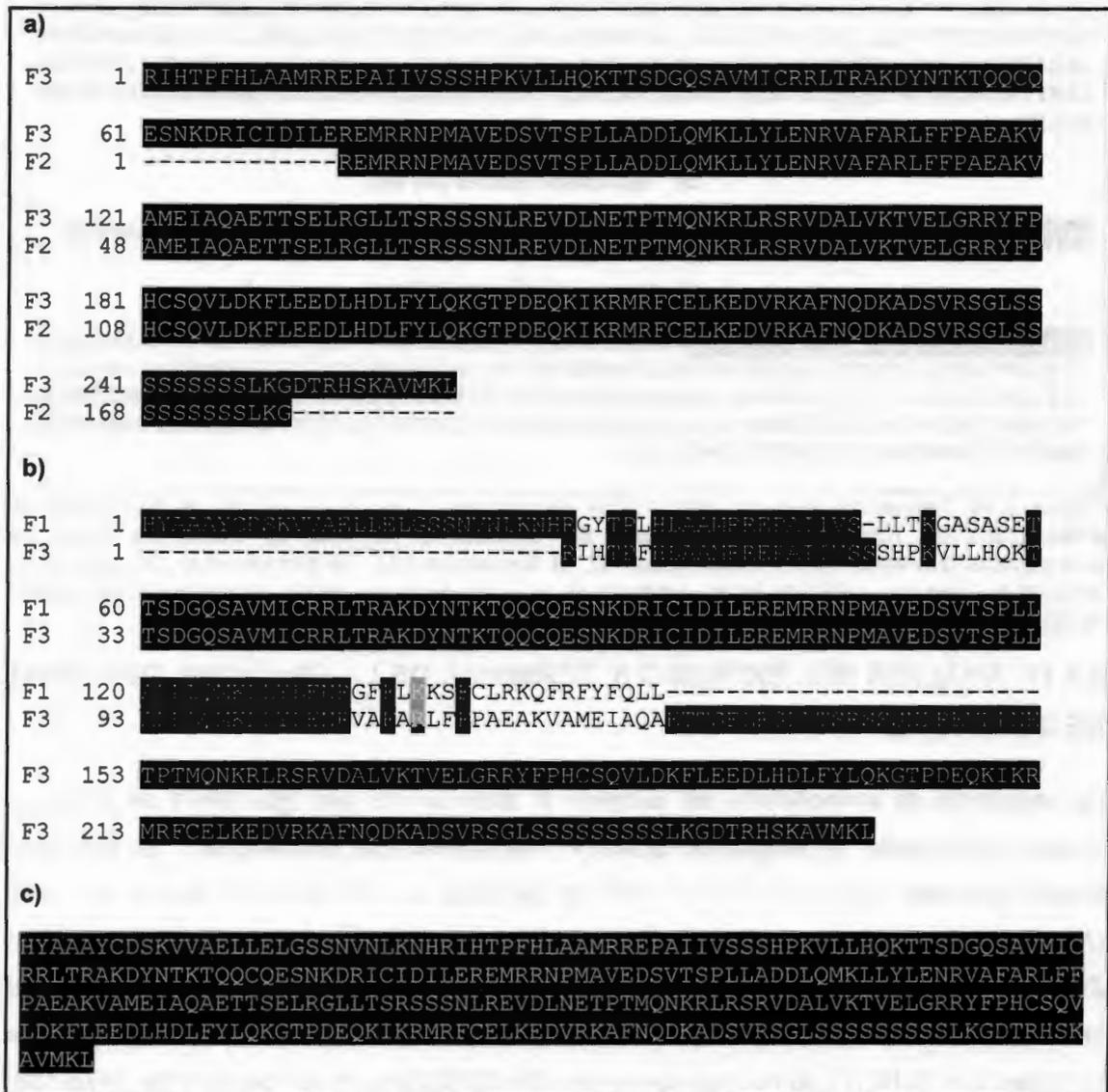


Figura 3.12. Marcos de lectura abierto de los fragmentos aislados del gen tipo *NPR1*.

### 3.3.10 ALINEAMIENTO DE LOS MARCOS DE LECTURA ABIERTO (ORF'S) DE LOS EXTREMOS AISLADOS

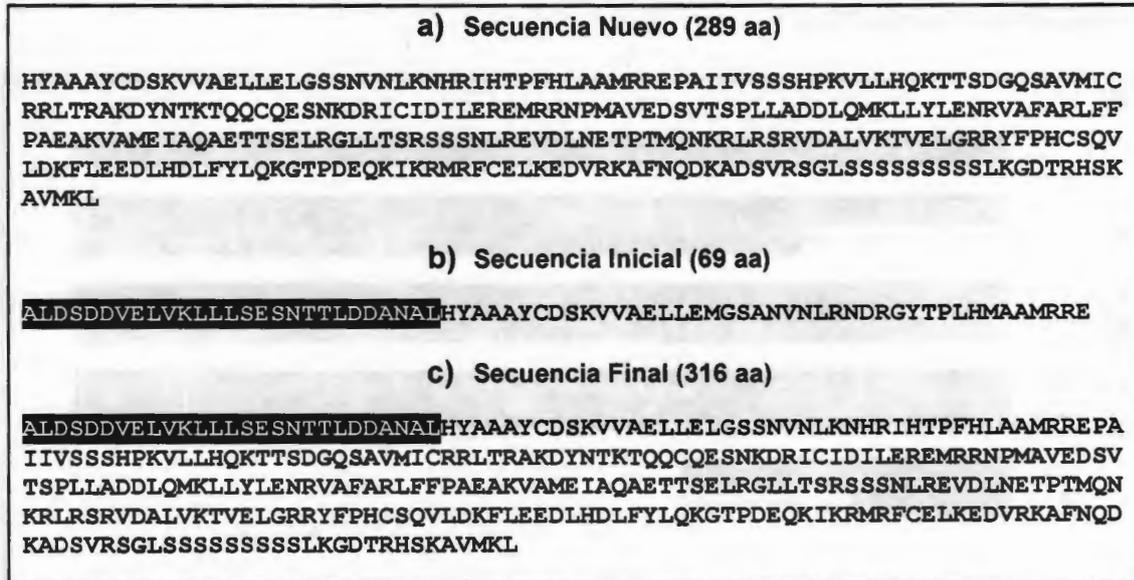
En la figura 3.13, se observa el alineamiento de las 3 secuencias de aminoácidos, el cual ayudó a determinar el tamaño total de la secuencia aislada del extremo 3' terminal. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos del Fragmento 2, mostró un alineamiento completo con la secuencia de aminoácidos del fragmento 3, iniciando en el aminoácido 66 (Figura 3.13a). Esto era de esperarse debido a que el Fragmento 3 corresponde a una

segunda amplificación del producto del Fragmento 2 (ver materiales y métodos, sección 3.2.8). En cuanto al alineamiento de la secuencia de aminoácidos del Fragmento 1 con la secuencia del Fragmento 3, se observó un alineamiento parcial al principio del Fragmento 3 (Figura 3.13b). Posteriormente observando estos resultados, se logró deducir la secuencia total de aminoácidos del extremo 3' terminal que fue aislado, el cual fue de 289 aminoácidos (Figura 3.13c).



**Figura 3.13.** Alineamiento de los tres marcos de lectura abierto del extremo 3' terminal aislado. a) alineamiento de la secuencia del Fragmento 2 con la secuencia del Fragmento 3; b) Alineamiento de la secuencia del Fragmento 1 con la secuencia del Fragmento 3; c) Secuencia final de aminoácidos aislado (289 aa), mediante la unión las secuencias de los tres fragmentos.

Después de obtener la secuencia de aminoácidos total aislada (Figura 3.14a), se realizó la unión junto con la secuencia aislada de cocotero por Narváez en 2010. (Figura 3.14b), y posteriormente se obtuvo la secuencia final de aminoácidos del extremo 3' terminal del gen tipo *NPR1* de cocotero, el cual fue de 316 aminoácidos (Figura 3.14c).



**Figura 3.14.** Secuencia final de aminoácidos del extremo 3' terminal aislado. **a)** Secuencia de aminoácidos del nuevo fragmento aislado del extremo 3' terminal; **b)** Secuencia inicial de aminoácidos (Narváez, 2010. Tesis Maestría); **c)** Secuencia total de aminoácidos del extremo 3' terminal del gen tipo *NPR1* de coco, producto de la unión de la secuencia nueva con la secuencia inicial. **aa.** Aminoácidos.

### 3.3.11 ANÁLISIS DEL EXTREMO 3' TERMINAL DE LA PROTEINA TIPO NPR1 DE COCOTERO

La secuencia de aminoácidos del extremo 3' terminal del gen tipo *NPR1* de coco, se analizó empleando el programa BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El resultado mostró que este fragmento tuvo un 80% de identidad con MdNPR1 de *Mussa ssp. ABB* (ACJ04030.1) con un valor de  $E = 3e-150$ . Al igual mostró un 75% de identidad con ZmNPR1 de *Zea mays* (NP001147587.1) con un valor de  $E = 8e-146$ , 74% de identidad con OsNPR1 de *Oriza sativa* (BAD53355.1) y con un valor de  $E=9e-142$ , 71% de identidad con RcNPR1 de *Ricinus communis* (XP002520549.1) con un valor de  $E=7e-138$ , 69% de identidad con PtNPR1 de *Populus trichocarpa* (XP002322351.1) con un valor de

$E=4e-137$ , también mostró un 43% de identidad con la proteína AtNPR1 de *Arabidopsis thaliana* (ABR46027.1) con un valor de  $E=1e-59$  (Figura 3.15).

Accession	Description	Length	Total hits	Query coverage	E-value	Max Ident
ACE85413.1	NPR1-like protein [Musa ABB Group]	452	452	90%	4e-157	79%
ACJ04030.1	NPR1-like protein [Musa ABB Group] >gb ACJ04031.1  NPR1-like prot	445	445	90%	3e-150	80%
NP_001147587.1	regulatory protein NPR1 [Zea mays] >gb ACG28002.1  regulatory pr	435	435	91%	8e-146	75%
ECF71545.1	hypothetical protein Os_03882 [Oryza sativa Indica Group]	425	425	91%	2e-142	74%
XP_003569900.1	PREDICTED: regulatory protein NPR3-like [Brachypodium distachyon]	426	426	90%	3e-142	73%
XP_002456404.1	hypothetical protein SORBIDRAFT_03q035720 [Sorghum bicolor] >gb	425	425	90%	5e-142	76%
NP_001044363.1	Os01g0767900 [Oryza sativa Japonica Group] >gb ABE11615.1  anke	426	426	91%	6e-142	74%
BAD53355.1	putative NPR1 [Oryza sativa Japonica Group] >dbj BAD53329.1  put	425	425	91%	9e-142	74%
AERR1755.1	regulatory protein NPR2 [Populus deltoides]	417	417	92%	3e-139	71%
XP_002520549.1	Regulatory protein NPR1, putative [Ricinus communis] >gb EEF41835	414	414	90%	7e-138	71%
XP_002322351.1	NPR1/NIM1-like regulatory protein [Populus trichocarpa] >gb EEF064	412	412	92%	4e-137	69%
CB129072.3	unnamed protein product [Vitis vinifera]	404	404	92%	3e-136	72%
NP_001238558.1	NPR1-1 protein [Glycine max] >gb ACM45013.1  NPR1-1 protein [Glyc	407	407	90%	2e-135	71%
XP_003594464.1	NPR1-1 protein [Medicago truncatula] >gb AES64715.1  NPR1-1 pro	405	405	90%	9e-135	70%
BAJ94508.1	predicted protein [Hordeum vulgare subsp. vulgare] >db BAJ96173.1	406	406	91%	9e-135	71%
XP_002274045.1	PREDICTED: regulatory protein NPR3 isoform 1 [Vitis vinifera]	403	403	92%	1e-133	72%
NP_001238674.1	NPR1-2 protein [Glycine max] >gb ACM45015.1  NPR1-2 protein [Glyc	402	402	90%	3e-133	70%
CAN67078.1	hypothetical protein VITISV_004499 [Vitis vinifera]	403	403	92%	4e-133	72%
ARF48716.1	ankyrin repeat BTB/POZ domain-containing protein [Populus trichoca	403	403	92%	1e-132	70%
XP_003633057.1	PREDICTED: regulatory protein NPR3 isoform 2 [Vitis vinifera]	394	394	92%	4e-130	69%
AAT57641.1	NIM1-like protein 1 [Nicotiana tabacum]	386	386	90%	3e-127	68%

Figura 3.15. Esquema que muestra los resultados del análisis de la secuencia final de aminoácidos del extremo 3' terminal del gen tipo *NPR1* de cocotero empleando el programa BLASTP.

Posteriormente en la figura 3.16, se logró observar la estructura de los dominios conservados de la proteína *NPR1*, mismo que nos sirvió para identificar la ubicación del fragmento aislado del extremo 3' terminal del gen tipo *NPR1* de cocotero.

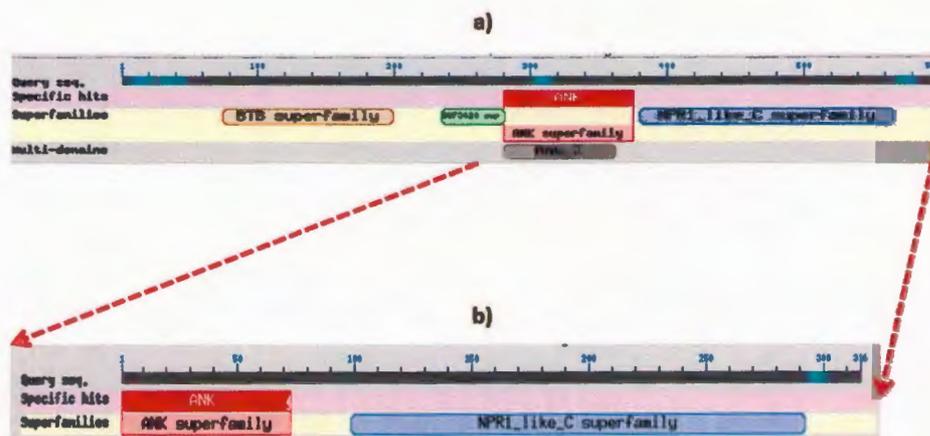


Figura 3.16. Imagen representativa que muestra el tamaño del fragmento aislado del gen tipo *NPR1* de cocotero, comparado con la proteína completa de *NPR1*. a). Muestra los dominios conservados de la proteína *NPR1* completa. b). Muestra el fragmento aislado de la proteína tipo *NPR1* de cocotero.

### 3.3.12 ALINEAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS CONSERVADOS DEL EXTREMO AISLADO

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la gen tipo *NPR1* de coco, con la secuencia de aminoácidos de MdNPR1 (FJ357442), OsNPR1 (AY923983.1), ZmNPR1 (NM001154115.1) y AtNPR1 (U76707.1), fue con la finalidad de identificar las regiones conservadas. El alineamiento muestra que esta secuencia aislada de coco, posee al menos la región conservada del dominio de ankirina. También se identificaron tres residuos Lys-541, Arg-544 y Lys-554, los cuales se ubican dentro de la señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) y son importantes para la entrada de la proteína al núcleo (Figura 3.17). En cuanto a los residuos Cys-82 y Cys-216, no fue posible localizarlos, debido a que no se obtuvo el extremo 5' terminal, estos residuos funcionan reduciéndose para liberar en forma de monómero a la proteína de NPR1 del complejo oligómero y así permitir su entrada al núcleo (Mou *et al.*, 2003).



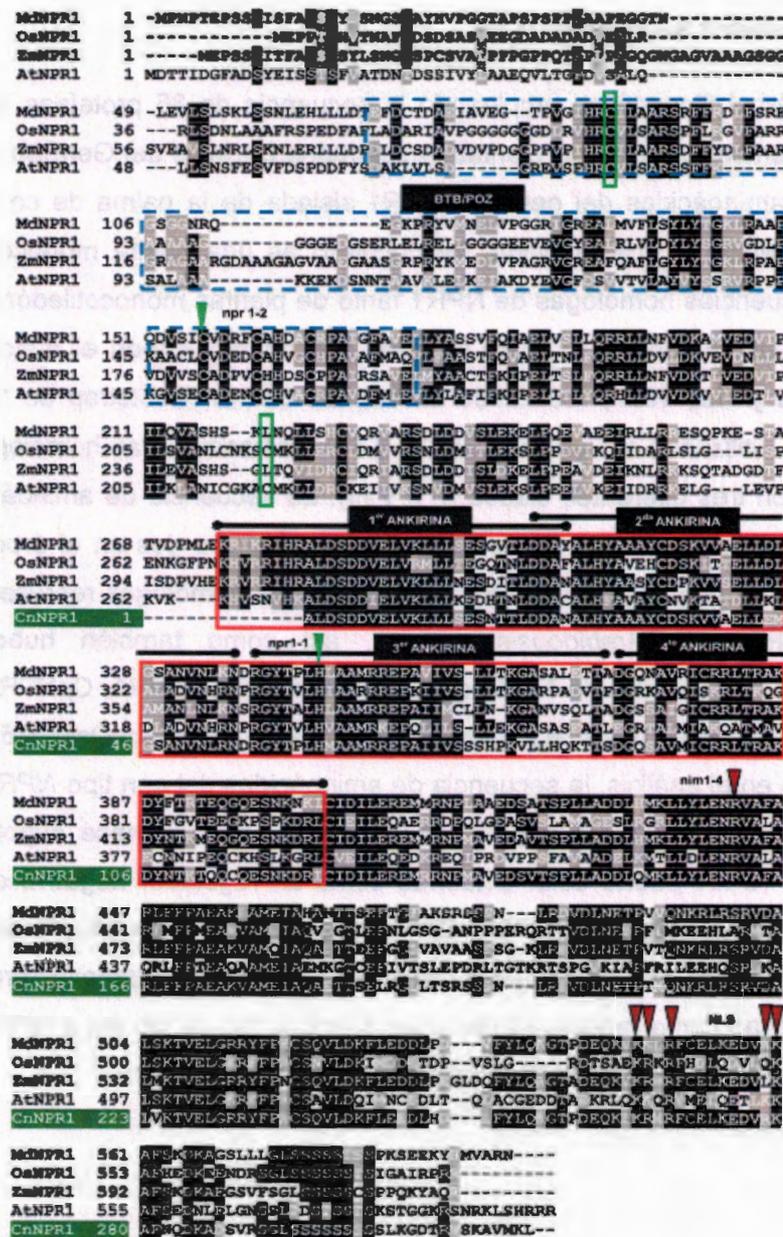
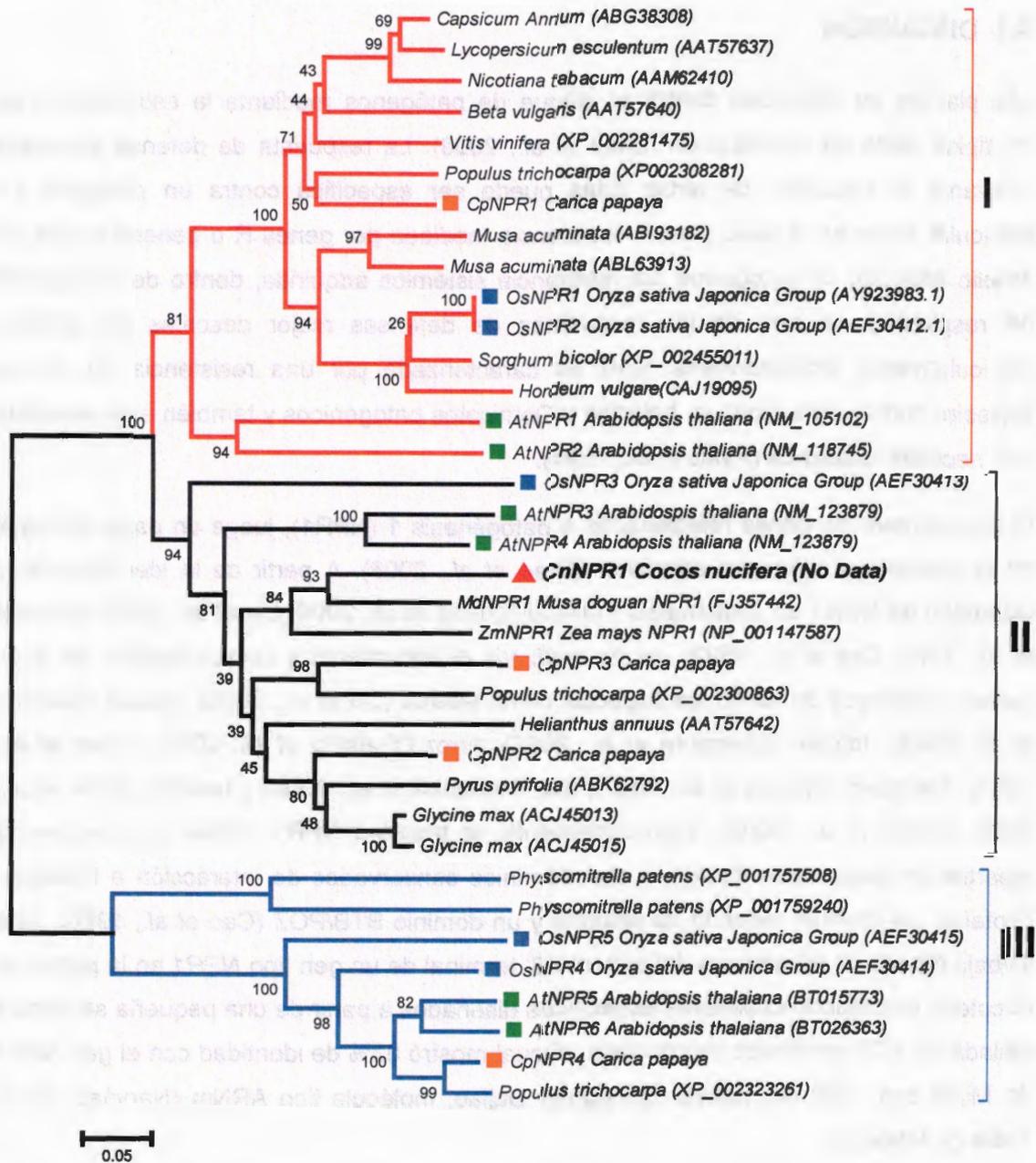


Figura 3.17. Alineamiento de secuencias de NPR1 de aradopsis, banano, arroz y coco, empleando el programa BOXSHADE ([http://www.ch.embnet.org/software/box\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/box_form.html)). Los aminoácidos idénticos son sombreados en negro y las sustituciones conservadas en gris. Las proteínas NPR1, poseen dos dominios conservados, el dominio BTB/POZ, señalado dentro un rectángulo azul de líneas punteadas y el dominio repetido de ankirina, señalado dentro un rectángulo rojo (4 repeticiones, señalados con líneas negras). Los aminoácidos requeridos para la localización nuclear de NPR1 en aradopsis son señalados con triángulos rojos. Los residuos Cys82 y Cys216 son señalados por rectángulos verdes. Los aminoácidos cambiados en la mutante npr-1-1 (H), npr1-2 (C) y nim1-4 (R), participan en la transactivación, son señalados por dos triángulos verdes y uno rojo.

### 3.3.13 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se realizó el árbol filogenético empleando la secuencia de 35 proteínas homólogas de NPR1 de diferentes especies de plantas encontradas a través del GenBank, junto con la secuencia de aminoácidos del gen tipo *NPR1* aislada de la palma de cocotero (*Cocos nucifera* L.). Debido a que la palma de cocotero es una planta monocotiledónea, se emplearon secuencias homólogas de NPR1 tanto de plantas monocotiledóneas así como de dicotiledóneas (Figura 3.18). Esto se llevo a cabo empleando el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) realizando un análisis con un Bootstrap de 1,000 réplicas (Felsen, 1985), utilizando el Software MEGA V.5.0. Las secuencias homólogas de NPR1, se agruparon en tres diferentes clados (I, II y III). La secuencia de aminoácidos del gen tipo *NPR1* de cocotero fue agrupado en el clado del grupo dos en el árbol filogenético (Figura 3.18). En cada uno de los tres clados hubo dos homólogos representativos de la familia de NPR1 de *Arabidopsis thaliana*, así como también hubo homólogos representativos de la familia de NPR1 de *Carica papaya* (CpNPR1, CpNPR2, CpNPR3 y Cp NPR4) y *Oriza sativa* (OsNPR1, OsNPR2, OsNPR3, OsNPR4 y OsNPR5). De acuerdo a lo observado en el análisis, la secuencia de aminoácidos del gen tipo *NPR1* de coco, se agrupó en el mismo clado que AtNPR3 y AtNPR4, lo cual hace suponer que esta secuencia tipo NPR1 podría estar actuando como un regulador negativo de SAR en la palma de cocotero (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo actualmente en un trabajo publicado por Fu y colaboradores, en *Arabidopsis thaliana* se observó que tanto las proteínas NPR3 y NPR4, funcionan como receptores del ácido salicílico regulando así a NPR1 y activando la respuesta inmune de la planta (SAR) (Fu *et al.*, 2012).



**Figura 3.18.** Árbol filogenético Neighbor-Joining, realizado con 35 secuencias homólogas de NPR1 de diferentes especies de plantas. Secuencias homólogas de NPR1 de arroz, arabidopsis y papaya son señaladas en cuadros azules, verdes y naranjas, respectivamente. También se observa el nombre de las especies y el número de accesión para las otras secuencias homólogas de NPR1. Se señala en letra negra y en triangulo rojo la secuencia tipo NPR1 aislada de la palma de cocotero. El número en los clados indica el porcentaje obtenido del análisis con un Bootstrap de 1000 réplicas. Solo los aminoácidos a partir del dominio de ankirina fueron considerados para este análisis filogenético.

### 3.4 DISCUSIÓN

Las plantas se defienden contra el ataque de patógenos mediante la estimulación de múltiples rutas de señalización (Zhao *et al.*, 2008). La respuesta de defensa generada mediante la inducción de estas rutas puede ser específica contra un patógeno en particular como es el caso para la resistencia mediada por genes R o general contra un amplio espectro de patógenos. La resistencia sistémica adquirida, dentro de la cascada de respuestas es una de las respuestas de defensas mejor descritas en plantas, particularmente dicotiledóneas. SAR es caracterizado por una resistencia de amplio espectro contra virus, hongos, bacterias y Oomicetos patogénicos y también está asociado con necrosis localizada (Ryals *et al.*, 1996).

El No-expresor de genes relacionados a patogénesis 1 (NPR1), juega un papel principal en la resistencia sistémica adquirida (Zhao *et al.*, 2008). A partir de la identificación y clonación de NPR1 en *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Hepwort *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 1997), se ha realizado el aislamiento y caracterización de otros genes homólogos de NPR1 en especies como tabaco (Liu *et al.*, 2002), girasol (Radwan *et al.*, 2005), tomate (Ekengren *et al.*, 2003), arroz (Yuexing *et al.*, 2007; Chern *et al.*, 2005), manzana (Malnoy *et al.*, 2007), uva (Henanaff *et al.*, 2008) y banano (Zhao *et al.*, 2008; Endah *et al.*, 2008). Estructuralmente, la proteína NPR1, posee una secuencia bipartita de localización nuclear y dos dominios conservados de interacción a Proteína-Proteína: un dominio repetido de ankirina y un dominio BTB/POZ (Cao *et al.*, 1997). Este trabajo reporta el aislamiento del extremo 3' terminal de un gen tipo NPR1 en la palma de cocotero, empleando cebadores específicos diseñados a partir de una pequeña secuencia aislada de ADN genómico de cocotero, el cual mostró 82% de identidad con el gen NPR1 de *Musa ssp.* ABB del cultivar Dongguan Dajiao, molécula tipo ARNm (Narvárez, 2010. Tesis de Maestría).

El tamaño del extremo 3' terminal de l gen tipo NPR1 de coco que fue aislado es de 316 aminoácidos, abarcando por completo el dominio conservado de repeticiones de ankirina, uno de los dominios característicos conservados de las proteínas homólogas de NPR1 (Rochon *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Hepwort *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 1997). El fragmento aislado presentó las cuatro repeticiones ankirinas, de acuerdo a lo reportado para AtNPR1

de arábidoopsis (Cao *et al.*, 1997). También fueron identificados tres de los residuos requeridos para la localización nuclear de NPR1, esencial para su función en la inducción de la expresión de genes relacionados a patogénesis (Kinkema *et al.*, 2000).

De acuerdo al alineamiento de la secuencia de aminoácidos de NPR1 (sin el dominio BTB/POZ), se pudo observar que este fragmento aislado posee regiones conservadas de la proteína MdNPR1 y ZmMPP1 principalmente en el dominio repetido de ankirina. La conservación estructural del dominio repetido de ankirina en la proteína tipo NPR1, nos indica que también podría tener una función similar al gen de *Musa ssp. ABB* y *Zea Mays*. Sin embargo, aun faltaría obtener el extremo 5' terminal, que contiene el dominio conservado BTB/POZ, para poder conocer mas a cerca de la función de esta nueva proteína de cocotero.

Se desconoce si la palma de cocotero posee otros miembros homólogos de la familia de NPR1, debido a que el genoma de coco aun no ha sido secuenciado, por lo cual es difícil asegurarlo, sin embargo, otras especies de monocotiledóneas como arroz, especie cercanamente relacionada a coco, se han reportado el aislamiento de cinco miembros de la familia de NPR1 (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002) y en el caso de banano se han reportado tres (MdNPR1-A, MdNPR1-B y MdNPR1). En plantas dicotiledóneas, se han reportado el aislamiento de seis miembros en arábidoopsis (The Arabidopsis Genome Initiative, 2005), cuatro miembros en papaya (Peraza Echevería *et al.*, 2012), cinco miembros en *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006) y dos miembros en uva (Moroldo *et al.*, 2008; Jaillon *et al.*, 2007). Por lo que existe la posibilidad de que en el genoma de cocotero también exista una familia de genes homologos de NPR1.

El análisis filogenético de la secuencia de aminoácidos de la proteína tipo NPR1 de cocotero, mostró homología con la secuencia de AtNPR3 y AtNPR4 de arábidoopsis, al igual que con MdNPR1 de *Musa ssp. ABB* y NPR1 de maíz (Ver figura 3.18 y 3.19), lo supone que esta nueva proteína de coco, podría tener la misma función que estos. En *Musa* cuando la planta era inoculada con el hongo patogénico *Fusarium oxysporum fsp. cubense* (FOC) raza 4, el nivel de expresión de MdNPR1 era mayor, lo que supone que se activa el mecanismo SAR (Zhao *et al.*, 2008). La función de esta nueva proteína de coco es cuestionable sin embargo, aun faltan hacer más estudios para determinar la función específica de esta proteína.

### 3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alba Stella Riveros Angarita. (2001). Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 61 p. 4-11.
- Beakbane, A.B., Slater, C.H.W; Posnette, AF (1972). Mycoplasmas in the phloem of coconut, *Cocos nucifera* L., with lethal yellowing disease. J. Hort. Sci. 47:265.
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X. (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. Cell 88:57–83. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81858-9.
- Cao H, Li X, Dong X (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. Proc Natl Acad Sci USA 95:6531–6536. doi:10.1073/pnas.95.11.6531.
- Chern MS, Fitzgerald HA, Yadav RC, Canlas PE, Dong X, Ronald PC (2001) Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the NPR1 mediated signaling pathway in Arabidopsis. Plant J 27:101–113. doi:10.1046/j.1365-313x.2001.01070.x.
- Chern MS, Fitzgerald HA, Canlas PE, Navarre DA, Ronald PC (2005). Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. Mol Plant Microbe Interact 18:511–520. doi: 10.1094/MPMI-18-0511.
- Durrant W.E., Dong X. (2004). Systemic acquired resistance. Annu Rev. Phytopathol 42:185–209. doi: 10.1146/annurev.Phyto.42.040803.140421.
- Ekgren S.K., Y. Liu, M. Schiff, S.P. Dinesh-Kumar y G.B. Martin. (2003) Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato, The Plant Journal, 36 (6),905-917.
- Endah R, G Beyene, A. Kiggundu, N.V. Berg, U. Schlu, K. Kunert y R. Chikwamba (2008). Plant physiology and biochemistry elicitor and fusarium-induced expression of NPR1-like genes in banana. Plant Physiology and Biochemistry, 46(11),1007-1014.
- FAO (2009) <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Friedrich L, Lawton K, Reuss W, Masner P, Specker N, Gut Rella M, Meier B, Dincher S, Staub T, Uknes S (1996). A benzothiadiazole induces systemic acquired resistance in tobacco. Plant J 1996, 10:61-70.
- Fu Zheng Qing, Shunping Yan, Abdelaty Saleh, Wei Wang, James Ruble, Nodoka Oka, Rajinikanth Mohan, Steven H. Spoel, Yasuomi Tada, Ning Zheng & Xinnian Dong (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. NATURE. VOL000.

- Goff S.A., D. Ricke, T. Lan, G. Presting, R. Wang, M. Dunn, J. Glazebrook, A. Sessions, P. Oeller, H. Varma, D. Hadley, D. Hutchison, C. Martin, F. Katagiri, B.M. Lange, T. Moughamer, Y. Xia, P. Budworth, J. Zhong, T. Miguel, U. Paszkowski, S. Zhang, M. Colbert, W. Sun, L. Chen, B. Cooper, S. Park, T.C. Wood, L. Mao, P. Quail, R. Wing, R. Dean, Y. Yu, A. Zharkikh, R. Shen, S. Sahasrabudhe, A. Thomas, R. Cannings, A. Gutin, D. Pruss, J. Reid, S. Tavtigian, J. Mitchell, G. Eldredge, T. Scholl, R.M. Miller, S. Bhatnagar, N. Adey, T. Rubano, N. Tusneem, R. Robinson, J. Feldhaus, T. Macalma, A. Oliphant y S. Briggs. (2002). A draft, sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica). *Science* 296(5565), 92-100.
- Harrison, NA., Oropeza, C. (1997). Recent advances in diagnosis and detection of lethal yellowing in the Americas. Pp 221-234 in *International Workshop on Lethal Yellowing-like Diseases of Coconut*, Elmina, Ghana, November 1995 (S.J. EdenGreen y F. Ofori, eds.). Natural resources Institute, Chatham, UK.
- Harrison NA, Cordova I, Richardson P y Dibonito R. (1999). Detection and diagnosis of lethal yellowing In: C. Oropeza, JL Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardefia y JM Santamaria (Eds.) *Current advances in coconut biotechnology* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, pp183-196.
- Harrison, NA.; Oropeza, C. (2008). Coconut Lethal Yellowing In: NA Harrison, GP Rao y C Marcone (Eds.). *Characterization, Diagnosis and Management of Phytoplasmas*. Studium Press LLC, Houston, USA. Pp. 219-248.
- Henanff G.L., T. Heitz, P. Mestre, J. Mutterer, B. Walter y J. Chong (2009). Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. *BMC Plant Biology*, 9, 54.
- Hepworth S.R., Y. Zhang, S. Mckim, X. Li y G.W. Haughn. (2005). Blade-On-Petiole-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17, 1434-1448.
- Howard, F.W., Norris, R.C.; Thomas, D.L.(1982). Evidence of transmission of palm lethal yellowing agent by a planthopper, *Myndus crudus*. *Trop. Agri.* 60:168-171.
- Jaillon O., J. Aury, B. Noel, A. Policriti, C. Clepet, A. Casagrande, N. Choisne, S. Aubourg, N. Vitulo, C. Jubin, A. Vezzi, F. Legeai, P. Huguency, C. Dasilva, D. Horner, E. Mica, D. Jublot, J. Poulain, C. Bruyère, A. Billault, B. Segurens, M. Gouyvenoux, E. Ugarte, F. Cattonaro, V. Anthouard, V. Vico, C.D. Fabbro, M. Alaux, G.D. Gaspero, V. Dumas, N. Felice, S. Paillard, I. Juman, M. Moroldo, S. Scalabrin, A. Canaguier, I.L. Clainche, G. Malacrida, E. Durand, G. Pesole, V. Laucou, P. Chatelet, D. Merdinoglu, M. Delledonne, M. Pezzotti, A. Lecharny, C. Scarpelli, F. Artiguenave, M.E. Pè, G. Valle, M. Morgante, M. Caboche, A. Adam-Blondon, J. Weissenbach, F. Quétier y P. Wincker. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449, 463-467.
- Kinkema M, Fan W, Dong X (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* 12:2339-2350.

- Lao, DA (2008). Coco-Biodiesel more than a Diesel Replacement BIOENERGY FORUM 2008. Bangkok, 28 april 2008.
- Lao, DA (2009). Coco-biodiesel in the Philippines In: Coconut Philippines published by Asia Outsourcing & Marketing Services-www.coconutrepublic.org.
- Lin W.C., C.F. Lu, J.W. Wu, M.L. Cheng, Y.M. Lin, N.S. Yang, L. Black, S.K. Green, J.F. Wang y C.P. Cheng. (2004). Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis* NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic Research*, 13(6) 567-581.
- Liu G., E.B. Holub, J.M. Alonso, J.R. Ecker y P.R. Fobert. (2005). An *Arabidopsis* NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. *The Plant Journal* 41(2), 304-318.
- Liu Y., M. Schiff, R. Marathe y S.P. Dinesh-Kumar. (2002). Tobacco RAR1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for n-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, 30(4), 415-429.
- Makandar R, Essig JS, Schapaugh MA, Trick HN, Shah J (2006). Genetically engineered resistance to Fusarium head blight in wheat by expression of *Arabidopsis* NPR1. *Mol Plant Microbe Interact* 19:123–129. doi: 10.1094/MPMI-19-0123.
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 1990, 250:1002-1004.
- Malnoy M., Jin Q., Borejsza-Wysocka EE, He SY., Aldwinchle HS. (2007). Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Mol Plant Microbe Interact* 20:1568–1580. doi: 10.1094/MPMI-20-12-1568.
- McCoy, R.E. (1972). Remission of lethal yellowing in coconut palms treated with tetracycline antibiotics. *Plant Disease Reporter* 56:1019-1021.
- McCoy, R.E.; Howard, F.W., Tsai, M.; Donselman, H.M.; Thomas, D.L., Basham, H.G.; Atilano, R.A.; Eskafi, F.M.; Britt, L.; Collins, M.E. (1983). Lethal Yellowing of Palms. *Univ. Florida Agric. Exp. Sta. Tech Bull No. 834*.
- Moroldo M., S. Paillard, R. Marconi, L. Fabrice, A. Canaguier, C. Cruaud, V.D. Berardinis, C. Guichard, V. Brunaud, I.L. Clainche, S. Scalabrin, R. Testolin, G.D. Gaspero, M. Morgante y A. Adam-Blondon. (2008). A Physical map of the heterozygous grapevine 'Cabernet Sauvignon' allows mapping candidate genes for disease resistance. *BMC Plant Biology*, 8(66),1-14.
- Narváez, M. (2010). Tesis de maestría: INDUCCIÓN DE SAR EN PLANTAS DE COCOTERO INFECTADAS CON PHYTOPHTHORA CAPCISI.

- Peraza Echeverría Santy, Santamaría Fernández Jorge, Fuentes Ortiz Gabriela, Menéndez Cerón Mariana de los Ángeles, Vallejo Reyna Miguel Ángel, Herrera Valencia Virginia Aurora (2012). The NPR1 family of transcription cofactors in papaya: insights into its structure, phylogeny and expression. *Genes & Genomics*, DOI 10.1007/s13258-011-0218-7.
- Persley GJ (1992). Replanting the tree of life: towards an international agenda for coconut palm research. CAB-ACIAR, Oxon, UK.
- Pieterse C.M.J. y L.C. Van Loon. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 456–464.
- Radwan O., S. Mouzeyar, J.S. Venisse, P. Nicolas y M.F. Bouzidi. (2005). Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. *Journal of Experimental Botany*, 56(420), 2683-2693.
- Rochon A., P. Boyle, T. Wignes, P.R. Fobert y C. Després. (2006). The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of c-terminal cysteines. *The Plant Cell*, 18, 3670-3685.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Me´traux JP. (1997). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 1997, 35:235-270.
- Thomas DL y Norris RC. (1980). The use of electron microscope for lethal yellowing diagnosis. *Proc Flac State Hort Soc* 93:304-307
- Tuskan G. A., S. Difazio, S. Jansson, J. Bohlmann, I. Grigoriev, U. Hellsten, N. Putnam, S. Ralph, S. Rombauts, A. Salamov, J. Schein, L. Sterck, A. Aerts, R. R. Bhale Rao, R. P. Bhale Rao, D. Blaudez, W. Boerjan, A. Brun, A. Brunner, V. Busov, M. Campbell, J. Carlson, M. Chalot, J. Chapman, G.-L. Chen, D. Cooper, P. M. Coutinho, J. Couturier, S. Covert, Q. Cronk, R. Cunningham, J. Davis, S. Degroeve, A. Déjardin, C. Depamphilis, J. Detter, B. Dirks, I. Dubchak, S. Duplessis, J. Ehlting, B. Ellis, K. Gendler, D. Goodstein, M. Gribskov, J. Grimwood, A. Groover, L. Gunter, B. Hamberger, B. Heinze, Y. Helariutta, B. Henrissat, D. Holligan, R. Holt, W. Huang, N. Islam-Faridi, S. Jones, M. Jones-Rhoades, R. Jorgensen, C. Joshi, J. Kangasjärvi, J. Karlsson, C. Kelleher, R. Kirkpatrick, M. Kirst, A. Kohler, U. Kalluri, F. Larimer, J. Leebens-Mack, J.-C. Leplé, P. Locascio, Y. Lou, S. Lucas, F. Martin, B. Montanini, C. Napoli, D. R. Nelson, C. Nelson, K. Nieminen, O. Nilsson, V. Pereda, G. Peter, R. Philippe, G. Pilate, A. Poliakov, J. Razumovskaya, P. Richardson, C. Rinaldi, K. Ritland, P. Rouzé, D. Ryaboy, J. Schmutz, J. Schrader, B. Segerman, H. Shin, A. Siddiqui, F. Sterky, A. Terry, C.-J. Tsai, E. Uberbacher, P. Unneberg, J. Vahala, K. Wall, S. Wessler, G. Yang, T. Yin, C. Douglas, M. Marra, G. Sandberg, Y. Van De Peer y D. Rokhsar. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313 (5793), 1596 – 1604.

- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, AhlGoy P, Me´traux J-P, Ryals JA. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 1991, 3:1085-1094.
- Yuexing Y., S. Zhong, Q. Li, Y. Lou, L. Wang, J. Wang, M. Wang, Q. Li, D. Yang y Z. He. (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that *OsNPR1/NH1* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnology Journal*, 5 (2),313-324, 2007.
- Yu J., S. Hu, J. Wang, G.K. Wong, S. Li, B. Liu, Y. Deng, L. Dai, Y. Zhou, X. Zhang, M. Cao, J. Liu, J. Sun, J. Tang, Y. Chen, X. Huang, W. Lin, C. Ye, W. Tong, L. Cong, J. Geng, Y. Han, L. Li, W. Li, G. Hu, X. Huang, W. Li, J. Li, Z. Liu, L. Li, J. Liu, Q. Qi, J. Liu, L. Li, T. Li, X. Wang, H. Lu, T. Wu, M. Zhu, P. Ni, H. Han, W. Dong, X. Ren, X. Feng, P. Cui, X. Li, H. Wang, X. Xu, W. Zhai, Z. Xu, J. Zhang, S. He, J. Zhang, J. Xu, K. Zhang, X. Zheng, J. Dong, W. Zeng, L. Tao, J. Ye, J. Tan, X. Ren, X. Chen, J. He, D. Liu, W. Tian, C. Tian, H. Xia, Q. Bao, G. Li, H. Gao, T. Cao, J. Wang, W. Zhao, P. Li, W. Chen, X. Wang, Y. Zhang, J. Hu, J. Wang, S. Liu, J. Yang, G. Zhang, Y. Xiong, Z. Li, L. Mao, C. Zhou, Z. Zhu, R. Chen, B. Hao, W. Zheng, S. Chen, W. Guo, G. Li, S. Liu, M. Tao, J. Wang, L. Zhu, L. Yuan y H. Yang (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica*). *Science* 296 (5565), 79–92.
- Zhang Y., Y.T. Cheng, N. Qu, Q. Zhao, D. Bi y X. Li. (2006). Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two NPR1 paralogs. *The Plant Journal*, 48 8(5), 647-656.
- Zhao J., X. Huang, Y. Chen, Y. Chen y X. Huang (2008). Molecular cloning and characterization of an ortholog of NPR1 gene from Dongguan dajiao (*Musa spp.* Abb). *Plant Molecular Biology Reporter*, 27(3), 243-249.

## CAPITULO IV

### 4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Desde los inicios de la agricultura, el hombre ha utilizado métodos para el control de las plagas que afectan los cultivos. Sin embargo, las plantas han evolucionado una compleja red de respuesta de defensa, que a menudo están asociados con una respuesta local en el sitio de infección (Heath *et al.*, 2000; Durrant y Dong, 2004; Mur *et al.*, 2008). Además, esta respuesta de defensa también es sistemáticamente inducida en otras partes de la planta en un proceso conocido como resistencia sistémica adquirida (Durrant y Dong, 2004; Dong, 2004; Mukhtar *et al.*, 2009). SAR es una respuesta inmune de la planta que es inducido después de una infección local y confiere resistencia a la planta contra un amplio espectro de patógenos (Durrant & Dong, 2004). La inducción de SAR requiere la acumulación endógena de SA como moléculas señal, el cual activa la expresión de genes *PR* mediado por un regulador maestro, la proteína NPR1 (No-expresor de genes *PR-1*), también conocido como NIM1 (Dong, 2004).

El gen *NPR1* codifica una proteína con dos motivos de interacción proteína-proteína: un dominio BTB/POZ y un dominio repetido de ankirina (Cao *et al.*, 1997; Ryals *et al.*, 1997). La proteína NPR1, se encuentra localizada tanto en el citoplasma así como en el núcleo (Després *et al.*, 2000). El tratamiento con SA induce la monomerización de los oligómeros de NPR1 en el citoplasma, permitiendo su translocación en el núcleo (Mou *et al.*, 2003) el cual es requerido para la inducción de genes *PR* (Kinkema *et al.*, 2000). El NPR1 nuclear interactúa con varios miembros de los factores de transcripción de la familia de TGA's con dominio básico/cierre de leucinas (bZIP, por sus siglas en inglés) (Després *et al.*, 2000; Fan & Dong, 2002; Subramaniam *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000), así como con un grupo de pequeñas proteínas de desconocida función llamado NIMINs (Weigel *et al.*, 2001). El tratamiento de plantas con SA activa la expresión de un gran número de genes (Maleck *et al.*, 2000; Glazebrook *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2003). Entre estos, únicamente algunos son regulados por NPR1 y además específicos para SAR (Van Loon, 1999). Este gen pertenece a una familia génica de seis miembros en *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Hepwort *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 1997).

Desde el descubrimiento de este gen se ha reportado la presencia de homólogos en varias especies de plantas (Zhao *et al.*, 2009; Endah *et al.*, 2008; Henanaff *et al.*, 2008; Malnoy *et al.*, 2007; Yuexing *et al.*, 2007; Chern *et al.*, 2005; Radwan *et al.*, 2005; Ekengren *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002)

Este trabajo, reporta el estudio de la expresión semicuantitativa del fragmento de un gen homólogo de NPR1 aislado de plantas de cocotero luego de ser sometidos a un tratamiento con ácido salicílico aplicando una concentración de 2.5 mM al medio de cultivo líquido Y3. El estudio de expresión fue hecho empleando cebadores específicos diseñados a partir del fragmento de un gen tipo NPR1 de cocotero aislado de ADN genómico de esta palma (Narváez, 2010. Tesis de maestría). En cuanto al nombre de esta secuencia aislada de cocotero, se le nombró como NPR1, debido a las letras iniciales del nombre científico de la especie en la cual fue aislada, *Cocos nucifera L.*, tal como se ha hecho con otros genes homólogos de NPR1 aislados de otras especies, tal como AtNPR1 de *Arabidopsis thaliana*, y MdNPR1 de *Musa spp. ABB* (Cao *et al.* 1997; Zhao *et al.*, 2008). El gen NPR1 ha sido encontrado constitutivamente expresado en plantas no tratadas y ha sido moderadamente inducido mediante la aplicación de SA exógeno o análogo en otras plantas (Cao *et al.* 1997; Yuan *et al.*, 2007; Meura *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2007; Weigel *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2005).

En cuanto a la expresión del gen tipo NPR1 de cocotero, se observaron dos picos de expresión muy marcados en los tejidos de hoja cosechados a las 24 horas y 96 horas. La expresión de NPR1 observada a las 24 horas, es similar al reportado en *Arabidopsis thaliana* (Cao *et al.*, 1997). Posteriormente se observó una leve disminución en los tejidos cosechados a las 48 y 72 horas, sin embargo los niveles de transcritos aumentaron nuevamente a las 96 horas, algo inusual en otras especies, en los cuales se ha visto que una vez que alcanzan un nivel máximo de expresión, tienden a disminuir hasta alcanzar un nivel basal sin volver a aumentar (Zhao *et al.*, 2008). En cuanto a las plantas control solo se observó expresión basal. De acuerdo a los resultados observados este trabajo, el gen tipo NPR1 de cocotero fue constitutivamente expresado en bajos niveles, sin embargo, estos niveles pueden ser aumentados de dos a tres veces después de ser sometido a tratamiento con SA, tal como se ha reportado en *Arabidopsis thaliana* (Cao *et al.* 1997; Ryals *et al.* 1997). Posteriormente los productos amplificados de mayor

expresión fueron clonados y secuenciados (24 y 96 horas) y mostrando un 83% de identidad con la proteína NPR1 de *Musa del grupo ABB* y con valor de  $E=9e-28$ , mostrando también similitud con la proteína NPR1 de *Cydonia oblonga* (76% de identidad y  $E=4e-26$ ), *Pyrus communis* (76% identidad,  $E=4e-26$ ), *Prunus laurocerasus* (76% identidad,  $E=5e-26$ ). Por lo que se concluye que los fragmentos amplificados corresponden a un gen tipo NPR1 de cocotero, el cual se encuentra ubicado dentro del dominio de ankirina.

Cabe recalcar que el método de aplicación del SA y la concentración empleada en la planta de cocotero para el estudio del gen tipo NPR1, fue completamente diferente a los reportados en estudios previos, en los cuales, la aplicación de SA ha sido de manera asperjada sobre las hojas de la planta y empleando una concentración de 1 mM, tal como en banano (Zhao *et al.*, 2008), cacao (Zi Shi *et al.*, 2010), camote y arábido (Chen *et al.*, 2009, Cao *et al.*, 1997) por mencionar algunos. Este trabajo contribuye al conocimiento de una forma alterna de aplicación de SA a la planta. Además de conocer, si los perfiles de expresión de este nuevo gen tipo NPR1 de cocotero se expresa similarmente a los reportados en otras especies de plantas.

Este trabajo también se reporta el aislamiento del extremo 3' terminal del gen tipo NPR1, ya que únicamente se contaba con fragmento de 217 pb (Narváez, 2010. Tesis de Maestría); este extremo se aisló a partir de una planta tratada con SA. El tamaño total del extremo 3' terminal aislado fue de 316 aminoácidos, abarcando por completo el dominio conservado de repeticiones de ankirina, el cual, es uno de los dominios conservados de la proteína de NPR1 (Cao *et al.*, 1997; Rochon *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2005; Hepwort *et al.*, 2005). El alineamiento de los aminoácidos del extremo aislado junto con la secuencia de aminoácidos de arroz, maíz, arábido y banano, mostró que este fragmento de la proteína tipo NPR1 de coco posee las cuatro repeticiones ankirina, de acuerdo a lo reportado en *Arabidopsis thaliana* (Cao *et al.*, 1997).

En el alineamiento de la proteína tipo NPR1, se logró identificar 3 de los residuos requeridos para la localización nuclear de NPR1 en arábido, el cual es esencial para su función en la inducción de la expresión de genes relacionados a patogénesis (Kinkema *et al.*, 2000). Esta conservación estructural del dominio repetido de ankirina en esta gen tipo NPR1, indica que posiblemente podría estar teniendo una función similar que en

banano, arroz y arabidopsis. Sin embargo, aun faltaría obtener el extremo 5' terminal, que el cual contiene el dominio conservado BTB/POZ, para poder conocer mas a cerca de la estructura y función de esta nueva proteína de cocotero.

En cuanto a otros miembros de la familia de NPR1 en cocotero, es difícil saberlo aun, ya que el genoma de coco aun no ha sido secuenciado por lo cual resulta complicado afirmarlo, aunque, basándonos en especies cercanamente relacionadas a coco, como lo es la planta de arroz, que es una planta monocotiledónea y en la cual se ha reportado que posee una pequeña familia de cinco miembros (Goff *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002), podríamos deducir que en coco posiblemente pudieran existir una familia de genes homólogos de NPR1. Existen otras especies de plantas generalmente dicotiledóneas en las cuales se han visto que poseen una familia de NPR1, tal como la planta modelo *Arabidopsis thaliana* con seis miembros reportados (The Arabidopsis Genome Initiative, 2005), cinco miembros en *Populus trichocarpa* (Tuskan *et al.*, 2006), dos miembros en *Vitis vinifera* (Moroldo *et al.*, 2008; Jaillon *et al.*, 2007) y actualmente se ha reportado que la familia de NPR1 en *Carica papaya* posee cuatro miembros (Peraza-Echevería *et al.*, 2012).

El análisis filogenético del extremo 3' terminal de la proteína tipo NPR1 de cocotero, mostró una cercana relación con las proteínas AtNPR3 y AtNPR4 de arabidopsis, ubicados en el clado dos y los cuales funcionan como reguladores negativos de SAR (Zhang *et al.*, 2006), sin embargo, actualmente en un nuevo estudio se descubrió que NPR3 y NPR4 de arabidopsis funcionan como receptores del ácido salicílico para posteriormente formar un complejo y llevando a cabo la regulación de NPR1 (Fu *et al.*, 2012). Por lo que la secuencia de este gen tipo *NPR1* aislada de cocotero, posiblemente funcione como un receptor del ácido salicílico y por lo tanto, en la respuesta inmune de la palma de cocotero.

## 4.2 CONCLUSIONES

- En el presente trabajo, se logró obtener un protocolo de extracción de RNA en tejidos maduros (hoja, tallo y raíz), empleando la combinación de los protocolos de extracción de CTAB con el Kit de extracción de RNA (Ilustra RNA extraction).
- En cuanto al efecto del SA en la expresión del gen tipo *NPR1* de cocotero se concluye que:
  - Se observó que a las 24 h y 96 h hubo cambios en la expresión de este gen tipo *NPR1* en las plantas de cocotero sometidas a tratamiento con ácido salicílico (2.5 mM).
  - La expresión basal de este gen tipo *NPR1* en plantas controles de cocotero, comparativamente con las plantas tratadas con SA fue muy débil.
  - La secuencia de los fragmentos amplificados durante el estudio de expresión del gen tipo *NPR1* de la palma de cocotero (tiempos 24 horas y 96 horas) corresponden al dominio conservado de ankirina característico del gen *NPR1* de arabidopsis.
  - El método empleado para el tratamiento de las plantas de cocotero con SA, fue capaz de inducir cambios en la expresión del gen tipo *NPR1* de cocotero.
- Obtención de extremo 3' terminal:
  - Se logró el aislamiento del extremo 3' terminal del gen tipo *NPR1* en la palma de cocotero a partir del ARNm extraído de plantas que fueron sometidas a un tratamiento con ácido salicílico. El resultado del análisis *in silico* mostró un 81% de identidad con el gen *MdNPR1* de Musa del Grupo ABB (*Expect* =  $3e-154$ ), 75% de identidad con *ZmNPR1* de *Zea mays* (*Expect* =  $2e-148$ ) y 75% de identidad con *OsNPR1* de *Oriza sativa* (*Exp* =  $2e-144$ ).
- Resistencia sistémica adquirida (SAR)
  - Los resultados obtenidos son consistentes con la presencia en cocotero de un gen tipo *NPR1* y la posible respuesta de defensa SAR.

### 4.3 PERSPECTIVAS

- ✓ Llevar a cabo el aislamiento del extremo 5' terminal, para determinar con precisión si este gen podría estar funcionado como un ortólogo del gen *AtNPR1* de *Arabidosis thaliana*.
  
- ✓ También está la propuesta de diseñar una sonda TapMan para cuantificar los niveles de expresión del gen tipo *NPR1* en las plantas de cocotero tratada con SA empleando la técnica de PCR Tiempo Real.
  
- ✓ Aislamiento de un gen marcador de SAR (*PR-1*), para realizar ensayos de resistencia.

#### 4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blanco F, Garretón V, Frey N, Dominguez C, Pérez-Acle T, Vander Straeten D, Jordana X, Holuigue L (2005). Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in Arabidopsis. *Plant Mol Biol*, 59: 927–944.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S. and Dong, X. (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88, 57–63.
- Chen YY, Lin YM, Chao TC, Wang JF, Liu AC, Ho FI, Cheng CP (2009). Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiol Plant*, 136(3):324-335.
- Chern MS, Fitzgerald HA, Canlas PE, Navarre DA, Ronald PC (2005). Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol Plant Microbe Interact* 18:511–520. doi: 10.1094/MPMI-18-0511.
- Despre's, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E. and Fobert, P.R. (2000) The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell*, 12, 279–290.
- Dong Curr. Opin. Plant Biol 7, 547 (2004).
- Durrant, X. Dong, *Annu Rev Phytopathol* 42, 185 (2004).
- Ekengren S.K., Y. Liu, M. Schiff, S.P. Dinesh-Kumar y G.B. Martin. (2003) Two MAPK cascades, NPR1, and TGA transcription factors play a role in Pto-mediated disease resistance in tomato, *The Plant Journal*, 36 (6),905-917.
- Endah R, Beyene G, Kiggundu A, van den Berg N, Schluter U, Kunert K, Chikwamba R (2008). Elicitor and Fusarium-induced expression of NPR1-like genes in banana. *Plant Physiol Biochem*, 46(11):1007-1014.
- Fan, W. and Dong, X. (2002) In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *Plant Cell*, 14, 1377–1389.
- Fu Zheng Qing, Shunping Yan, Abdelaty Saleh, Wei Wang, James Ruble, Nodoka Oka, Rajinikanth Mohan, Steven H. Spoel, Yasuomi Tada, Ning Zheng & Xinnian Dong (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *NATURE*, VOL 000.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Mettraux, J.P., Zhu, T. and Katagiri, F. (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J*. 34, 217–228.

- Goff S.A., D. Ricke, T. Lan, G. Presting, R. Wang, M. Dunn, J. Glazebrook, A. Sessions, P. Oeller, H. Varma, D. Hadley, D. Hutchison, C. Martin, F. Katagiri, B.M. Lange, T. Moughamer, Y. Xia, P. Budworth, J. Zhong, T. Miguel, U. Paszkowski, S. Zhang, M. Colbert, W. Sun, L. Chen, B. Cooper, S. Park, T.C. Wood, L. Mao, P. Quail, R. Wing, N. Adey, T. Rubano, N. Tusneem, R. Robinson, J. Feldhaus, T. Macalma, A. Oliphant y S. Briggs (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica). *Science* 296(5565), 92-100.
- Heath MC (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol*, 44(3):321-334. 2.
- Henanff G.L., T. Heitz, P. Mestre, J. Mutterer, B. Walter y J. Chong (2008). Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression. *BMC Plant Biology*, 9, 54.
- Hepworth S.R., Y. Zhang, S. Mckim, X. Li y G.W. Haughn. (2005). Blade-On-Petiole-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17, Pp. 1434-1448.
- Jaillon O., J. Aury, B. Noel, A. Policriti, C. Clepet, A. Casagrande, N. Choisne, S. Aubourg, N. Vitulo, C. Jubin, A. Vezzi, F. Legeai, P. Hugueney, C. Dasilva, D. Horner, E. Mica, D. Jublot, J. Poulain, C. Bruyère, A. Billault, B. Segurens, M. Gouyvenoux, E. Ugarte, F. Cattonaro, V. Anthouard, V. Vico, C.D. Fabbro, M. Alaux, G.D. Gaspero, V. Dumas, N. Felice, S. Paillard, I. Juman, M. Moroldo, S. Scalabrin, A. Canaguier, I.L. Clainche, G. Malacrida, E. Durand, G. Pesole, V. Laucou, P. Chatelet, D. Merdinoglu, M. Delledonne, M. Pezzotti, A. Lecharny, C. Scarpelli, F. Artiguenave, M.E. Pè, G. Valle, M. Morgante, M. Caboche, A. Adam-Blondon, J. Weissenbach, F. Quétier y P. Wincker. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449, 463-467.
- Kinkema, M., Fan, W. and Dong, X. (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell*, 12, 2339–2350.
- Liu G., E.B. Holub, J.M. Alonso, J.R. Ecker y P.R. Fobert. (2005). An *Arabidopsis* NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. *The Plant JouARNI* 41(2), 304-318.
- Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP (2002). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J*, 30(4):415-429.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L. and Dietrich, R.A. (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat.Genet.* 26, 403–410.
- Malnoy M, Jin Q, Borejsza-Wysocka EE, He SY, Aldwinckle HS (2007). Overexpression of the apple MpNPR1 gene confers increased disease resistance in *Malus x domestica*. *Mol Plant Microbe Interact*, 20(12):1568-1580.

- Meura G, Budathab M, Guptab AD, Prakashc S, Kirti P B (2006). Differential induction of NPR1 during defense responses in Brassica juncea. *Physiol Mol Plant Pathol*, 68: 128–137.
- Moroldo M., S. Paillard, R. Marconi, L. Fabrice, A. Canaguier, C. Cruaud, V.D. Berardinis, C. Guichard, V. Brunaud, I.L. Clainche, S. Scalabrin, R. Testolin, G.D. Gaspero, M. Morgante y A. Adam-Blondon. (2008). A Physical map of the heterozygous grapevine 'Cabernet Sauvignon' allows mapping candidate genes for disease resistance. *BMC Plant Biology*, 8(66),1-14.
- Mou, Z., Fan, W. and Dong, X. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113, 935–944.
- Mukhtar MS, Nishimura MT, Dangl J (2009).NPR1 in plant defense: It's not over 'til It's turned over. *Cell*, 137(5):804-806.
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot*, 59(3):501-520.
- Narváez, M. (2010). Tesis de maestría: INDUCCIÓN DE SAR EN PLANTAS DE COCOTERO INFECTADAS CON PHYTOPHTHORA CAPCISI.
- Peraza Echeverría Santy, Santamaría Fernández Jorge, Fuentes Ortiz Gabriela, Menéndez Cerón Mariana de los Ángeles, Vallejo Reyna Miguel Ángel, Herrera Valencia Virginia Aurora (2012). The NPR1 family of transcription cofactors in papaya: insights into its structure, phylogeny and expression. *Genes & Genomics*, DOI 10.1007/s13258-011-0218-7
- Radwan O., S. Mouzeyar, J.S. Venisse, P. Nicolas y M.F. Bouzidi. (2005). Resistance of sunflower to the biotrophic oomycete *Plasmopara halstedii* is associated with a delayed hypersensitive response within the hypocotyls. *Journal of Experimental Botany*, 56(420), 2683-2693.
- Rochon A., P. Boyle, T. Wignes, P.R. Fobert y C. Després. (2006). The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of c-terminal cysteines. *The Plant Cell*, 18, 3670-3685.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K. *et al.* (1997) The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IjB. *Plant Cell*, 9, 425–439.
- Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S.W. and Brisson, N. (2001) Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 769–772.
- Tang Y-M (唐益苗), Zhang Z-Y(张增艳), Xin Z-Y(辛志勇) (2007). Isolation and characterization of NPR1 homolog gene TiNH1 in *Thinopyrum intermedium*. *Sci Agric Sin (中国农业科)*, 40(6): 1101–1107 (in Chinese with English abstract).
- Tao *et al.*, *Plant Cell*, 15, 317 (2003).

- Tuskan G. A., S. Difazio, S. Jansson, J. Bohlmann, I. Grigoriev, U. Hellsten, N. Putnam, S. Ralph, S. Rombauts, A. Salamov, J. Schein, L. Sterck, A. Aerts, R. R. Bhalerao, R. P. Bhalerao, D. Blaudez, W. Boerjan, A. Brun, A. Brunner, V. Busov, M. Campbell, J. Carlson, M. Chalot, J. Chapman, G.-L. Chen, D. Cooper, P. M. Coutinho, J. Couturier, S. Covert, Q. Cronk, R. Cunningham, J. Davis, S. Degroeve, A. Déjardin, C. Depamphilis, J. Detter, B. Dirks, I. Dubchak, S. Duplessis, J. Ehlting, B. Ellis, K. Gendler, D. Goodstein, M. Gribskov, J. Grimwood, A. Groover, L. Gunter, , R. Jorgensen, C. Joshi, J. Kangasjärvi, J. Karlsson, C. Kelleher, R. Kirkpatrick, M. Kirst, A. Kohler, U. Kalluri, F. Larimer, J. Leebens-Mack, J.-C. Leplé, P. Locascio, Y. Lou, S. Lucas, F. Martin, B. Montanini, C. Napoli, M. Marra, G. Sandberg, Y. Van De Peer y D. Rokhsar. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* 313(5793), 1596 – 1604.
- Van Loon, E. A. Van Strien, *Physiol. Mol Plant Patol* 55, 85 (1999).
- Weigel, R.F., Bauscher, C., Pfitzner, A.J.P. and Pfitzner, U.M. (2001) NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. *Plant Mol. Biol.* 46, 143–160.
- Yuan Y, Zhong S, Li Q, Zhu Z, Lou Y, Wang L, Wang J, Wang M, Li Q, Yang D and He Z. (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that *OsNPR1/NH1* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnology JouARNI*. Vol. 5. Pp. 313-324.
- Yuexing Y., S. Zhong, Q. Li, Y. Lou, L. Wang, J. Wang, M. Wang, Q. Li, D. Yang y Z. He. (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that *OsNPR1/NH1* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnology Journal*, 5 (2),313-324, 2007.
- Yu J., S. Hu, J. Wang, G.K. Wong, S. Li, B. Liu, Y. Deng, L. Dai, Y. Zhou, X. Zhang, M. Cao, J. Liu, J. Sun, J. Tang, Y. Chen, X. Huang, W. Lin, C. Ye, W. Tong, L. Cong, J. Geng, Y. Han, L. Li, W. Li, G. Hu, X. Huang, W. Li, J. Li, Z. Liu, L. Li, J. Liu, Q. Qi, J. Liu, L. Li, T. Li, X. Wang, H. Lu, T. Wu, M. Zhu, P. Ni, H. Han, W. Dong, X. Ren, X. Feng, P. Cui, X. Li, H. Wang, , L. Tao, J. Ye, J. Tan, X. Ren, X. Chen, J. He, D. Liu, W. Tian, C. Tian, H. Xia, Q. Bao, G. Li, H. Gao, T. Cao, J. Wang, W. Zhao, P. Li, W. Chen, X. Wang, Y. Zhang, J. Hu, J. Wang, S. Liu, J. Yang, G. Zhang, Y. Xiong, Z. Li, L. Mao, C. Zhou, Z. Zhu, R. Chen, B. Hao, W. Zheng, S. Chen, W. Guo, G. Li, S. Liu, M. Tao, J. Wang, L. Zhu, L. Yuan y H. Yang (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica*). *Science* 296 (5565),79–92.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X. and Dong, X. (1999) Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 96, 6523–6528.
- Zhang Y., Y.T. Cheng, N. Qu, Q. Zhao, D. Bi y X. Li. (2006). Negative regulation of defense responses in *Arabidopsis* by two *NPR1* paralogs. *The Plant JouARNI*, 48 8(5). 647-656.

- Zhang Y, Wang X, Cheng C, Gao Q, Liu J, Guo X (2008).Molecular cloning and characterization of GhNPR1, a gene implicated in pathogen responses from cotton (*Gossypium hirsutum* L). *Biosci Rep*, 28(1):7-14.
- Zhao JT, Huang X, Chen YP, Chen YF and Huang XL (2008).Molecular cloning and Characterization of an Ortholog of *NPR1* Gene from Dongguan Dajiao (*Musa* spp.ABB). *Plant Mol Biol. Rep.*
- Zi Shi 1, Siela N Maximova 2, Yi Liu 1, Joseph Verica 2, Mark J Guiltinan 1,2\* (2010). Functional analysis of the theobroma cacao NPR1 gene in Arabidopsis. Shi *et al.* *BMC Plant Biology* 2010, 10:248. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/10/248>.
- Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J. and Klessig, D.F. (2000) NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 191–202.

... (mirrored text from the reverse side of the page) ...