



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
SECUENCIAS CANDIDATAS A GENES DE
RESISTENCIA EN COCOTERO**

Tesis que presenta

CARLOS ALBERTO PUCH HAU

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Opción: Biotecnología

Mérida, Yucatán, México

Febrero 2012



**CENTRO DE INVESTIGACION CIENTIFICA DE YUCATAN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**



RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado: "Aislamiento y caracterización de secuencias candidatas a genes de resistencia en cocotero" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell, dentro de la Opción biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela

Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

Mérida, Yucatán, México, Febrero 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 regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: Carlos Alberto Puch Hau

AGRADECIMIENTOS

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

Al **CONACYT** por la beca otorgada durante los dos años de la maestría. Muchas gracias.

Al proyecto **Common Found for commodities** (CFC) por brindarme los apoyos necesarios para realizar este proyecto de investigación.

A mi asesor, el **Dr. Luís Alfonso Sáenz Carbonell**, por darme la oportunidad y confianza de trabajar en el proyecto. Mil gracias por el ambiente de trabajo tan agradable, por la asesoría y el conocimiento transmitido y sobre todo por los buenos consejos brindados. Ha sido un buen amigo y un excelente asesor.

Al **Dr. Carlos Oropeza Salín**, por todas las facilidades otorgadas y sobre todo por la gran confianza brindada dentro del grupo de cocotero. Muchas Gracias.

Al **Dr. Santy Peraza Echeverria**, por las observaciones y asesoría brindada en este trabajo, así como también por el conocimiento transmitido durante mi formación como maestro en Ciencias. Muchas Gracias.

Al **M. en C. Iván Córdova Lara**, muchas gracias por toda la asesoría que me brindaste y por el conocimiento transmitido en laboratorio. Te agradezco incondicionalmente tu apoyo técnico respecto al diseño experimental, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación y análisis de resultados, el cual fue elemental para concluir esta etapa en mi vida profesional.

A los miembros de mi comité tutorial conformado por el **Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell**, **Dr. Carlos Oropeza Salín**, **Dr. Felipe Sánchez Teyer** y al **Dr. José María Tun Suárez**, por sus observaciones y comentarios que fueron de gran importancia para dirigir y concluir apropiadamente este proyecto. Muchas Gracias.

Al **Dr. Antonio Andrade, Dr. Celso Reyes e Ing. Bioq. Germán Nic Matos**, por su apoyo en diversos aspectos del laboratorio.

A la **M. en C. María Narváez** por el apoyo técnico y logístico para la preparación y envío de muestras para la secuenciación.

A la **Ing. Bioq. Ana María Colli** por su apoyo en la clonación de secuencias en pGEM y en la preparación de células competentes.

A todos los compañeros del laboratorio de cocotero con quienes interactué durante este periodo de la maestría.

A mi esposa, **Alba Areli Gamboa Ramírez**; te agradezco incondicionalmente el apoyo que me brindas como pareja y persona en todos los aspectos de la vida, para que juntos dupliquemos las ganas por salir adelante.

A mis hijos **Alberto Adonahi y Ancel Arturo**, por ser mis principales motivaciones para salir adelante, por llenar mi vida, solo con una sonrisa, de amor, alegría y felicidad, pero sobre todo de esperanza.

A mis **padres**, por todo su apoyo para lograr un paso más en mi vida profesional y por heredarme un corazón humilde, pero ambicioso por la superación. Les agradezco todo lo que hacen por nosotros. Los quiero.

A **Dios**, por las ganas de superación que siempre haces presente en mí, pero sobre todo por mi salud y la de familia.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO I	7
1.1 ANTECEDENTES GENERALES	7
1.1.1 Descripción botánica del cocotero	7
1.1.2 Importancia del cultivo del cocotero	8
1.1.3 Problemática del cocotero	9
1.1.4 Mecanismos de defensa de las plantas	11
1.1.5 Sistema inmune innato	12
1.1.6 Respuestas de defensa inducidas en las plantas	15
1.1.7 Respuesta de hipersensibilidad (HR)	15
1.1.8 Respuesta sistémica adquirida (SAR)	17
1.1.9 Genes de resistencia	18
1.1.10 Proteínas de resistencia (R)	20
1.1.11 Secuencias análogas a genes de resistencia (RGCs)	21
1.1.12 Estudios sobre los mecanismos de defensa en cocotero	24
1.1.13 Estudios sobre los mecanismos de defensa planta-fitoplasma	26
1.2 HIPÓTESIS	29
1.3 OBJETIVOS	29
1.3.1 General	29
1.3.2 Particulares	29
1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	31

CAPÍTULO II	37
SELECCIÓN DE INICIADORES DEGENERADOS, OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN POR PCR Y CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS	37
2.1 INTRODUCCIÓN	37
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	39
2.2.1 Colección del material vegetal	39
2.2.2 Extracción del AND	39
2.2.3 Cuantificación y optimización de la concentración de ADN	40
2.2.4 Selección de iniciadores degenerados	40
2.2.5 Optimización de las condiciones de amplificación	42
2.2.6 Evaluación de diferentes concentraciones de iniciadores	42
2.2.7 Clonación de los productos amplificados	43
2.3 RESULTADOS	45
2.3.1 Extracción de AND	45
2.3.2 Selección de iniciadores degenerados	45
2.3.3 Sitio de unión de los iniciadores	47
2.3.4 Optimización de las condiciones de amplificación	47
2.3.5 Evaluación de diferentes concentraciones de iniciadores	48
2.3.6 Reacción de PCR para el aislamiento de RGCs	50
2.3.7 Clonación de los productos amplificados	52
2.4 DISCUSIÓN	53
2.5 CONCLUSIONES	55
2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

CAPÍTULO III	59
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS EN COCOTERO	59
3.1 INTRODUCCIÓN	59
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.2.1 Porcentajes de identidad con las accesiones del Gen Bank	61
3.2.2 Obtención de los marcos de lectura abierta e identificación de los motivos característicos de las proteínas de resistencia	61
3.2.3 Clasificación de las secuencias en base a su porcentaje de identidad	62
3.2.4 Análisis filogenético	62
3.3 RESULTADOS	63
3.3.1 Porcentaje de secuencias con homología a genes de resistencia	63
3.3.2 Porcentaje de identidad con las accesiones del Gen Bank	65
3.3.3 Obtención de los marcos de lectura abierta	67
3.3.4 Árbol filogenético de las secuencias obtenidas	69
3.3.5 Identificación de los motivos característicos	72
3.3.6 Análisis filogenético	78
3.4 DISCUSIÓN	81
3.5 CONCLUSIONES	84
3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
CAPÍTULO IV	89
4.1 DISCUSIÓN GENERAL	89
4.2 CONCLUSIONES GENERALES	91
4.3 PERSPECTIVAS	93
4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
AL	Amarillamiento Letal
AP	Alto del Pacifico
APN	Alto de Panamá
ATP	Adenosín trifosfato
<i>Avr</i>	Genes de avirulencia
CTAB	Bromuro de cetil trimetilamonio
EMA	Enano Malayo Amarillo
EMR	Enano Malayo rojo
ERF	Elementos de respuesta a etileno
EST	Susceptibilidad disparada por los efectores
ETI	Inmunidad disparada por efectores
HR	Respuesta Hipersensible
LRR	Ricos repetidos en leucina
<i>Myb</i>	Oncogén mieloblastosis
NBS	Sitio de unión a nucleótidos
NPR1	No expresivo de genes PR-1
PAMPs o MAMPs	Patrones moleculares asociadas a patógenos o microbios
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>PR</i>	Genes relacionados a pathogenesis
PR	Proteínas relacionadas a pathogenesis
PRRs	Receptores de patrones de reconocimiento
PTI	Inmunidad disparada por patogenos
<i>R</i>	Genes de resistencia
R	Proteínas de resistencia
RGCs	Candidatas a genes de resistencia
RLKs	Receptores tipo cinasas
SA	Ácido salicílico
SAR	resistencia sistémica adquirida
TIR	TOLL/receptor de interleucin-1

CONTENUTO

1. Introduzione	1
2. Metodologia	15
3. Risultati	35
4. Conclusioni	55
5. Bibliografia	75
6. Allegati	95
7. Appendici	115
8. Glossario	135
9. Note	155
10. Indici	175

ÍNDICE DE FIGURAS
CAPÍTULO I

- Figura 1.1.** Morfología de la palma de cocotero, a) palma de cocotero, b) inflorescencia y c) fruto (<http://fichas.infojardin.com/palmeras/cocos-nucifera-cocotero-palma-cocotera-palmera-coco-indiana.htm>)..... 7
- Figura 1.2.** Algunos de los productos obtenidos a partir de la palma de cocotero (Dominguez et al., 1999; Lao, 2008)..... 8
- Figura 1.3.** Fitoplasma causante del AL (izquierda), vector del AL (en medio), palma enferma con AL (Derecha)..... 9
- Figura 1.4.** Mortalidad total acumulada por ecotipo debido a la enfermedad del Amarillamiento Letal en San Crisanto, Yucatán, México (Zizumbo et al., 2008)..... 11
- Figura 1.5.** Diagrama conceptual del modo de señalización de PTI y ETI. a) Inmunidad disparada por PTI, b) susceptibilidad disparada por los efectores y c) inmunidad disparada por ETI (Pieterse et al., 2009)..... 13
- Figura 1.6.** Modelo de "zigzag" del sistema inmune de la planta. Fase 1) PTI, inmunidad disparada por PAMPs. Fase 2) ETS, susceptibilidad disparada por efectores. Fase 3) ETI, inmunidad disparada por efectores. Fase 4) susceptibilidad disparada por los efectores (Jones y Dangl, 2006)..... 14
- Figura 1.7.** HR, respuesta hipersensible. 7a) Manchas cafés formadas por las células muertas en el sitio de infección. 7b) Cambios intracelulares ocasionados por la HR (Hoerberichts et al., 2003; Zimmermann et al., 2004)..... 16
- Figura 1.8.** Sistema inmune innato de las plantas. A) Reconocimiento del patógeno (involucra PTI y ETI), B) Respuesta Hipersensible (HR), C) Respuesta Sistémica Adquirida, D) Activación de genes relacionados a patogénesis (PR) (http://www.lidaplantresearch.com/site/investigacion_lectura.php?id_seccion=30&id_contenido=131&pg=2)..... 18
- Figura 1.9.** Proteínas R, clasificadas de acuerdo al dominio común que comparten (Dangl y Jones, 2001; Chisholm et al., 2006)..... 21
- Figura 1.10.** Esquema para el aislamiento de RGCs. Motivos conservados (en círculos rojos) a partir del cual se diseñaron iniciadores degenerados para el aislamiento de RGCs (editado por Carlos Puch)..... 22

- Figura 1.11.** Inducción de la producción de peróxido de hidrogeno en callos de cocotero tras la aplicación de quitosano. Columnas blancas tratamientos control y columnas grises tratamientos con quitosano Lizama *et al.*, 2007)..... 25
- Figura 1.12.** Efecto de la concentración del quitosán en la inducción de la actividad de la β -1,3 glucanasa. A) patrones de expresión de la β -1,3 glucanasa en diferentes concentraciones de quitosán. B) Barras que representan los patrones de expresión de la β -1,3 glucanasa (Lizama *et al.*, 2007)..... 25
- Figura 1.13.** Representación ilustrativa de las proteínas codificadas por los genes involucradas en los mecanismos de defensa inducidos en respuesta a fitoplasmas (editado por Carlos Puch)..... 28

CAPÍTULO II

- Figura 2.1.** Mezcla de ADN. A) Cada tubo contiene 100 ng/ μ l de ADN. Se tomo 1 μ l de ADN de cada tubo y se adiciono a otro, B) obteniendo de esta manera una concentración de 1000 ng/ μ l. C) Se realizo una dilución 1:10 y de esta manera se obtuvo la concentración deseada para la reacción de PCR (100 ng/ μ l)..... 40
- Figura 2.2.** Protocolo computacional, para el diseño de iniciadores degenerados para la amplificación de análogos a genes de resistencia..... 41
- Figura 2.3.** Esquema que muestra los principales puntos de referencia del vector de clonación pGEM-T Easy..... 43
- Figura 2.4.** Imagen representativa del ADN extraído de las palmas muestreadas. La flecha (parte superior derecha) indica el ADN extraído para cada ecotipo de cocotero. M) Marcador molecular..... 45
- Figura 2.5.** Sitio de unión de los iniciadores degenerados dentro del dominio NBS y LRR..... 47
- Figura 2.6.** Optimización de las condiciones de amplificación. a) Temperatura de hibridación de 50°C y b) temperatura de hibridación 45°C. Con la temperatura de hibridación de 45°C se obtuvo amplificación con cinco de las seis combinaciones de iniciadores seleccionados en la literatura..... 48
- Figura 2.7.** Evaluación de 2 concentraciones de iniciadores; 1.0 μ M y 2.0 μ M. Las primeras dos columnas son muestras de EMA, en donde se puede observar una banda mejor definida en la concentración de 2.0 μ l en comparación con la de 1.0 μ l. Los dos últimos carriles corresponden a la muestra del AP, en donde las diferencias en el tamaño del fragmento amplificado fueron insignificantes..... 49
- Figura 2.8.** Evaluación de un gradiente de concentraciones de la C1. En las cinco concentraciones se obtuvo amplificación, sin embargo, con la

concentración de 2.0 μ M, se obtuvo una banda mejor definida.....	49
Figura 2.9. Reacción de PCR con la C1 de iniciadores. Carriles 1 y 2; EMA, Carriles 3 y 4; AP. M) marcador molecular.....	50
Figura 2.10. Reacción de PCR con la C2 de iniciadores. Carriles 1; EMA. Carriles 2 y 3; AP. M) marcador molecular.....	50
Figura 2.11. Reacción de PCR con la C6 de iniciadores. Carriles 1 y 2; EMA. Carriles 3 y 4; AP. M) marcador molecular.....	51

CAPÍTULO III

Figura 3.1. Porcentajes de las secuencias que presentaron homología a genes de resistencia, obtenidas con cada combinación de iniciadores (C1-2-6).....	65
Figura 3.2. Porcentajes de secuencias que presento un marco de lectura abierto.	68
Figura 3.3. Clasificación de los secuencias de RGCs aisladas en cocotero. Las secuencias que presentaron >90% de identidad fueron clasificados dentro de un mismo grupo, obteniéndose de esta manera 29 grupos diferentes (CN1-29). Las CN5+, CN13+ y CN14+, no presentaron un marco de lectura abierta.....	69
Figura 3.4. Identificación de los motivos característicos de las proteínas de resistencia del tipo NBS-LRR, en la secuencia deducida de aminoácidos de los RGCs aislados en cocotero, utilizando la combinación C1. Las líneas en rojo indican las secuencias consenso para cada motivo y el cuadro amarillo al final del motivo de kinasa-2, indica el residuo de triptófano (W) característico de las proteínas de resistencia del tipo non-TIR NBS-LRR. Las flechas indican el sitio de unión de los iniciadores.....	75
Figura 3.5. Secuencias deducidas de aminoácidos de los RGCs aislados con la combinación C2. Las líneas rojas, indican los motivos conservados y el cuadro en amarillo al final del motivo de kinasa-2 resalta el residuo de triptófano (W), característico de la familia non-TIR-NBS-LRR.....	76
Figura 3.6. Secuencias deducidas de aminoácidos de los RGCs aislados con la combinación 6 de iniciadores. Las líneas rojas, indican los motivos conservados y el cuadro en amarillo al final del motivo de kinasa-2 resalta el residuo de triptófano (W), característico de la familia non-TIR-NBS-LRR.....	77
Figura 3.7. Árbol filogenético de los grupos de RGCs aislados en cocotero con proteínas de resistencia y RGCs descritos en otras especies de plantas. ■ Grupos formados por RGCs aisladas solo en Enano malayo amarillo. ■ Grupos formados por RGCs aisladas solo en Alto del pacifico. ■ Grupos formados por RGCs aislados de ambos ecotipos.....	80

ÍNDICE DE CUADROS**CAPÍTULO I**

Cuadro 1.1. Miembros de genes de resistencia aislados en plantas.....	19
Cuadro 1.2. Estudios enfocados al aislamiento de secuencias análogas a genes de resistencia.....	23
Cuadro 1.3. Genes relacionados en defensa, activados en respuesta a la infección por fitoplasma.....	27

CAPÍTULO II

Cuadro 2.1. Condiciones de temperatura probadas (50/45°C) en la hibridación de los iniciadores.....	42
Cuadro 2.2. Iniciadores seleccionados para aislar RGCs en cocotero.....	46
Cuadro 2.3. Combinaciones de los iniciadores seleccionados para la amplificación de RGCs.....	46
Cuadro 2.4. Numero de colonias obtenidas con cada combinación de iniciadores para cada ecotipo de cocotero.....	52

CAPÍTULO III

Cuadro 3.1. Número colonias obtenidas para cada combinación de iniciadores por ecotipo, número de colonias secuenciadas y número de secuencias que presentaron homología a genes <i>R</i>	64
Cuadro 3.2. Resultados de la identidad encontrada entre las secuencias de cocotero y las secuencias del Gen Bank usando el programas BlastX.....	66
Cuadro 3.3. Descripción de las secuencias obtenidas en cocotero, en cuanto a su tamaño en pares de bases, aminoácidos y si presento o no marco de lectura abierta.....	67

Cuadro 3.4. Grupos de RGCs en los diferentes ecotipos de cocotero.....	70
Cuadro 3.5. Porcentaje de identidad derivada de la comparación entre los 29 grupos de RGCs aislados en cocotero.....	71

Resumen

Los genes de resistencia, están estrechamente relacionados con la capacidad de respuesta de las plantas hacia organismos patógenos. La mayoría de estos genes, codifican para proteínas con un dominio de unión a nucleótidos más un dominio rico repetido en leucina (NBS-LRR), estos a su vez, comprenden dos familias clasificadas por la presencia o ausencia del dominio TIR (homología a TOLL/receptor de interleucina-1) en la región N-terminal, denominadas non-TIR-NBS-LRR y TIR-NBS-LRR. El dominio NBS, a su vez, contiene motivos conservados, que han servido de base para el diseño de iniciadores degenerados para el aislamiento de secuencias que presenten los motivos característicos de los genes de resistencia denominados secuencias candidatas a genes de resistencia (RGCs, por sus siglas en inglés). Se ha visto, que los RGCs presentan homología a genes de resistencia, además que se encuentran filogenéticamente relacionados, proporcionando evidencia que ciertas regiones genómicas, probablemente codifican para resistencia ante patógenos.

En cocotero, los mecanismos de defensa son pobremente conocidos. Por lo tanto, nuestro objetivo en este trabajo, fue el aislamiento e identificación de secuencias análogas a genes de resistencia por medio de la técnica de PCR utilizando iniciadores degenerados. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados y en base a los análisis bioinformáticos se identificaron 80 secuencias de RGCs las cuales fueron agrupadas en 29 grupos diferentes. 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. Este es el primer estudio, que reporta el aislamiento de secuencias análogas a genes de resistencia en palmas de cocotero y que podrían contribuir a entender parte de los mecanismos de defensa de este cultivo ante los patógenos que lo afectan.

ABSTRACT

The resistance (R) genes are closely related to the ability of plant response to pathogen. The majority of these genes encode proteins with a nucleotide binding domain and a leucine-rich repeat domain (NBS-LRR). This family of R genes comprises two families classified by presence or absence of the TIR domain (Toll homology / receptor of interleukin-1) in the N-terminal, called non-TIR-NBS-LRR and TIR-NBS-LRR. The NBS domain, contains conserved motifs that have been the basis for designing degenerate primers for the isolation of sequences showing the characteristic motifs of the NBS-LRR family called resistance genes candidates (RGCs). It has been shown that RGCs have homology to resistance genes, furthermore they are also phylogenetically related, providing evidence that certain genomic regions probably encode for resistance to pathogens.

In coconut, the defense mechanisms are poorly understood. Therefore, the aim of this work was to isolate and to characterize the structure and phylogeny of RGCs through PCR using degenerate primers. The amplified fragments were sequenced and based on bioinformatics analysis it were identified 80 sequences RGCs and were grouped in 29 different groups. The deduced amino acid sequences revealed the presence of the characteristic motifs of the resistance proteins NBS-LRR type and the phylogenetic analysis grouped the coconut RGCs within the family non-TIR-NBS-LRR. This is the first study reporting the isolation similar sequences in coconut palms and could contribute to understanding the defense mechanisms of this palm against its pathogens.

INTRODUCCIÓN

El cocotero es una especie de gran importancia económica, del cual se pueden aprovechar cada una de sus partes para la obtención de diferentes productos, uno de los más importantes es el aceite, teniendo diversas aplicaciones pero principalmente para la producción de biodiesel, el cual, se está usando como una opción viable para la sustitución de combustible fósil (Lao, 2008).

Desafortunadamente, la palma de cocotero está sujeta al ataque de diversos agentes que ocasionan diferentes enfermedades y que afectan su producción, entre los que se encuentran los virus (Rohde *et al.*, 1990), viroides (Hanold y Randles, 1991), protozoos (Parthasarathy *et al.*, 1978), hongos (Joseph *et al.*, 1975), nematodos (Griffith, 1987) y mollicuotas, como el fitoplasma causante del amarillamiento letal (AL) (Howard y Barrant, 1989).

A pesar de la gran importancia de este cultivo y a la diversidad de patógenos que afectan su producción, los mecanismos de defensa han sido poco estudiados, en comparación con otras plantas, las cuales son capaces de reaccionar y defenderse por sí solas por medio de mecanismos de defensa preexistentes o constitutivos (características estructurales de la pared celular y presencia de compuestos químicos) y los mecanismos de defensa inducibles (síntesis de compuestos químicos antimicrobianos) (Staskawiez *et al.*, 1995).

Para la activación de los mecanismos de defensa inducibles, el primer paso, está basado en la percepción sensitiva de patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs o MAMPs) a través de receptores de reconocimiento de estos patrones (PRRs) que se encuentran en la superficie de las células de las plantas, ha este tipo de mecanismo de defensa se le ha denominado inmunidad activada por PAMPs (PTI). Sin embargo a pesar de este tipo de mecanismo de detección, los patógenos exitosamente producen efectores que pueden inhibir PTI, pero las plantas pueden percibir tales efectores a través de receptores intracelulares adicionales tales como las proteínas NBS-LRR (dominio de unión a nucleótidos más un dominio rico repetidos en leucina) las cuales constituyen una segunda barrera de defensa denominada inmunidad disparada por

efectores (ETI) (comúnmente conocida como gen por gen) (Jones y Dangl, 2006; Chisholm *et al.*, 2006).

Estos receptores denominados proteínas de resistencia (R) han sido clasificadas en 5 clases de acuerdo al dominio común que comparten (Ellis y Jones, 1998), siendo las del tipo NBS-LRR la clase más abundante (Martin *et al.*, 2003). La región NBS, a su vez, contiene motivos conservados como kinasa-1(P-loop), kinasa-2, GLPLA y RNBS-D (Saraste *et al.*, 1990; Traut, 1994; Meyers *et al.*, 1999), a partir de los cuales se han diseñado iniciadores degenerados para el aislamiento de secuencias que presenten los motivos característicos de los genes *R* denominados secuencias candidatas a genes de resistencia, en muchas especies de plantas. Se ha documentado, que los RGCs están filogenéticamente relacionados a los genes de resistencia conocidos y diversos estudios han mostrado que presentan homología a genes *R*, proporcionando evidencia que ciertas regiones genómicas probablemente codifican para resistencia ante patógenos (Kanazin *et al.*, 1996; Aarts *et al.*, 1998).

En base a lo descrito anteriormente y con la finalidad de entender parte de los mecanismos de defensa del cocotero ante los patógenos que lo afectan, nos planteamos como principal objetivo, el aislamiento e identificación de secuencias candidatas a genes de resistencia, los cuales podrían estar relacionados con los genes de resistencia descritos en otras especies de plantas.

CAPÍTULO I

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

1.1.1 Descripción botánica del cocotero

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) pertenece a la familia *Arecaceae*, subfamilia *Arecoideae*, tribu *Cocoideae*, subtribu *Butinae*, género *Cocos* y especie *Cocos nucifera* (Uhl y Dransfield, 1987). El cocotero llamado comúnmente como “el árbol de la vida”, puede ser encontrada a lo largo de la costa de casi todos los países ubicados entre los trópicos de Cáncer y Capricornio (Ohler, 1999).

En términos botánicos, el cocotero es una monocotiledónea perenne leñosa, y no es considerado como un árbol, ya que carece de corteza, no tiene ramificaciones y tampoco cambium secundario que a su vez pueda generar crecimiento secundario (Ohler, 1999). La palma de coco es una planta polimórfica no ramificada que puede alcanzar una altura de hasta 30 m. El tallo es columnar recto que puede llegar a medir de 20.3 a 60.9 cm de diámetro, el tronco termina en un penacho de hojas agrupadas densamente en el ápice y en cada axila de las mismas, existen inflorescencias y racimos de coco en diferentes fases de desarrollo (Figura 1.1) (Woodrof, 1979).



Figura 1.1. Morfología de la palma de cocotero, a) palma de cocotero, b) inflorescencia y c) fruto. (Tomado de <http://fichas.infojardin.com/palmeras/cocos-nucifera-cocotero-palma-cocotera-palmera-coco-indiana.htm>).

1.1.2 Importancia del cocotero

El cultivo de cocotero está ampliamente distribuido en el mundo y posee un alto valor económico. La producción mundial del cocotero se estima en 40 billones de nueces, principalmente para la producción de aceite (Harries, 1995).

En América y en el Caribe la producción del cocotero contribuye con cerca del 10% a la producción mundial, siendo México y Brasil los países productores más importantes. En México, el cocotero es uno de los cultivos de mayor importancia económica, cubre una superficie de 100 mil ha de las cuales dependen aproximadamente 50 mil familias que viven directamente del cultivo (www.conacoco.com.mx, 2008).

De la palma de cocotero, se puede aprovechar cada una de sus partes para la obtención de diferentes productos, como es el aceite de cocotero, el cual está siendo utilizado para la producción de biodiesel, como una opción viable para las substitución de combustible fósil, principalmente en las islas de Papua, Nueva Guinea (Bradley, 2006), y en Filipinas está siendo producido comercialmente donde es usado como aditivo de diesel o gasolina (Lao, 2008) (Figura 1.2).



Figura 1.2. Algunos productos obtenidos a partir de la palma de cocotero. (Dominguez et al., 1999; Lao, 2008).

1.1.3 Problemática del cocotero

A nivel mundial, México ocupa el séptimo lugar en la producción de copra y el primero en América, detrás de los grandes productores asiáticos como Indonesia, Filipinas y la India (FAO, 1998). Sin embargo, esta palma está sujeta al ataque por diversos agentes que producen enfermedades, como el virus causante de la decadencia foliar del cocotero (Rohde *et al.*, 1990), viroides causantes de la enfermedad de tinangaja en la isla de Guam y el causante de la enfermedad de cadang-cadang en Filipinas (Hanold y Randles, 1991), protozoos causantes de la marchitez letal de las palmas (Parthasarathy *et al.*, 1978), hongos como *Phytophthora palmivora* el cual ocasiona la pudrición del cogollo (Joseph y Radha, 1975), el nematodo *Radinaphelenchus cocophilus* causante de la enfermedad del Anillo Rojo (Griffith, 1987) y mollicuotas como los fitoplasmas entre los que se encuentra el causante del amarillamiento letal (figura 1.3) (Howard y Barrant, 1989).

En los últimos años la enfermedad del AL ha destruido millones de palmas en Jamaica, Florida, Belice y Honduras (Harrison *et al.*, 1999). En cuanto a México, el AL ha eliminado virtualmente al cocotero Alto del Atlántico en toda la costa de Quintana Roo, Yucatán y Campeche (Domínguez *et al.*, 1999) y se estima que ha devastado aproximadamente unas 13 mil ha de la plantación (Doyle, 1998) quedando actualmente una superficie cultivada cercana a 100 mil ha (www.conacoco.com.mx, 2008).

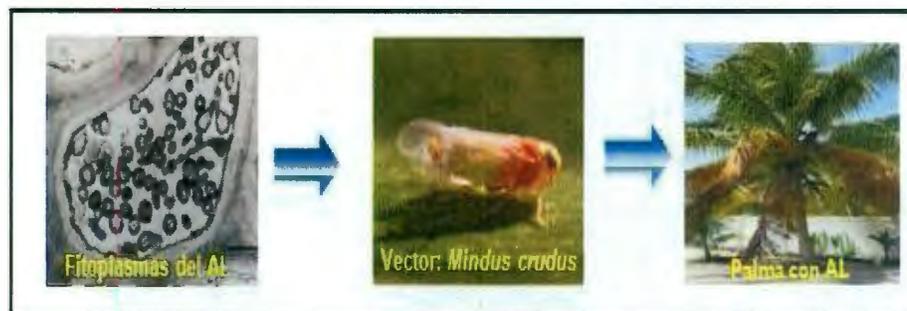


Figura 1.3. Fitoplasma causante del AL (izquierda), vector del AL (en medio), palma enferma con AL (Derecha).

Hasta el momento la única forma más eficaz para enfrentar el AL es el uso de germoplasma resistente (Been, 1981). Durante los años 50 se iniciaron epidemias del AL en Jamaica, matando a la gran mayoría de las palmas, pero permitiendo observar que diversas variedades como el Enano Malayo Amarillo (EMA) y Rojo (EMR) eran muy resistentes y que la variedad Alto de Panamá (APN) eran medianamente resistentes (Been, 1981). Aunque las primeras no eran las mejores desde el punto de vista agronómico se usaron para replantar y se desarrollo un híbrido EMA x APN, conocido como Maypan. Sin embargo, desde los años noventa se comenzó a observar una disminución en las variedades resistentes y en el híbrido de Maypan, en un principio sobrevivía cerca del 90 %, actualmente se pierde más del 90% siendo una situación muy grave para los países donde se encuentra el Amarillamiento Letal.

En México, la mortalidad debida al Amarillamiento Letal se registro en cinco ecotipos de cocotero (Enano Malayo Amarillo, Alto del Atlántico, Alto del Pacifico Mexicano 1, Alto del Pacifico Mexicano 2 y Alto del Pacifico Mexicano 3) representantes de la diversidad de germoplasma cultivada en el país. En base a esto, se realizo un estudio para identificar germoplasma resistente al AL como una alternativa para el control de dicha enfermedad, lográndose identificar ecotipos con menor porcentaje de mortalidad como son Enano Malayo Amarillo (MYD, por sus siglas en ingles) y los tres ecotipos Altos del Pacifico Mexicano (MXP1, MXP2 y MXP3, por sus siglas en ingles) con mediana y alta resistencia (figura 1.4) (Zizumbo *et al.*, 2008).

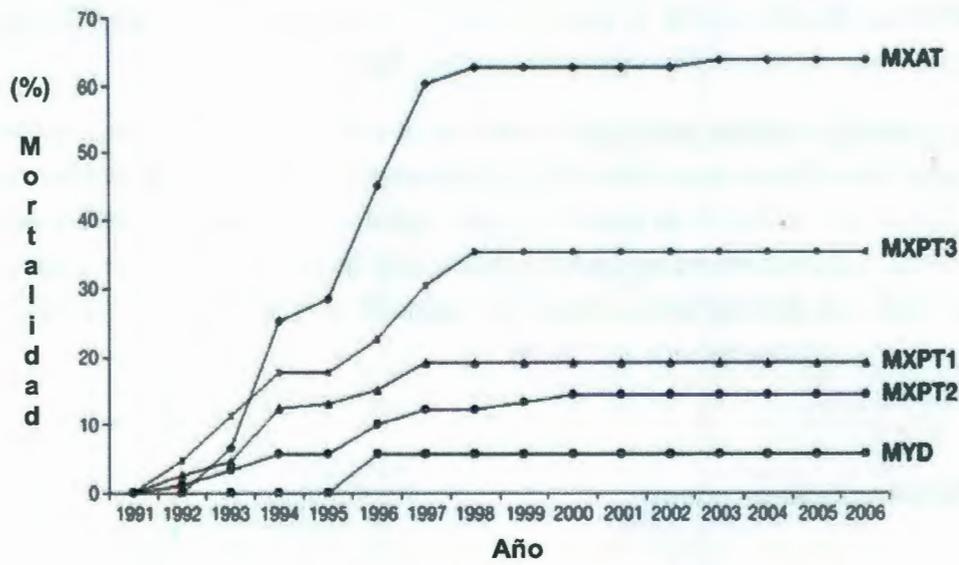


Figura 1.4. Mortalidad total acumulada por ecotipo debido a la enfermedad del Amarillamiento Letal en San Crisanto, Yucatán, México (Zizumbo *et al.*, 2008).

Esta susceptibilidad y resistencia de los ecotipos de cocotero ante la enfermedad del amarillamiento letal, quizás pueden estar dadas, por los mecanismos de defensa ante patógenos, las cuales en este cultivo son muy poco conocidos, por lo que sería de gran importancia aislar y caracterizar genes que posiblemente estuvieran involucrados en los mecanismos de defensa de las palmas, como son los genes de resistencia (*R*).

1.1.4 Mecanismos de defensa de las plantas

En los ecosistemas naturales, las plantas están constantemente expuestas a patógenos microbianos potenciales, pero a pesar de esto, ellas siempre se mantienen verdes. Esto es debido principalmente a que las plantas poseen mecanismos de defensa que utilizan para defenderse de los patógenos, los cuales pueden dividirse en:

a) Mecanismos de defensa preexistentes o constitutivos, formados por las características estructurales de la pared celular y la presencia de compuestos en el tejido epidérmico como anticipinas (Staskewiez *et al.*, 1995).

b) Mecanismos de defensa inducibles, formado por la síntesis de *novο* de compuestos químicos antimicrobianos como fitoalexinas, glucanasas y quitinasas, cuya síntesis se activa después de un intento de invasión al tejido vegetal por un patógeno (Staskewiez *et al.*, 1995). Este mecanismo es posible debido a que las plantas poseen un sistema inmune innato que eficientemente es capaz de reconocer a un patógeno y por lo tanto, activar las respuestas de defensa apropiadas.

1.1.5 Sistema inmune innato

El sistema inmune innato en las plantas, es una carrera de armamentos entre los receptores de reconocimiento de las plantas y los efectores de los patógenos microbianos.

El primer paso de este sistema está basado en la percepción de patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs o MAMPs) a través de receptores de patrones de reconocimiento (PRRs) conocidos también como proteínas de resistencia (R), los cuales se encuentran en la superficie de las células de las plantas. La activación de los PRRs, resulta en una cascada de señalización corriente abajo que dirige a la inmunidad disparada por PAMPs o MAMPs conocido comúnmente como PTI (Inmunidad disparada por PAMPs o MAMPs) (Figura 1.5a) (Pieterse *et al.*, 2009).

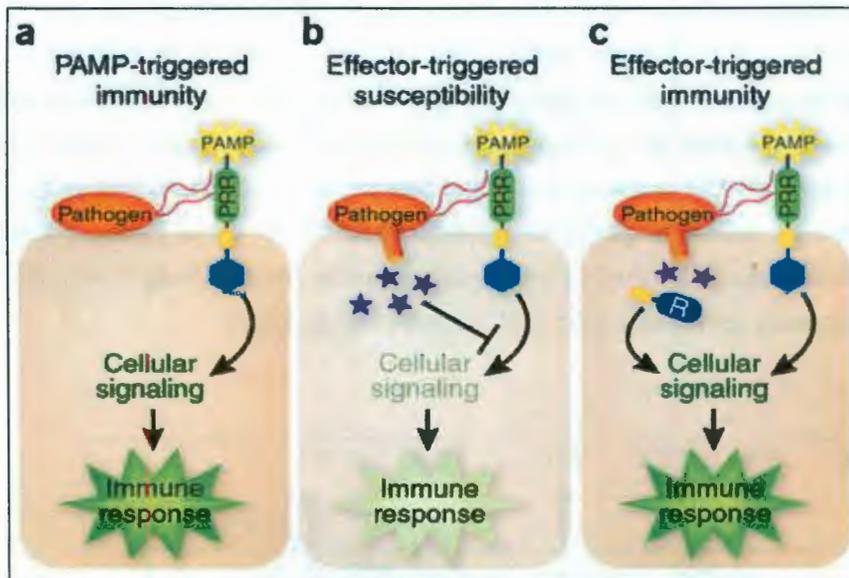


Figura 1.5. Diagrama conceptual del modo de señalización de PTI y ETI. a) Inmunidad disparada por PTI, b) susceptibilidad disparada por los efectores y c) inmunidad disparada por ETI (Pieterse *et al.*, 2009).

Sin embargo a pesar de este tipo de mecanismo de detección de las plantas, los patógenos exitosamente producen efectores que pueden inhibir PTI (Figura 1.5b), permitiendo de esta manera que la planta entre en un estado de susceptibilidad disparada por tales efectores (EST). Esto a la vez, permite que las plantas activen una segunda barrera de defensa llamada inmunidad disparada por efectores o ETI (comúnmente conocida como gen por gen) (Figura 1.5c), en donde pueden detectar de manera directa o indirecta (hipótesis guarda) (Dangl y Jones, 2001; van der Biezen y Jones, 1998) tales efectores a través de receptores intracelulares adicionales como son las proteínas de resistencia del tipo NBS-LRR (con un dominio de unión a nucleótidos más un dominio ricos repetidos en leucina) (Pieterse *et al.*, 2009), la cual resulta en una respuesta de resistencia a la enfermedad conocida como muerte celular hipersensible (HR) (Jonathan *et al.*, 2006).

En base a lo descrito anteriormente, el sistema inmune innato de la planta, puede ser representado como un modelo de "zigzag" de cuatro principales fases (figura 1.6), en donde se puede observar que los patógenos que han perdido el efector quizás ganen nuevos efectores a través de un flujo horizontal de genes que puedan ayudar a los patógenos a suprimir ETI nuevamente. Sin embargo, la selección natural a su vez, favorece a nuevos alelos de genes de resistencia NBS-LRR de la planta, para que puedan reconocer uno de los nuevos efectores adquiridos, resultando de nuevo, en una inmunidad disparada por los efectores (ETI) (Jones y Dangl, 2006).

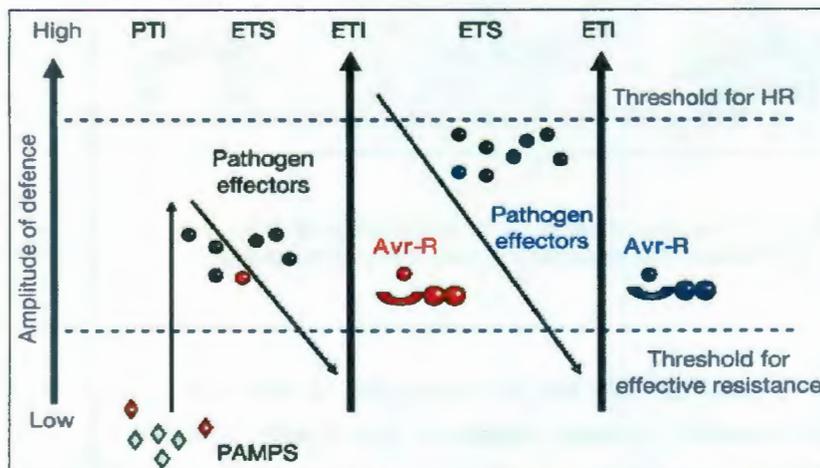


Figura 1.6. Modelo de "zigzag" del sistema inmune de la planta. Fase 1) PTI, inmunidad disparada por PAMPs. Fase 2) ETS, susceptibilidad disparada por efectores. Fase 3) ETI, inmunidad disparada por efectores. Fase 4) susceptibilidad disparada por los efectores (Jones y Dangl, 2006).

1.1.6 Respuestas de defensa inducidas en las plantas

La naturaleza de las respuestas de defensa que son activadas durante PTI y ETI sustancialmente se sobreponen (Tsuda *et al.*, 2008). Estas defensas incluyen el reforzamiento de la pared celular a través de la síntesis de callosa y lignina; la producción de metabolitos secundarios antimicrobiales, tales como fitoalexinas y la acumulación de proteínas relacionadas a patogénesis (PR), tales como quitinasas y glucanasas, las cuales degradan la pared celular de los hongos y oomycetos. El reconocimiento de los efectores a través del sistema ETI es particularmente efectiva, debido a que es seguido por un estallido de especies reactivas de oxígeno (ROS) que culminan en una muerte celular programada hipersensible (HR) en el sitio de invasión del patógeno (De Wit, 1997).

1.1.7 Respuesta de hipersensibilidad (HR)

Como se mencionó anteriormente el reconocimiento de ciertos patógenos, activan una respuesta hipersensible, la cual limita el crecimiento del patógeno en el sitio de infección. La respuesta HR, es caracterizada por la presencia de manchas cafés formadas por las células muertas en el sitio de infección, está involucrada en la resistencia ante patógenos, por la creación de una barrera física que puede impedir la proliferación y propagación de algunos patógenos, limitando el suministro de nutrientes debido a que el tejido muerto rápidamente llega a deshidratarse (figura 1.7a) (Goodman y Novacky, 1994; Alfano y Collmer, 1996; Heat, 2000).

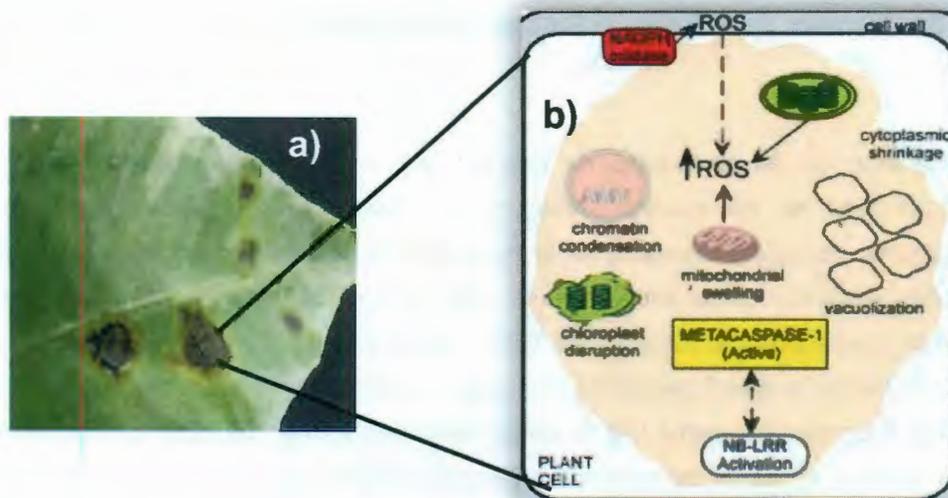


Figura 1.7. HR, respuesta hipersensible. 7a) Manchas cafés formadas por las células muertas en el sitio de infección. 7b) Cambios intracelulares ocasionados por la HR. (Hoeberichts *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2004).

La respuesta HR incluye, así también, cambios intracelulares como la disminución del citoplasma, condensación de la cromatina, hinchazón mitocondrial, combinado con otras características, tales como la vacuolización y la disrupción del cloroplasto durante el estado final de la HR (Nur *et al.*, 2008). Por otra parte también diversas líneas de evidencia sugieren una función de las metacaspasas como mediadores en la respuesta hipersensible de las plantas (figura 1.7b) (Hoeberichts *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2004), como es en el caso de *Arabidopsis* en donde las metacaspasas tipo 1, AtMC1 y ATMC2 tienen funciones antagónicas durante la muerte celular (Coll *et al.*, 2010).

La inducción de HR, a su vez, se encuentra asociada con los elevados niveles de la hormona de ácido salicílico (SA), regulador clave de respuesta de defensa y resistencia a patógenos, síntesis de proteínas relacionadas a patogénesis (PR) con actividad antimicrobial (Hammond-Kosack y Jones, 1996; Ryals *et al.*, 1996), y de esta manera el establecimiento de una respuesta de resistencia no específica en toda la planta denominada resistencia sistémica adquirida (SAR) (Durrant y Dong, 2004).

1.1.8 Respuesta sistémica adquirida (SAR)

Además de la respuesta hipersensible que bloquea el crecimiento local de un patógeno infeccioso, una respuesta de defensa secundaria puede ser activada, la cual hace que las partes no infectadas de las plantas sean resistentes al ataque de una variedad de patógenos normalmente virulentos (Durrant y Dong, 2004; Cao *et al.*, 1997). Esta respuesta es llamada resistencia sistémica adquirida (SAR), la cual es precedida por una acumulación de ácido salicílico (SA), que es observado no solamente durante la respuesta hipersensible, si no también, en el tejido distal no infectado. Esto a la vez, induce un subjuogo de genes relacionados a patogénesis (PR) que codifican para proteínas tales como β -glucanasas y quitinasas (Van Loon y Van Kammen, 1970; Ward *et al.*, 1991). En la resistencia sistémica adquirida, la proteína regulatoria denominada NPR1 (No expresivo de genes PR-1) emerge como un importante traductor de la señal del ácido salicílico. Antes de ocurrir la inducción de la respuesta sistémica adquirida, la proteína NPR1 se encuentra formando un complejo oligomérico en el citoplasma. Sin embargo, después de la inducción de SAR, la acumulación de SA dispara un cambio de redox en el interior de la célula que lleva a la monomerización de NPR1 (Cao *et al.*, 1997; Aravind y Koonin, 1999). En forma monomérica, NPR1 es transportado al núcleo, que a su vez, interacciona con factores de transcripción TGA, actuando de esta manera, como un coactivador transcripcional de la expresión de genes *PR* (Dong, 2004)

De manera general, en la siguiente figura (figura 1.8) se ilustra de manera esquemática el sistema inmune innato de la planta, desde el reconocimiento hasta la producción de las proteínas relacionadas a patogénesis.

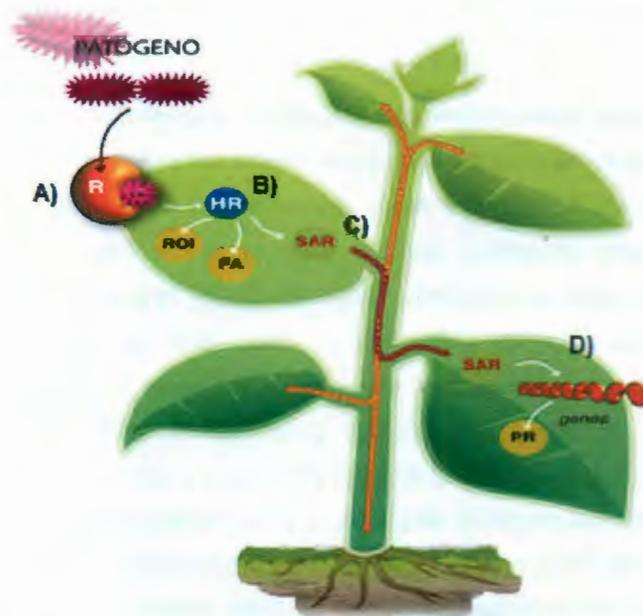


Figura 1.8. Sistema inmune innato de las plantas. A) Reconocimiento del patógeno (involucra PTI y ETI), B) Respuesta Hipersensible (HR), C) Respuesta Sistémica Adquirida, D) Activación de genes relacionados a patogénesis (PR). (Tomado de http://www.lidaplantresearch.com/site/investigacion_lectura.php?id_seccion=30&id_contenido=131&pg=2).

1.1.9 Genes de resistencia (R)

Como se ha mencionado anteriormente como requisito para que una planta sea capaz de reconocer de manera eficiente a un patógeno, y por lo tanto de activar las respuestas de defensa apropiadas, se necesita de ciertos receptores denominados proteínas de resistencia las cuales son producto de genes de resistencia (R) (Staskewicz *et al.*, 1995).

Los genes de resistencia en plantas, han sido utilizados en los programas de mejoramiento de resistencia a enfermedades durante décadas con varios grados de éxito. Recientemente las búsquedas moleculares en las proteínas R y las señales de

transducción río abajo proporcionan información interesante, el cual puede mejorar el uso de proteínas R en el control de enfermedades (John y Bonnie, 2003).

El disponer de genes *R*, abre nuevas posibilidades de incorporar por transformación genética genes de resistencia nuevos a cultivos de interés, actualmente en base a la gran importancia de estos, se han aislado más de 40 genes de resistencia en diferentes modelos de plantas en respuesta a diferentes patógenos, algunos de los cuales se describen en el siguiente cuadro (cuadro 1.1) (Martin *et al.*, 2003).

Cuadro 1.1. Miembros de genes de resistencia aislados en plantas.

Gene R	Planta	Patógeno	Tipo de patógeno	Proteína
<i>RPS</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	CC-NBS-LRR
<i>RPM1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Pseudomonas. syringae</i>	Bacteria	CC-NBS-LRR
<i>Gpa2</i>	Papa	<i>Globodera pallida</i>	Nematodo	CC-NBS-LRR
<i>N</i>	Tabaco	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Virus	TIR-NBS-LRR
<i>M</i>	Lino	<i>Melampsora lini</i>	Hongos	TIR-NBS-LRR
<i>RPP</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>Peronospora parasitica</i>	Hongos	TIR-NBS-LRR
<i>Prf</i>	Tomate	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	NBS-LRR
<i>Pto</i>	Tomate	<i>Pseudomonas syringae</i>	Bacteria	Proteína cinasa
<i>Cf</i>	Tomate	<i>Cladosporium fulvum</i>	Hongos	LRR-TM
<i>Xa21</i>	Arroz	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Bacteria	LRR-proteína cinasa

1.1.10 Proteínas de resistencia (R)

Las proteínas R, productos de genes de resistencia han sido clasificadas de acuerdo al dominio común que comparten (Ellis y Jones, 1998), las cuales se describen a continuación: **A)** genes *R*, que codifican para proteínas con dominios repetidos ricos en leucina (LRR) anclados con un dominio transmembranal (Ellis *et al.*, 2000; Meyers *et al.*, 1999; van Der Biezen *et al.*, 2002), **B)** Genes *R*, que codifican para proteínas con un dominio con actividad de proteína cinasa de serina/treonina (Ellis *et al.*, 2000), **C)** genes *R*, que codifican proteínas con dominio con actividad de proteína cinasa de serina/treonina con un dominio extracelular LRR, **D)** genes *R*, que codifican proteínas con un dominio transmembranal anclado a un dominio coiled coil (Meyers *et al.*, 1999; van Der Biezen *et al.*, 2002), y **E)** genes *R*, la clase más abundante que codifican para proteínas con un dominio de unión a nucleótidos (NBS) y un dominio rico repetido en leucinas (LRR) (Martin *et al.*, 2003). Dentro de la clase NBS-LRR, la proteína RRS1-R es un nuevo miembro, el cual contiene un sitio de localización nuclear (NLS) y un dominio con homología a los factores de transcripción WRKY (Deslandes *et al.*, 2003), **F)** y más recientemente una proteína de resistencia clonada de arroz denominada Xa27 que no muestra homología con otras proteínas R (figura 1.9) (Gu *et al.*, 2005).

Las proteínas de resistencia del tipo NBS-LRR son las que en su mayoría han sido secuenciadas y es una de las más grandes clases dentro de los genomas de las plantas. La región NBS de estas proteínas es importante para la unión a ATP y la funcionalidad general de los productos de los genes *R* (Walquer *et al.*, 1982; Saraste *et al.* 1990), mientras que el dominio LRR puede ser el principal determinante en el reconocimiento de productos de los genes *Avr* (Kobe y Deisenhofer, 1995; Jones and Jones, 1997). Esta clase de proteínas, a su vez, pueden dividirse en dos familias de acuerdo a la característica estructural de la región N-terminal, las cuáles son: TIR-NBS-LRR y los CC-NBS-LRR (no TIR). El nombre del dominio TIR, es debido a que presentan homología con el dominio de señalización intracelular denominado Toll de *Drosophila* y el receptor de interleucina-1 en mamíferos (Meyers *et al.*, 1999; Young, 2000).

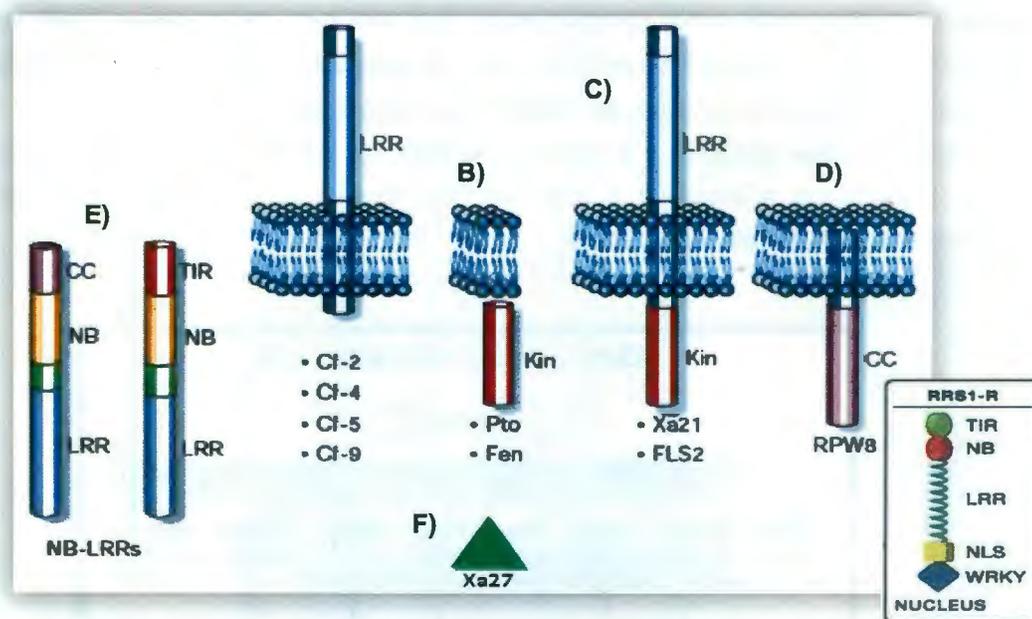


Figura 1.9. Proteínas R, clasificadas de acuerdo al dominio común que comparten (Dangl y Jones, 2001; Chisholm *et al.*, 2006).

1.1.11 Secuencias candidatas a genes de resistencia (RGCs)

El dominio conservado NBS de las proteínas de resistencia del tipo NBS-LRR, contiene motivos conservados denominados; P-loop o kinasa 1 (motivo de unión a fosfato), cinasa 2, GLPLA y RNBS-D (Saraste *et al.*, 1990; Traut, 1994; Meyers *et al.*, 1999), los cuales han sido utilizados para el diseño de iniciadores degenerados para el aislamiento por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), de secuencias candidatas o análogas a genes de resistencia del tipo NBS-LRR a las que se les han denominado RGCs (figura 1.10)(Martin *et al.*, 2003). Los RGCs son secuencias con función desconocida pero que codifican para dominios conservados característicos de los genes *R*. Muchas de estas secuencias han sido mapeadas y se ha demostrado que están ligadas filogenéticamente a los genes *R* conocidos, proporcionando evidencia que ciertas regiones genómicas probablemente codifican para resistencia ante patógenos. Los RGCs son una fuente valiosa para el descubrimiento de nuevos genes de resistencia y en futuras aplicaciones puede

proporcionar información sobre la organización y la evolución de los genes *R* del tipo NBS-LRR en los diversos cultivos en donde han sido aislados. Así mismo, el desarrollo de marcadores moleculares a partir de dichas secuencias pueden ser aplicados para el desarrollo de mapas genéticos y la selección asistida por marcadores de características como la resistencia a plagas y a enfermedades (Meyers *et al.*, 1999; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2008).

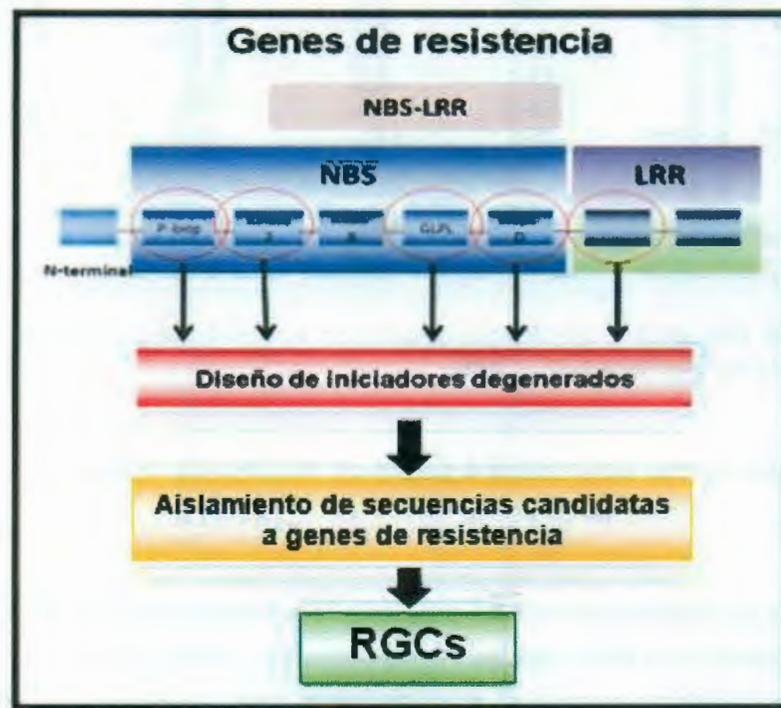


Figura 1.10. Esquema para el aislamiento de RGCS. Motivos conservados (círculos rojos) a partir del cual se diseñaron iniciadores degenerados para el aislamiento de RGCS (editado por Carlos Puch).

El aislamiento de RGCs por medio de la técnica de PCR, ha sido utilizado en una gran variedad de especies de plantas, algunos de los trabajos se describen en el cuadro 1.2. En plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* en donde el genoma ya ha sido secuenciado e identificado aproximadamente 150 genes que codifican para proteínas tipo NBS-LRR y más de 400 en *Oryza sativa* (Arroz) (Meyers *et al.*, 2003; Monosi *et al.*, 2004). Estos datos nos dan un panorama acerca de la gran diversidad de genes tipo NBS-LRR que se encuentran en los genomas de las plantas.

Cuadro 1.2. Estudios enfocados al aislamiento de secuencias candidatas a genes de resistencia.

Planta	Numero de RGCs	Grupos	Referencia
Soya	47	11	Kanazin <i>et al.</i> , 1996; Yong <i>et al.</i> , 1996.
Frijol	14	8	Rivkin <i>et al.</i> , 1999
Maíz	26	5	Collins <i>et al.</i> , 1998
Café	27	9	Noir <i>et al.</i> , 2001
Alfalfa	51	6	Cordero y Skinner. 2002
Uva2	53	14	Di Gaspero y Cipriani, 2002
Algodón	61	10	Limei <i>et al.</i> , 2004
Banano	174; 80	33; 5	Miller <i>et al.</i> , 2008; Peraza <i>et al.</i> , 2008
Azúcar de caña	11	6	You-Xiong <i>et al.</i> , 2009.

Las secuencias de RGCs con las que se cuentan actualmente, son una fuente valiosa para el descubrimiento de genes de resistencia y en futuras aplicaciones pueden proporcionar información sobre la organización y la evolución de los genes *R* NBS-LRR en los diversos cultivos en donde han sido aislados. Así mismo, el desarrollo de

marcadores moleculares a partir de dichas secuencias pueden ser aplicados para el desarrollo de mapas genéticos y la selección asistida por marcadores de características como la resistencia a plagas y enfermedades (Miller *et al.*, 2008).

1.1.12 Estudios sobre los mecanismos de defensa en cocotero

En cocotero, el estudio de las respuestas de defensa ante patógenos, incluyendo al fitoplasma causante del AL, es un área poco estudiada. Sin embargo, el estudio realizado por Lizama *et al.*, (2007), nos da un panorama acerca de algunos de los genes que son expresados en respuesta a una simulación al ataque de patógenos. El estudio se basó en un sistema *in vitro*, en donde callos de cocotero fueron tratados con quitosano para simular las interacciones moleculares que ocurren con los patógenos. En este estudio se pudo observar, que la aplicación de quitosano modificó diferencialmente la expresión de algunos genes similares a los receptores extracelulares de señalización a patógenos tipo cinasas (RLKs), las cuales consisten de un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina (LRRs) y un dominio intracelular con actividad de cinasa serina/treonina. En *Arabidopsis* el receptor FLS2 el cual es un receptor tipo cinasa está involucrado en reconocer una región de 22 aminoácidos de la flagelina (proteína que conforma el flagelo de las bacterias) activando la respuesta basal (PTI) que inhibe el crecimiento bacteriano (Gomez y Boller, 2000), por lo que en cocotero quizás podría estar jugando un papel similar. Por otro lado también, se pudo observar la expresión de un gen que presentó similitud al gen de resistencia a *Verticillium dahliae* en tomate y que codifica para un receptor de membrana (Kawchuk *et al.*, 2001).

La adición de quitosano en callos de cocotero también ocasionó la acumulación de peróxido de hidrógeno (una especie reactiva de oxígeno involucrada en la respuesta hipersensible) (figura 1.11) y estimuló la actividad de una β -1,3-glucanasa (proteína relacionada a patogénesis) (figura 1.12). Por otra parte, la adición de ácido salicílico modificó la abundancia de los transcritos de estos genes, mientras que metil jasmonato no influyó en la expresión implicando que ellos pueden estar jugando un papel importante en las respuestas de defensa dependientes de la vía de ácido salicílico.

Otro estudio realizado por Narváez *et al.*, (2010), reporta el aislamiento de una secuencia que mostro un 82% de identidad al gen NPR1 de *Musa* del grupo ABB del cultivar Dongguan Dajiao. La secuencia deducida de aminoácidos revelo la presencia de un dominio conservado característico de la proteína NPR1 denominado ankirina (ANK) importante para la interacción con otras proteínas.

Estas aportaciones, nos dan bases para hipotetizar, que el cocotero puede ser capaz de activar una respuesta sistémica adquirida ante el ataque de patógenos, en donde los genes de resistencia pudieran estar jugando un papel fundamental en la percepción de los patógenos en este cultivo.

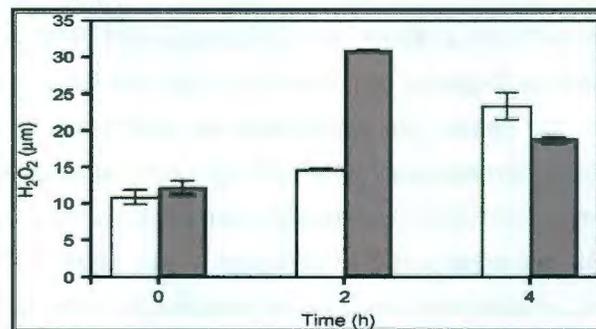


Figura 1.11. Inducción de la producción de peróxido de hidrogeno en callos de cocotero tras la aplicación de quitosano. Columnas blancas tratamientos control y columnas grises tratamientos con quitosano (Lizama *et al.*, 2007).

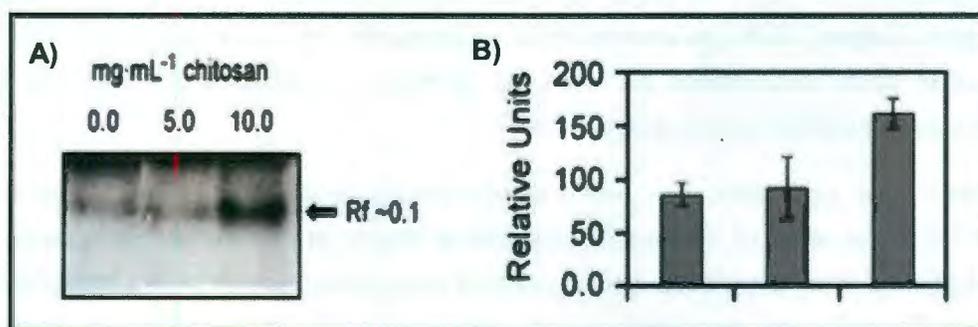


Figura 1.12. Efecto de la concentración del quitosano en la inducción de la actividad de la β -1,3 glucanasa. A) patrones de expresión de la β -1,3 glucanasa en diferentes concentraciones de quitosano. B) Barras que representan los patrones de expresión de la β -1,3 glucanasa (Lizama *et al.*, 2007).

1.1.13 Estudios sobre los mecanismos de defensa planta-fitoplasma

A pesar de que los fitoplasmas están relacionados con más de 700 enfermedades en varios cultivos, entre los que se encuentra el AL, el entendimiento sobre las respuestas de defensa de las plantas a fitoplasmas es muy poco conocido.

En un estudio realizado por Albertazzi *et al.* (2009) empleando la técnica de microarreglos, determinaron: genes que modificaban su expresión en *Vitis vinifera* en respuesta a la infección del fitoplasma Bois Noir; la represión de genes involucrados en la degradación de la pared celular y la inducción de genes involucrados en el reforzamiento de la misma; y la expresión de un factor de transcripción Myb (oncogén mieloblastosis), perteneciente a una familia de genes que tienen un rol en las respuestas de defensa de las plantas. Otros de los genes que modificaron su expresión, fueron aquellos que codifican para receptores de membrana (genes *R*), así como también genes relacionados a patogénesis (*PR*) como *PR-1* el cual fuertemente fue inducido y que es un marcador de la vía de señalamiento de ácido salicílico (Pieterse y van Loon, 1999), y esto puede sugerir que ácido salicílico está involucrado en las respuestas a infección de fitoplasmas.

Otros de los genes que fueron inducidos son los factores de transcripción como los NAC (NAM, ATAF y CUC) y los WRKY (proteína de unión al ADN) los cuales previamente han sido reportados por jugar un rol en la senescencia y la respuestas de defensa ante patógenos (Eulgem, 2005), así como también los elementos de respuesta a etileno (ERF) los cuales están involucrados en una gran variedad de procesos de desarrollo y respuestas de estrés en plantas (cuadro 1.3).

En base a estos argumentos, se puede sustentar que las plantas pueden ser capaces de activar los mecanismos de defensa en respuesta al ataque de fitoplasmas. Este proceso tal vez pudiera estar sucediendo con los ecotipos de cocotero que presentan resistencia ante la enfermedad del amarillamiento letal como son el Alto del Pacífico y el Enano Malayo Amarillo.

Cuadro 1.3. Genes relacionados en defensa, activados en respuesta a la infección por fitoplasma.

Genes R	Genes PR	Factores de transcripción
Receptor LRR –proteína cinasa	Proteína relacionada patogénesis (PR-1)	WRKY (proteínas de unión al ADN)
Hipotética proteína Cinasa	Precursor de la β -1,3-glucanasa	ERF (Factores de respuesta a etileno)
Receptor-tipo proteína Cinase	Beta-1,3-glucanasa (PR-2)	NAC (NAM, ATAF y CUC)
Proteína LRR	Precursor de quitinasa (PR-3)	Myb (oncogén mieloblastosis)
	Inhibidor de proteasa (PR-6)	

De manera ilustrativa, se indican algunas de las proteínas codificadas por los genes que indujeron su expresión en respuesta a la infección por el fitoplasma Bois Noir en *Vitis vinifera* (figura 1.13).

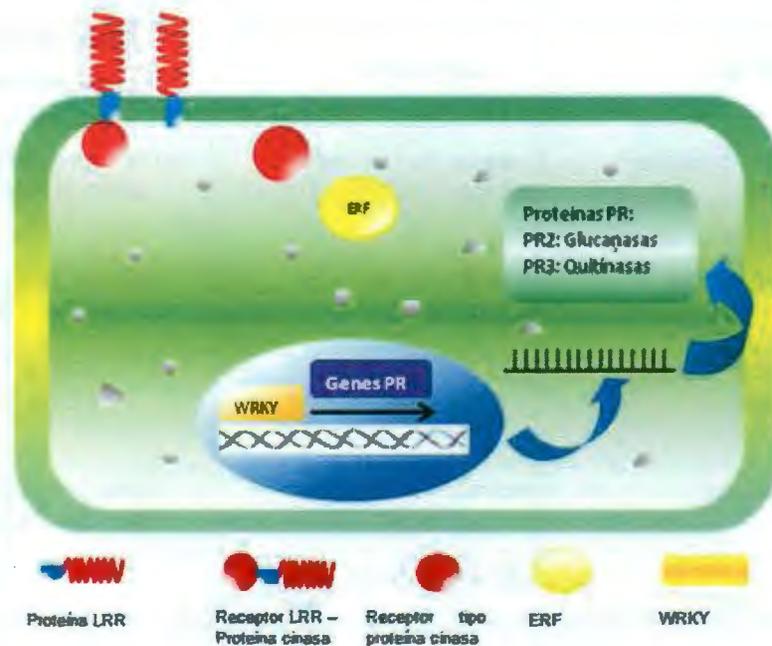


Figura 1.13. Representación ilustrativa de las proteínas codificadas por los genes involucradas en los mecanismos de defensa inducidos en respuesta a fitoplasmas.

En base a todo lo descrito anteriormente y con la finalidad de comprender de forma más compleja los mecanismos de defensa del cocotero, nos planteamos como principal objetivo el aislamiento y la identificación de secuencias análogas a genes de resistencia, los cuales podrían estar relacionados a los genes de resistencia descritas en otras especies y que quizás podrían estar jugando un papel fundamental en las respuestas de defensa de este cultivo ante los patógenos que lo afectan como el fitoplasma causante del amarillamiento letal.

1.2 HIPÓTESIS

Reportes en la literatura, revelan la presencia de secuencias candidatas a genes de resistencia en diferentes genomas de plantas, los cuales, han mostrado homología con genes *R*; por lo tanto, es posible, que dichas secuencias estén presentes en el genoma de las palmas de cocotero.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 General

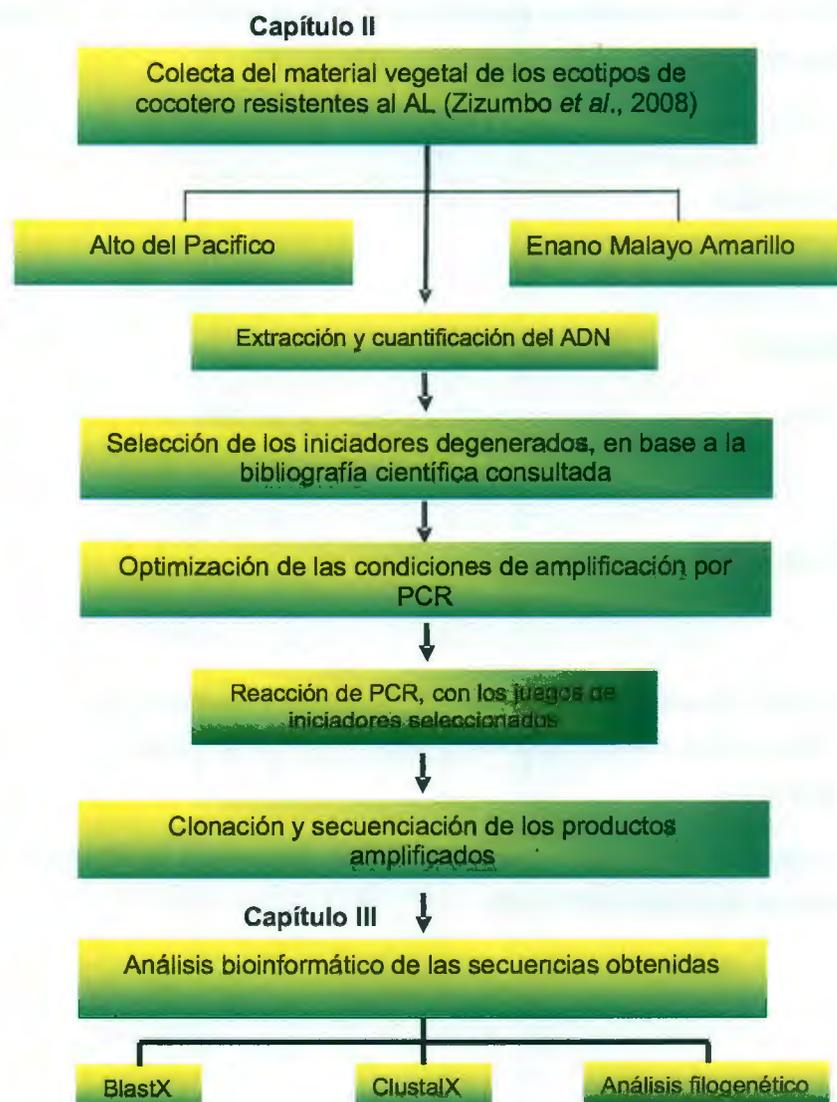
Aislar y caracterizar secuencias candidatas a genes de resistencia en palmas de cocotero.

1.3.2 Particulares

- a) Evaluar diferentes combinaciones de iniciadores degenerados para la amplificación de motivos conservados del dominio NBS y LRR de secuencias candidatas a genes de resistencia.
- b) Analizar la estructura y filogenia de las secuencias candidatas a genes de resistencia de la clase NBS-LRR.

1.4 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental implementada para llevar a cabo el siguiente estudio se resume en el siguiente esquema.



1.5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aarts M., te Lintel H., Holub E., Beynon J., Stiekema W. and Pereira A. (1998). Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*, 11:251-258.
- Albertazzi G., Milc J., Caffani A., Francia E., Roncaglia E., Ferrari F., Tagliafico E., Stefani E. and Pecchioni N. (2009). Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. *Plant Science*, 176, 792-804.
- Alfano, J.R., and Collmer, A. (1996). Bacterial pathogens in plants: life up against the wall. *Plant Cell*, 8, 1683–1698.
- Aravind, L. and Koonin, E.V. (1999). Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: Structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *J. Mol. Biol*, 285, 1353–1361.
- Bradley, W. (2006). Proceedings of the International conf. on Renewable Energy for Developing countries. USA.
- Been, B. (1981). Observations on field resistance to lethal yellowing in coconut varieties and hybrids in Jamaica. *Oléagineux*, 36, 9-11.
- 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.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803–814 (2006).
- Coll, N.S., Vercaemmen D., Smidler A., Clover C., van Breusegem F., Dangl J.L. (2010). *Arabidopsis* Type I metacaspases control cell death. *Science*, 330, 1393–1397.
- Collins, N.C., Webb, C.A., S. Seah, J. G. Ellis, S.H., Hulbert, and A. Pryor. (1998). The Isolation and Mapping of Disease Resistance Gene Analogs in Maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 968–978.
- CONACOCO (2008). Consejo Nacional del cocotero, www.conacoco.com.mx.
- Cordero J.C. and Skinner D. Z. (2002). Isolation from alfalfa of resistance gene analogues containing nucleotide binding sites. *Theor Appl Genet*, 104, 1283–1289
- Dangl, J. L. and Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411, 826–833.

- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 8024–8029.
- De Wit, P.J.G.M. (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. *Trends Plant Sci*, 2, 452–458.
- Di Gaspero, G., and Cipriani, G. (2002). Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 163–172.
- Dominguez, E., López, J., Castillo, R. and Ruiz, P. (1999). El cocotero (*Cocos nucifera* L.) Manual para la producción en México. INIFAP. Libro técnico, 6, 133 p.
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol*, 7, 547–552.
- Doyle, P. (1998). The impact of lethal yellowing type coconut diseases on small farmers. Natural Resources Institute, UK.
- Durrant, W.E. and Dong X. (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopatology*, 42, 185–209.
- Ellis, J. and Jones, D. (1998). Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogens resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 1, 288–293.
- Ellis, J., Doods, P. and Pryor, T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 278–284.
- Eulgem, T. (2005). Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome, *Trends Plant Sci*, 10, 71–78.
- FAO. (1998). Production yearbook. Database Results.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell*, 5, 1003–1011.
- Goodman, R.N., and Novacky, A.J. (1994). *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens*. St. Paul, MN: APS Press.
- Griffith R. (1987). Redring disease of coconut palm. *Plant Dis*, 71, 193–196.
- Gu, K., Yang, B., Tian, D., Wu, L., Wang, D., Sreekala, C., Yang, F., Chu, Z., Wang, G.L., White, F.F., and Yin, Z. (2005). R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. *Nature*, 435, 1122–1125.
- Hammond-Kosack, K.N., and Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8, 1773–1791.

- Hanold, D. and Randles, J. (1991). Coconut cadang-cadang disease and its viroid agent. *Plant Dis*, 75, 330-335.
- 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., Cordova, I., Richardson, P. and Dibonito, R. (1999). Detection and diagnosis of lethal yellowing. In: C. Oropeza, J.L. Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardeña and J.M. Santamaría (Eds) *Current Advance in Coconut Biotechnology*. Pp 183-196. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherland (In press).
- Heat, M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology*, 3,321–334.
- Hoerberichts, F.A., Ten Have A., and Woltering E.J., (2003). A tomato metacaspase gene is upregulated during programmed cell death in botrytis cinerea-infected leaves. *Planta*, 217, 517–522.
- Howard F. and Barrant C. (1989). Question and answers about lethal yellowing disease. *Principies*, 33, 163-171.
- Infojardin. *Cocos nucifera*. <http://fichas.infojardin.com/palmeras/cocos-nucifera-cocotero-palma-cocotera-palmera-coco-indiana.htm>. (Acceso 17 enero 2012).
- John M. and Bonnie J.W. (2003). Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *TRENDS in Biotechnology*, 21, 178-183.
- Jones J. and Dangl J. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
- Jones, D., and Jones J. (1997). The roles of leucine rich repeats in plant defences. *Adv. Bot. Res. Adv. Plant Pathol.* 24, 90–167.
- Jones, D.G. and Dangl L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444, 323-329.
- Joseph, T. and Radha K. (1975). Role of *Phytophthora palmivora* in but rot of coconut. *Plant Dis Repr*, 59, 1014-1017.
- Kanazin, V., Fredrick Marek, L., and Shoemaker, R.C. (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 93, 11 746 – 11 750.
- Kawchuk, L.K., Hachey, J., Lynch D.R., Kulcsar, F., van Rooijen, G. and Waterer, D.R. (2001). Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 6511–5.
- Kobe, B. and Deisenhofer, J. (1995). A structural basis of the interaction between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature*, 374:183-86.
- Lao, D.A. (2008). *Bioenergy Forum*. Bangkok.

- Lida plant research. Extracto de *Saccharomyces cerevisiae*: modo de acción contra patógenos. http://www.lidaplantresearch.com/site/investigacion_lectura.php?id_seccion=30&id_contenido=131&pg=2. (Acceso 17 enero 2012).
- Limei, He, Chunguang, Du, Lina Covaleda, Zhanyou Xu, A. Forest Robinson, John Z. Yu, Russell J. Kohel, and Hong-Bin Zhang. (2004). Cloning, Characterization, and Evolution of the NBS-LRR-Encoding Resistance Gene Analogue Family in Polyploid Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 1234–1241.
- Lizama G., Estrada I., Caamal, M., Souza, R., Oropeza, C., Islas, I. and Zuñiga, J. (2007). Chitosan activates a MAP-kinase pathway and modifies abundance of defense-related transcripts in calli of *Cocos nucifera* L. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70, 130-141.
- Martin, G., Bogdanove, A. and Sessa, G. (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 54, 23-61.
- Meyers, B., Dickerman, A., Michelmore, R., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B., and Young, N. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J*, 20, 317-332.
- Meyers, B.C, Kozik, A., Griego, A., Kuang, H. and Michelmore, R.W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15, 809-834.
- Miller, R., Bertioli, D., Baurens, F., Santos, C., Alves, P., Martins, N., Togawa, R., Souza, M. and Pappas, G. (2008). Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. *BMC Plant Biology*, 15, 1-15.
- Monosi, B., Wisser, R.J., Pennill, L. and Hulbert, S.H. (2004). Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theor Appl Genet*, 109, 1434-1447.
- Mur LA., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H. and Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot*, 59, 501–520.
- Narváez C. M. (2010). Inducción de SAR en plantas de cocotero infectadas con *Phytophthora capsici*. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Mérida, Yucatán, México. 60 p.
- Noir, S., Combes, M.-C., Anthony, F., and Lashermes, P. (2001). Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee tree (*Coffea* L.). *Mol. Genet. Genomics*, 265: 654–662.
- Ohler, J. (1999). *Modern Coconut Management. Palm Cultivation and Products*. FAO. Pag. Web. [http://ecoport.org/exes\\$PassCheckStart?ID=E127](http://ecoport.org/exes$PassCheckStart?ID=E127).

- Parthasarathy, M., van Slobbe, W. and Soudant C. (1978). Hartrot or fatal wilt of palms. 1. Coconuts (*Cocos nucifera*). *Principes*, 22, 3-14.
- Peraza-Echeverria, S., Dale, J.L., Harding, R.M., Smith, K. Mike and Collet C. (2008). Characterization of disease resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from banana and correlation of a transcriptional polymorphism with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4. *Mol Breeding*, 22, 565-579.
- Pieterse, A., Leon-Reyes, S. Van der Ent and S. Van Wees. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5, 308-316.
- Pieterse C.M. and van Loon, L.C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways, *Trends Plant Sci*, 4, 52-58.
- Rivkin, M.I., Vallejos, C.E., and McClean, P.E. (1999). Disease-resistance related sequences in common bean. *Genome*, 42: 41-47.
- Rohde W., Randles J., Langridge P. and Hanold D. (1990). Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus, *Virology*, 176:648-51.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., and Hunt, M.D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 8, 1809-1819.
- Saraste, M., Sibbald, P., and Wittinghofer A. (1990). The P-loop a common motif in ATP- and GTP binding proteins. *Trends Biotechnol*, 15, 430-435.
- Staskawiez, B., Ausubel, F., Baker B., Ellis J. and Jones J. (1995). Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, 268, 661-667.
- Timmerman-Vaughan, G., Frew, T. and Weeden, N. (2000). Characterization and linkage mapping of R-gene analogous DNA sequences in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 241-247.
- Traut, T. (1994). The functions and consensus motifs of nine types of peptide segments that form different types of nucleotide binding-sites. *Eur J Biochem*, 222, 9-19.
- Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J.D. and Katagiri, F. (2008). Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J*, 53, 763-775.
- Uhl, N. and Dransfield, J. (1987). *Genero Palmarum: The L.H. Bailey Hortorium and Internacional Palm Society*. Allen Press, Lawrence, Kansas, 1.610.
- Van Der Biezen, E., Freddie, C., Kahn, K., Parker, J. and Jones J. (2002). Arabidopsis RPP4 is a member of the RPP5 multigene family of TIR-NB-LRR genes and confers downy mildew resistance through multiple signalling components. *Plant J*, 29, 439-451.

- Van der Biezen, E.A. and Jones, J.D.G. (1998). Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci*, 23, 454–456.
- Van Loon, L.C., and Van Kammen, A. (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN." II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40, 199–211.
- Walker, J., Saraste, M., Runswick, M. and Gay, N. (1982). *EMBO J*, 1, 945-951.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.P., and Ryals, J.A. (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085–1094.
- Woodrof, J. 1979. Coconuts: Production, processing, products. AVI. Publishing Co.
- Yong, G. Yu., Glenin, R. Buss and M.A. Saghai Maroof. (1996). Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 11751–11756.
- Young, N. (2000). The genetic architecture of resistance. *Curr Opin Plant Biol*, 3, 285-290.
- You-Xiong Que, Li-Ping Xu, Jian-Wei Lin, and Ru-Kai CHE. (2009). Isolation and Characterization of NBS-LRR Resistance Gene Analogs from Sugarcane. *Acta Agron Sin*, 35, 631–639.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W. (2004). *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, 136, 2621–2632.
- Zizumbo-Villareal, D, Colunga-García Marín P, Fernández-Barrera, M, Torres-Hernández, N. and Oropeza C. (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Plant Genetic Resources Newsletter*, FAO-Bioversity 156: 23-33.

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DE INICIADORES DEGENERADOS PARA AMPLIFICAR POR PCR SECUENCIAS CANDIDATAS A GENES DE RESISTENCIA DEL TIPO NBS-LRR EN COCOTERO Y CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS.

2.1 INTRODUCCIÓN

En América y en el Caribe la producción del cocotero contribuye con cerca del 10% a la producción mundial, siendo México y Brasil los países productores más importantes. En México, el cocotero es uno de los cultivos de mayor importancia económica, con una superficie de 100 mil ha, de las cuales dependen aproximadamente 50 mil familias que viven directamente del cultivo (Conacoco, 2008). Desafortunadamente, la palma de cocotero está sujeta al ataque de diversos agentes que producen diversas enfermedades y que afectan su producción, entre los que se encuentran; virus (Rohde *et al.*, 1990), viroides (Hanold y Randles, 1991), protozoos (Parthasarathy *et al.*, 1978), hongos (Joseph y Radha, 1975), nematodos (Griffith, 1987) y mollicuotas, como el fitoplasma el causante del amarillamiento letal (AL) (Howard y Barrant, 1989).

A pesar de la gran importancia de este cultivo y a la diversidad de patógenos que afectan su producción, los mecanismos de defensa han sido poco estudiados, en comparación con otras plantas, las cuales son capaces de reaccionar y defenderse por sí solas ante los patógenos que las afectan. Dentro de los mecanismos de defensa activadas por las plantas, las proteínas de Resistencia (R) codificadas por genes de resistencia (*R*), proveen una efectiva inmunidad en la planta hospedera a través del reconocimiento de moléculas efectoras (Chisholm *et al.*, 2006). Por lo tanto la introgresion de genes *R* dentro de cultivares susceptibles de plantas hospederas confiere inmunidad eficiente contra patógenos que expresan el mismo efector (Dennis *et al.*, 2008).

Debido a la gran importancia de los genes de resistencia, estos han sido clonados e identificados usando tecnologías como el etiquetamiento por transposones y la clonación

posicional ("caminata por el cromosoma") (Meyers *et al.*, 1999). Sin embargo, el uso de de estas tecnologías para la identificación de nuevos genes *R*, es todavía aún laboriosa y consume mucho tiempo. Por otro lado, el diseño de iniciadores degenerados en base a los motivos altamente conservados del dominio NBS de estos genes, abre una puerta para el aislamiento de secuencias candidatas a genes de resistencia o secuencias análogas a genes de resistencia (RGCs) empleando la técnica de PCR y la secuenciación. Esta metodología ha sido utilizada en una gran variedad de especies de plantas, tales como soya (Kanazin *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 1996) frijol (Rivkin *et al.*, 1999), café (Noir *et al.*, 2001), alfalfa (Cordero y Skinner, 2002; Zhu *et al.*, 2002), uva (Di Gaspero y Cipriani, 2002), banano (Peraza-Echeverria *et al.*, 2008), caña de azúcar (You-Xiong *et al.*, 2009), otros cultivares, sin embargo, para el cocotero este no ha sido el caso. El aislamiento de estas secuencias en este cultivo establecerá una base para inicio de diversos estudios como son el aislamiento de genes de resistencia y el desarrollo de marcadores moleculares para la selección de palmas resistentes a plagas y patógenos. Para poder lograr el aislamiento de estas secuencias de manera exitosa, se debe contar con iniciadores degenerados que flanqueen los motivos conservados de los genes *R*, así como también optimizar las condiciones de amplificación por PCR (Yaish *et al.*, 2004), por tal motivo, el objetivo en este capítulo, fue la selección de iniciadores degenerados en base a la bibliografía científica consultada, la optimización de las condiciones de amplificación por PCR y la clonación de los productos amplificados.

2.2 MATERIALES Y METODOS

2.2.1 Colecta del material vegetal

Para este estudio se muestrearon 10 palmas del ecotipo Alto del Pacífico (AP) localizados en la plantación experimental de San Crisanto Yucatán, México; así como también 2 palmas del ecotipo Enano Malayo Amarillo (EMA) obtenidos en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), los cuales presentan resistencia ante la enfermedad del amarillamiento letal (Zizumbo *et al.*, 2008). De cada palma se muestreo la hoja joven y se almaceno en congelación (-80 °C) hasta su uso posterior.

2.2.2 Extracción del ADN

Para la extracción del ADN se siguió el protocolo establecido por Doyle y Doyle (1987), con modificaciones de Harrison *et al.*, (1994). El método de extracción consistió en macerar 1 gramo de tejido vegetal en nitrógeno líquido con un mortero y un pistilo. El tejido pulverizado se colocó en un tubo falcón de 14 ml y se adiciono 5 ml del buffer CTAB (CTAB 2%, PVP40, EDTA 25 mM, Tris HCl 100 mM y NaCl 2 M). Las muestras fueron incubadas durante 30 min a una temperatura de 65 °C. Posteriormente se tomo 1 ml de la muestra, se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml y se le adiciono 1 ml de phenol-cloroformo isoamilico. Los ácidos nucleídos se separaron del material proteico centrifugando 5 min a 14 000 rpm, se tomo el sobrenadante y se precipito el ácido nucleico con acetato de sodio e isopropanol frío incubando las muestras por 1 hr a -20 °C. Se llevo a cabo un segundo proceso de centrifugado a 14, 000 rpm durante 10 min, para obtener los sólidos en forma de pastilla. La pastilla fue lavada con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendio en 50 µl de H₂O ultra pura (Ambion) y se realizo una electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar la calidad y cantidad de ADN.

2.2.3 Cuantificación y optimización de la concentración de ADN

Una vez extraído el ADN, fue cuantificado por medio de espectrometría y cada muestra se homogenizó a una concentración de 100 ng/μl. Una vez cuantificadas, se realizó una mezcla de ADN de las palmas muestreadas para el ecotipo Alto del Pacífico y las de Enano Malayo Amarillo con la finalidad de aumentar el número de secuencias blanco a amplificar. La mezcla de ADN se realizó tal como se describe en la siguiente figura (figura 2.1).

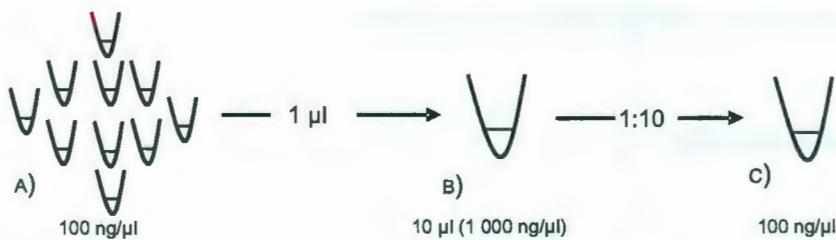


Figura 2.1. Mezcla de ADN. A) Cada tubo contiene 100 ng/μl de ADN. Se tomó 1 μl de ADN de cada tubo y se adicionó a otro, B) obteniendo de esta manera una concentración de 1000 ng/μl. C) Se realizó una dilución 1:10 y de esta manera se obtuvo la concentración deseada para la reacción de PCR (100 ng/μl).

2.2.4 Selección de iniciadores degenerados

Los iniciadores degenerados fueron seleccionados en base a la literatura científica consultada (Aarts *et al.*, 1998; Kanazin *et al.*, 1996; Penuela *et al.*, 2002; Bertioli *et al.*, 2003 y Miller *et al.*, 2008; Peraza-Echeverría *et al.*, 2008), principalmente los que han sido utilizados para la búsqueda de RGCs en monocotiledoneas. En el siguiente diagrama (figura 2.2) se describe un protocolo computacional implementado por Miller *et al.*, (2008), para el diseño de iniciadores degenerados que flanquean motivos conservados dentro de los dominios NBS-LRR en plantas monocotiledoneas.

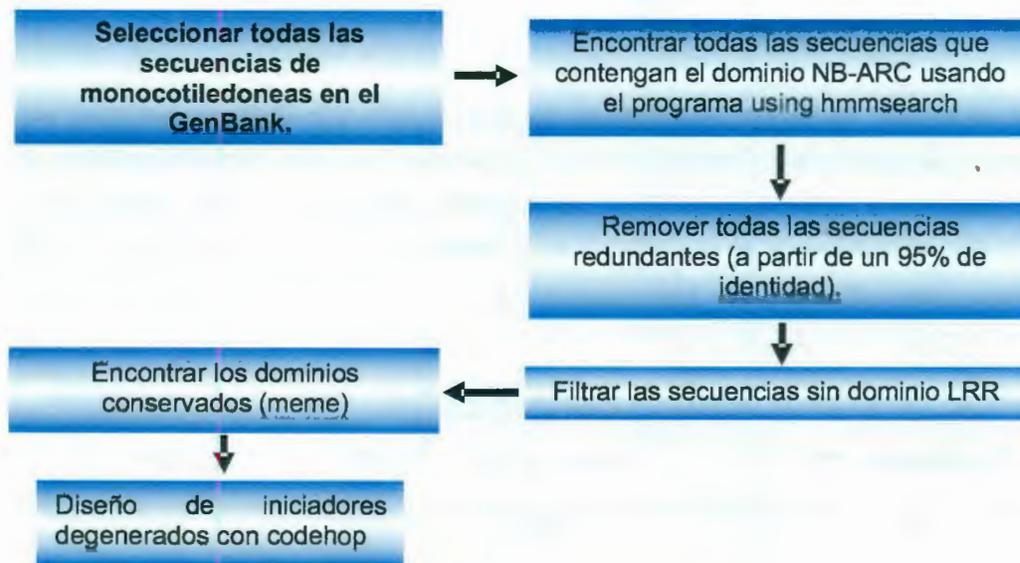


Figura 2.2. Protocolo computacional, para el diseño de iniciadores degenerados para la amplificación de secuencias candidatas a genes de resistencia (Miller *et al.*, 2008).

2.2.5 Optimización de las condiciones de amplificación

Para establecer las condiciones óptimas de amplificación por PCR, se probaron dos diferentes temperaturas de hibridación de los iniciadores, los cuales han sido previamente utilizadas para el aislamiento de RGCs en diferentes especies de plantas (Miller *et al.*, 2008; Peraza-Echeverría *et al.*, 2008; Ellen y Helen, 2009). Las temperaturas que se probaron fueron; 50 y 45°C por 1 min (cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Condiciones de temperatura probadas (50/45°C) en la hibridación de los iniciadores.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
96	01:00	1
94	01:00	
→ 50/45	01:00	40
72	01:00	
72	10:00	1

2.2.6 Evaluación de diferentes concentraciones de iniciadores

Para el aislamiento de RGCs, diferentes concentraciones de iniciadores han sido utilizados en la mezcla de reacción de PCR. Sin embargo, para nuestro estudio se probaron dos concentraciones de iniciadores basándonos en la literatura científica consultada (Peraza-Echeverría *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2008; Ellen y Helen, 2009) las cuales fueron; 1.0 µM y 2.0 µM. Por otra parte, también se realizó un gradiente en la concentración de los iniciadores, la cual fue; 0.5 µM, 1.0 µM, 1.5 µM, 2.0 µM y 2.5 µM.

2.2.7 Clonación de los productos amplificados

Una vez establecidas las condiciones óptimas de amplificación, se llevó a cabo la reacción de PCR. Los productos amplificados fueron purificados de los geles de agarosa al 1% usando el kit de extracción QIAquick (QIAGEN). Una vez purificados los fragmentos se ligaron dentro del vector pGEM-T Easy (Promega) (figura 2.3). La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 12 μ l, utilizando 1 μ l de la enzima T4 ADN ligasa (1U/ μ l), 1 μ l del vector pGEM-T Easy (50 ng/ μ l), 4 μ l del producto de PCR y 5 μ l del amortiguador de ligación 2X. La mezcla de ligación fue incubada por 16 hrs a 16°C.

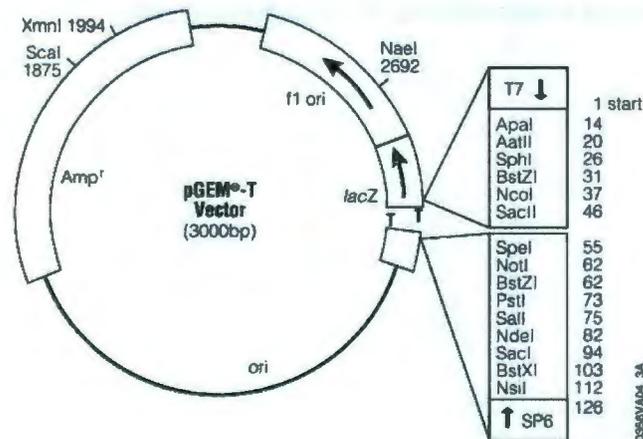


Figura 2.3. Esquema que muestra los principales puntos de referencia del vector de clonación pGEM-T Easy.

Posteriormente se tomaron 4 μ l del producto de ligación para llevar a cabo la transformación de las células competentes de *Escherichia coli* mediante choque térmico a 42°C por 45 s. Las bacterias fueron crecidas en medio sólido LB conteniendo ampicilina (100 mg/l) como antibiótico de selección de colonias transformadas, IPTG (0.5 mM) como inductor de la expresión del gen *lacZ* y XGAL (80 mg/l) como sustrato de la β -galactosidasa para indicar la expresión de la misma enzima mediante la observación de colonias blancas y azules.

Las colonias blancas fueron picadas y puesta a crecer en 5 ml de medio líquido LB con ampicilina (100 mg/l) a 37°C y 200 rpm durante toda la noche con la finalidad de multiplicar el plásmido recombinante. Las colonias blancas indican la falta de expresión de la enzima β -galactosidasa debido a la interrupción del gen *lacZ* por la inserción del fragmento de interés.

Una vez multiplicado el plásmido recombinante, se tomaron 4 ml del cultivo para la extracción del plásmido utilizando el kit Miniprep QIAprep (QIAGEN), los cuales fueron previamente cuantificados con la ayuda del marcador de masas High mass (Invitrogen), para determinar la concentración requerida en la reacción de secuenciación. La secuenciación se llevo a cabo, en la Universidad de Davis, California, por medio del método dideoxi, ideado por Sanger el cual está basado en el empleo de didesoxinucleótidos que carecen de uno de los grupos hidroxilo.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Extracción del ADN

El ADN fue extraído del tejido de las palmas Alto del Pacífico y Enano Malayo Amarillo siguiendo el método de extracción de CTAB reportado por Doyle y Doyle (1987) con modificaciones de Harrison *et al.*, (1994). Los resultados se presentan en la siguiente figura (figura 2.4).



Figura 2.4. Imagen representativa del ADN extraído de las palmas muestreadas. La flecha (parte superior derecha) indica el ADN extraído para cada ecotipo de cocotero. EMA) Enano Malayo Amarillo, AP) Alto del Pacífico, M) marcador molecular.

2.3.2 Selección de iniciadores degenerados

En base a la bibliografía científica consultada se lograron seleccionar una serie de iniciadores degenerados, los cuales flanquean secuencias específicas conservadas de genes de resistencia y que fueron utilizados para la búsqueda de RGCs en cocotero. En el siguiente cuadro (cuadro 2.2) se mencionan los iniciadores degenerados seleccionados, así como también la secuencia y las referencias de donde se eligieron.

Cuadro 2.2. Iniciadores seleccionados para aislar RGCs en cocotero.

Iniciadores	Secuencias	Referencias
Iniciadores generales (TIR/NO TIR)		
PIA (Inicio)	GGIATGCCIGGIIIGGIAARACIAC	Bertioli <i>et al.</i> , 2003
PIB (Inicio)	GGIATGGGIGGIIIGGIAARACIAC	Bertioli <i>et al.</i> , 2003
P-loop(Inicio)	GGIGGIGTIGGIAAIACIAC	Kanazin <i>et al.</i> , 1996
GLPLA(Termino)	A(A/G)IGCTA(A/G)IGGIA(A/G)ICC	Aarts <i>et al.</i> , 1998.
P3A (Termino)	AIITYIRIIRYIAGIGGYAAICC	Bertioli <i>et al.</i> , 2003
RNBS-D(Termino)	GGRAAIARISHRCARTAVIRAARC	Penuela <i>et al.</i> , 2002
Iniciadores específicos (NO TIR)		
3F2 (Inicio)	GAGGTACTTCCTGGTGCTGGAYG AYRTBTGG	Miller <i>et al.</i> , 2008
13R1 (Termino)	CGGCCAAGTCGTGCAYVAKRTCR TGCA	

Código de degeneración: I = inosina; R = A/G; Y = C/T; M = A/C; K = G/T; W = A/T; S=C/G; B = C/G/T; D = A/G/T; H = A/C/T; V = A/C/G; N = A/C/G/T.

Una vez seleccionados los iniciadores, se realizaron seis combinaciones tal y como se describen en el siguiente cuadro (cuadro 2.3), incluyendo también los motivos conservados los cuales flanquean los dominios blancos que pueden amplificar.

Cuadro 2.3. Combinaciones de los iniciadores seleccionados para la amplificación de RGCs.

Combinación	Iniciadores	Motivos blancos	Dominios blancos	Tamaño del amplicon
C1	(PIB-RNBSD)	P-loop/RNBS-D	no-TIR NBS	700 pb
C2	(3F2-13RI)	Kinasa 2/LRR	No-TIR NBS-LRR	650 pb
C3	(PIB-P3A)	P-loop/GLPL	TIR y no-TIR NBS	650 pb
C4	(PIA-P3A)	P-loop/GLPL	TIR y no-TIR NBS	650 pb
C5	(PIA-RNBSD)	P-loop/RNBS-D	No-TIR NBS	700 pb
C6	(P-loop-GLPLA)	P-loop/GLPL	TIR y no-TIR NBS	530 pb

2.3.3 Sitio de unión de los iniciadores

Los iniciadores seleccionados flanquean secuencias altamente conservadas características de los genes de resistencia. En el siguiente diagrama se ilustran los sitios blancos de estos iniciadores (figura 2.5).

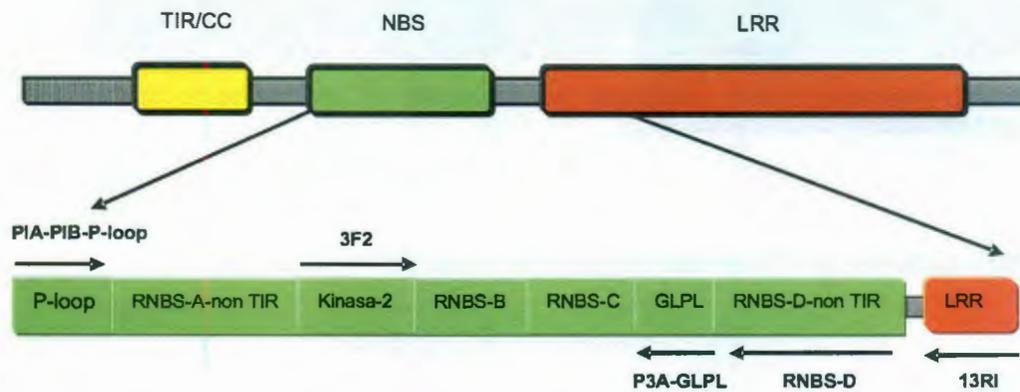


Figura 2.5. Sitio de unión de los iniciadores degenerados dentro del dominio NBS y LRR.

2.3.4 Optimización de las condiciones de amplificación

Para la optimización de las condiciones de amplificación se probaron dos temperaturas de hibridación de acuerdo a reportes previos en la literatura (Miller *et al.*, 2008; Peraza-Echeverría *et al.*, 2008; Ellen y Helen, 2009), las cuales fueron; 50 y 45°C. En la siguiente figura (figura 2.6) se puede observar que en la temperatura de hibridación a 45°C se obtuvieron los mejores resultados al obtener amplificación con cinco (C1-4 y C6) de los seis juegos de iniciadores que se probaron.



Figura 2.6. Optimización de las condiciones de amplificación. a) Temperatura de hibridación de 50°C y b) temperatura de hibridación 45°C .

2.3.5 Evaluación de diferentes concentraciones de iniciadores

En base a los resultados anteriores se seleccionó el primer juego de iniciadores (C1) y se probaron diferentes concentraciones de estos, con la finalidad de mejorar las bandas obtenidas. Se utilizó ADN de una palma del ecotipo EMA y del AP. En la parte de abajo se pueden observar dos figuras (figura 2.7 y 2.8) que ilustran los resultados que se obtuvieron. En la primera (figura 2.7), se probaron dos concentraciones de iniciadores; 1.0 μM y 2.0 μM . Los resultados nos indican que en la concentración de 2 μM se obtuvo una banda más intensa para la muestra de EMA que en la concentración de 1.0 μM , mientras que en la muestra AP en ambas concentraciones se obtuvo una banda bien definida y casi homogénea. En la figura 2.8, solamente se utilizó ADN de AP. En este caso, se realizó un gradiente, en donde las concentraciones de iniciadores fueron; 0.5 μM , 1.0 μM , 1.5 μM , 2.0 μM y 2.5 μM . En este caso se obtuvieron bandas casi de la misma intensidad en todas las concentraciones probadas, aunque en la concentración de 2.0 μM la banda estuvo mejor definida. En base a estos resultados obtenidos, se decidió utilizar una temperatura de hibridación de 45°C y una concentración de iniciadores de 2 μM para llevar a cabo las reacciones de PCR.

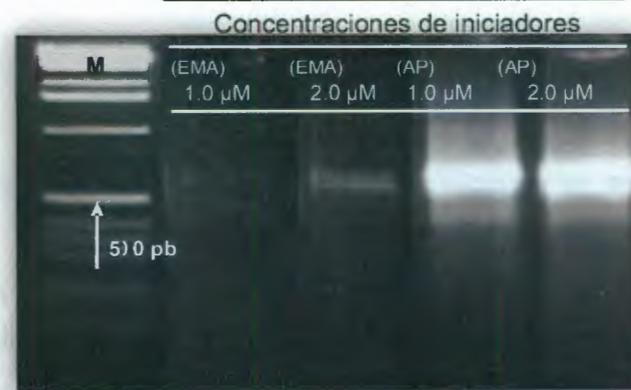


Figura 2.7. Evaluación de 2 concentraciones de iniciadores; 1.0 μ M y 2.0 μ M. Las primeras dos columnas son muestras de EMA y los dos últimos carriles corresponden a la muestra del AP.

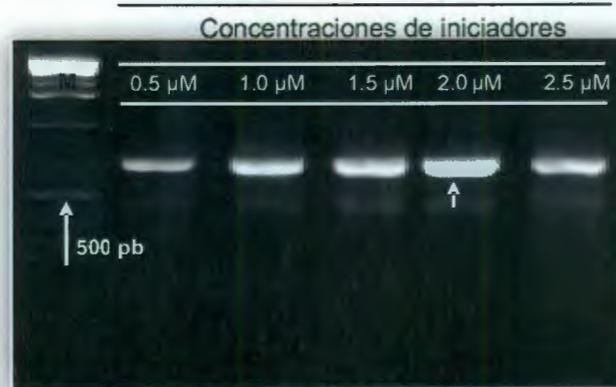


Figura 2.8. Evaluación de un gradiente de concentraciones de la C1. La concentración es de 0.5 a 2.5 μ M en una escala de 0.5 μ M.

2.3.6 Reacción de PCR para el aislamiento de RGCs

Una vez establecidas las condiciones de amplificación, se realizó la reacción de PCR utilizando la C1, la C2 y la C6 de iniciadores.

La C1 amplifica un producto de 700 pb flanqueando los motivos P-loop y RNBS-D, dentro del dominio NBS. Esta combinación fue seleccionada para el aislamiento de RGCs, debido a que se obtuvo amplificación positiva en las pruebas de optimización (figura 2.6) en comparación con la C5 diseñados para flanquear el mismo blanco.

Con la C1 se logro obtener una banda del tamaño esperado utilizando el ADN de los dos ecotipos de cocotero (AP y EMA) (figura 2.9). Las bandas observadas son de 700 pb de bases tal y como se esperaba.

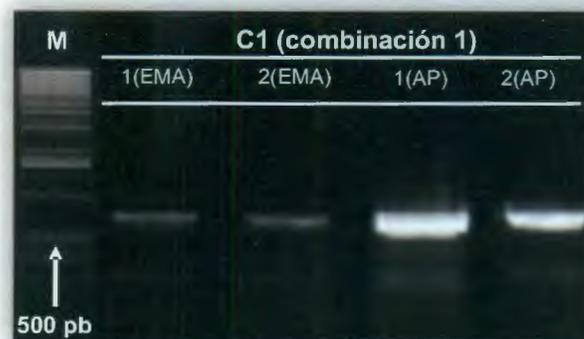


Figura 2.9. Reacción de PCR con la C1 de iniciadores. Carriles 1 y 2; EMA, Carriles 3 y 4; AP. M) marcador molecular.

La (C2) de iniciadores amplifican un producto de 650 pb, flanqueando los motivos kinasa-2 del dominio NBS y parte del dominio LRR, a diferencia de los otras combinaciones que solamente flanquean el dominio NBS. En base a esto, se decidió trabajar en ellos con la finalidad de lograr aislar secuencias que contengan parte del dominio LRR, el cual, es importante para el reconocimiento de las proteínas de avirulencia. De acuerdo a nuestros resultados, se ha logrado obtener amplificación en los dos ecotipos de cocotero (AP, EMA). Los resultados se pueden observar en la siguiente figura (figura 2.10).

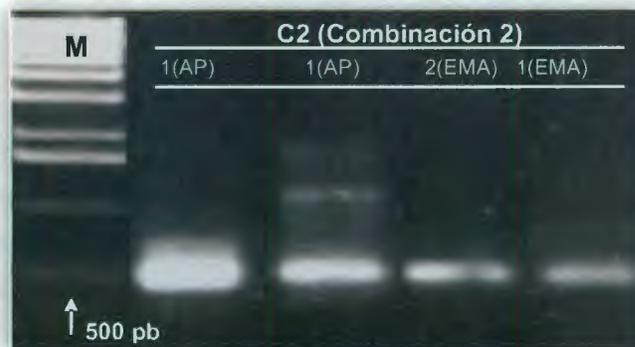


Figura 2.10. Reacción de PCR con la C2 de iniciadores. Carriles 1; EMA. Carriles 2 y 3; AP. M) marcador molecular.

La C6 de iniciadores amplifican un producto de 530 pb, flanqueando el motivo P-loop y el motivo GLPL dentro del dominio NBS. Estos iniciadores fueron seleccionados para el aislamiento de RGCs debido a que en las pruebas de optimización (figura 2.6) mostraron una banda bien definida e intensa en comparación con las otras combinaciones las cuales flanquean los mismos sitios. Con esta combinación, se logró amplificación en ambos ecotipos de cocotero (figura 2.11).

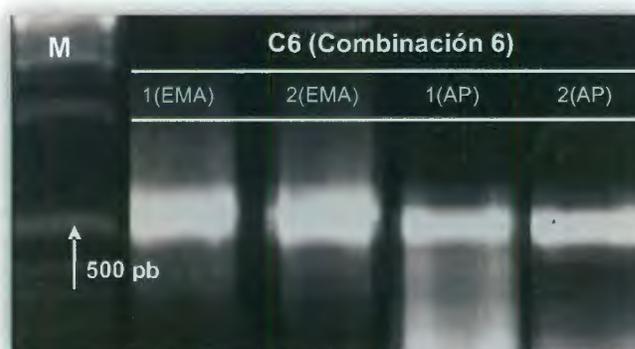


Figura 2.11. Reacción de PCR con la C6 de iniciadores. Carriles 1 y 2; EMA. Carriles 3 y 4; AP. M) marcador molecular.

2.3.7 Clonación de los productos amplificados

Los productos amplificados utilizando las tres combinaciones de iniciadores (C1, C2 y C6), fueron clonados y en el siguiente cuadro (cuadro 2.4), se indica el número de colonias positivas (blancas) obtenidas con cada combinación de iniciadores para cada ecotipo (AP, EMA), teniendo para la C1 un total de 70 colonias, para la C2; 42 y para la C6; 149, haciendo un total de 261 colonias.

Cuadro 2.4. Numero de colonias obtenidas con cada combinación de iniciadores para cada ecotipo de cocotero.

Combinaciones de iniciadores	Ecotipos	Número de colonias positivas
C1	Alto del Pacífico	45
	Enano Malayo Amarillo	25
	Total	70
C2	Alto del Pacífico	6
	Enano Malayo Amarillo	36
	Total	42
C6	Alto del Pacífico	70
	Enano Malayo Amarillo	79
	Total	149
TOTAL		261

2.4 DISCUSIÓN

En cocotero la susceptibilidad y la resistencia de ciertos ecotipos ante diversas enfermedades como el AL, podrían estar dadas por los mecanismos de defensa descritos en otras especies de plantas, sin embargo el genoma aún no secuenciado, hace más lento los estudios enfocados en la búsqueda de posibles genes involucrados en los mecanismos de defensa ante patógenos, como los genes de resistencia. Los genes *R* juegan un papel fundamental en la percepción y activación de las respuestas de defensa de las plantas. El aislamiento e identificación de secuencias análogas o candidatas a genes de resistencia en este cultivo abre una puerta para el desarrollo de nuevas estrategias de control de los patógenos que afectan su producción.

Actualmente la técnica de PCR utilizando iniciadores degenerados ha sido uno de los enfoques principalmente utilizados para amplificar secuencias análogas a genes de resistencia (RGCs) y posteriormente el aislamiento de genes de resistencia. Muchos RGCs han sido amplificados desde diversas especies de plantas usando esta metodología y actualmente más de 1,600 secuencias se encuentran publicadas en las bases de datos (McHale *et al.*, 2006).

En cocotero, para el aislamiento de RGCs, se seleccionaron 12 iniciadores degenerados (cuadro 2.2) los cuales presentaron los mejores resultados para el aislamiento de RGCs cuando fueron empleados en *Musa acuminata* (Miller *et al.*, 2009; Peraza-Echeverría *et al.*, 2008), una especie filogenéticamente cercana al cocotero por pertenecer a las monocotiledoneas. De los 12 iniciadores se realizaron 6 combinaciones (cuadro 2.3), de la misma manera como las realizadas por Miller *et al.*, (2008) y Peraza-Echeverría *et al.* (2008). Una vez seleccionados los iniciadores degenerados, el siguiente paso fue establecer las condiciones óptimas de amplificación para dar un balance entre la eficiencia y la especificidad de la reacción (Yaish *et al.*, 2004). Se probaron las temperaturas de hibridación de 50 y 45°C, obteniendo los mejores resultados en la de 45°C, en donde cinco de las seis combinaciones presentaron amplificación positiva del tamaño esperado (figura 2.6). La temperatura de hibridación de 45°C, también ha sido utilizada de manera exitosa en los programas de PCR para el aislamiento de RGCs, en cultivos como maíz (Collins *et al.*, 1998), café (Noir *et al.*, 2001), alfalfa (Cordero y

Skinner, 2002), algodón (Limei *et al.*, 2004), banano (Peraza-Echeverria *et al.*, 2008) y caña de azúcar (You *et al.*, 2009), sin embargo la de 50°C también ha mostrado buenos resultados en otros cultivos como lechuga (Shen *et al.*, 1998) y soya (Yu *et al.*, 1996), en este caso no fue eficiente para cocotero. Por otro lado también, se evaluaron diferentes concentraciones de iniciadores en la mezcla de reacción de PCR con la finalidad de mejorar las bandas obtenidas. Para esto, se seleccionó la C1 y los resultados obtenidos demostraron que la concentración óptima fue la de 2 μ M (figura 2.7 y 2.8) tanto para Enano Malayo Amarillo como para el Alto del Atlántico.

De las seis combinaciones de iniciadores probadas en las pruebas de optimización, tres combinaciones (C1, C2 y C6) fueron seleccionados en base a los resultados obtenidos. La C1, al igual que la C5, están diseñados para flanquear el mismo blanco (P-loop/RNBS-D), sin embargo la C1 fue seleccionada por presentar amplificación positiva en comparación con la C5 en donde no se obtuvo amplificación (figura 2.6). Por otro lado, la banda obtenida con la C6, fue más intensa y mejor definida que las amplificadas con la C3 y C4 las cuales flanquean el mismo blanco (P-loop/GLPL), motivo por el que también fue seleccionada (figura 2.6).

La C2 fue seleccionada debido a que flanquea parte del dominio NBS y parte del dominio LRR, a diferencia de las otras combinaciones que solamente amplifican el dominio NBS. El utilizar esta combinación de iniciadores degenerados probablemente nos ayude a encontrar mayor número de secuencias diferentes a las amplificadas con la C1 y la C6.

Por último, es importante mencionar que diferentes factores pudieron haber contribuido a la tasa de éxito de los iniciadores empleados en cocotero, como por ejemplo; el número de degeneraciones, la longitud del iniciador, la composición de nucleótidos, la posición de la degeneración dentro de cada iniciador, y la prevalencia de posibles blancos en las secuencias dianas. Estos factores pudieron reflejar los resultados observados en las bandas obtenidas con cada ecotipo de cocotero, así como también en el número de colonias positivas obtenidas.

2.5 CONCLUSIONES

1. Con la temperatura de hibridación de 45°C, se obtuvo amplificación con 5 de las 6 combinaciones de iniciadores probados, a diferencia de la temperatura de hibridación de 50°C en donde ninguno de los juegos de iniciadores mostró amplificación positiva.
2. La concentración de 2 μM de iniciadores degenerados en la mezcla de reacción de PCR, se obtuvieron los mejores resultados en amplificación en comparación con la concentración de 1 μM .
3. De las seis combinaciones de iniciadores seleccionados, tres (C1, C2 y C6) mostraron los mejores resultados durante las pruebas de optimización, por lo tanto fueron seleccionados para el aislamiento de RGCs en cocotero.
4. En total se obtuvieron 261 colonias positivas, obteniéndose el mayor número (149) con la combinación C6.

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aarts, M., te Lintel, H., Holub, E., Beynon, J., Stiekema, W. and Pereira, A. (1998). Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*, 11:251-258.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., and Dinesh-Kumar, S., P. (1997). Signaling in plant-microbe interaction. *Science*, 276: 726–733.
- Bertioli, D., Leal-Bertioli, S., Lion, M. Santos, V., Pappas, G., Cannon, S. and Guimareas, P. (2003). A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Mol Genet Genomics*, 270: 34-45.
- Chisholm, S.T, Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124:803-814.
- Collins, N.C., Webb, C.A., S. Seah, J. G. Ellis, S.H., Hulbert, and A. Pryor. (1998). The Isolation and Mapping of Disease Resistance Gene Analogs in Maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 968–978.
- CONACOCO (2008). Consejo Nacional del cocotero, www.conacoco.com.mx.
- Cordero J.C., and Skinner D. Z. (2002). Isolation from alfalfa of resistance gene analogues containing nucleotide binding sites. *Theor Appl Genet*, 104, 1283–1289.
- Dennis, E.S., Ellis, J., Green A., Llewellyn D., Morell M., Tabe L., and Peacock W.J. (2008). Genetic contributions to agricultural sustainability. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363:591-609.
- Di Gaspero, G., and Cipriani, G. (2002). Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). *Theor. Appl. Genet.*, 106: 163–172.
- Doyle and Doyle. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19:11-15.
- Ellen, K. and Helen, M. (2009). TIR-NBS-LRR genes are rare in monocots: evidence from diverse monocot orders. *BMC Research Notes*, 2: 197.
- Griffith, R. (1987). Red ring disease of coconut palm. *Plant Dis*, 71: 193-196.
- Hanold, D. and Randles, J. (1991). Coconut cadang-cadang disease and its viroid agent. *Plant Dis*, 75:330-335.

- Harrison, N., Richardson, P., Kramer, B. and Tsai H. (1994). Detection of micoplasma-like organism associated with lethal yellowing disease of palms in Florida by polymerase chain reaction. *Plant Pathol*, 43:998-1008.
- He, C., Y., Zhang, Z., Y., and Chen, S., Y. (2001). Cloning and analysis of a disease resistance gene homolog from soybean. *Chin Sci Bull*, 46: 1017–1021.
- Howard F. and Barrant C. (1989). Question and answers about lethal yellowing disease. *Principies*, 33:163-171.
- Joseph, T. and Radha K. (1975). Role of *Phytophthora palmivora* in but rot of coconut. *Plant Dis Repr*, 59, 1014-1017.
- Kanazin, V., Marek, L., and Shoemaker, R.C. (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 11, 746–11 750.
- Limei, He, Chunguang, Du, Lina Covalada, Zhanyou Xu, A. Forest R., John Z. Yu, Russell J. Kohel, and Hong-Bin Zhang. (2004). Cloning, Characterization, and Evolution of the NBS-LRR-Encoding Resistance Gene Analogue Family in Polyploid Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 1234–1241.
- Meyers, B., Dickerman, A., Michelmore, R., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B., and Young, N. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J*, 20; 317-332.
- McHale, L., Tan X., Koehl, P. and Michelmore, R.W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology*, 7: 212.
- Miller, R., Bertoli, D., Baurens, F., Santos, C., Alves, P., Martins, N., Togawa, R., Souza, M., and Pappas, G. (2008). Analysis of non-Tir NBS-LRR resistance analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. *BMC Plant Biology*, 15, 1-15.
- Noir, S., Combes, M.C., Anthony, F., and Lashermes, P. (2001). Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee tree (*Coffea* L.). *Mol. Genet. Genomics*, 265: 654–662.
- Parthasarathy, M., van Slobbe, W. and Soudant C. (1978). Hartrot or fatal wilt of palms. 1. Coconuts (*Cocos nucifera*). *Principes*, 22, 3-14.
- Penuela, S., Danesh, D., and Young, N.D., (2002). Targeted isolation, sequence analysis, and physical mapping of non-TIR NBS-LRR genes in soybean. *Theor Appl Genet*, 104:261-272.
- Peraza-Echeverria, S., Dale, J.L., Harding, R.M., Smith, K. Mike and Collet C. (2008). Characterization of disease resistance gene candidates of the nucleotide binding site

- (NBS) type from banana and correlation of a transcriptional polymorphism with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4. *Mol Breeding*, 22, 565–579.
- Rivkin, M.I., Vallejos, C.E., and McClean, P.E. (1999). Disease-resistance related sequences in common bean. *Genome*, 42: 41–47.
- Rohde, W., Randles, J., Langridge, P. and Hanold D. (1990). Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus, *Virology*, 176:648-51.
- Shen, K.A., Meyers, C.B., Islam-Faridi, N., Chin, D.B., Stelly, D.M. and Michelmore, R.W. (1998). Resistance Gene Candidates Identified by PCR with Degenerate Oligonucleotide Primers Map to Clusters of Resistance Genes in Lettuce. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11; 815; 823.
- Yaish, M.W.F., Sáenz de Miera, L.E. and Pérez de la Vega M. (2004). Isolation of a family of resistance gene analogue sequences of the nucleotide binding site (NBS) type from Lens species. *Genome* 47: 650–659.
- You-Xiong Que, Li-Ping Xu, Jian-Wei Lin, and Ru-Kai Che. (2009). Isolation and Characterization of NBS-LRR Resistance Gene Analogs from Sugarcane. *Acta Agron Sin*, 35, 631–639.
- Yu, Y.G., Buss, G.R. and Saghai, M.A. (1996). Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93; 11751–11756.
- Zhu, H., Cannon, S.B., Young, N.D., and Cook, D.R. (2002). Phylogeny and genomic organization of the TIR and Non-TIR-NBS-LRR resistance gene family in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 529–539.
- Zizumbo-Villareal, D., Colunga-García, P., Fernández-Barrera, M., Torres-Hernández, N. and Oropeza, C. (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. *Plant Genetic Resources Newsletter*, FAO-Bioversity 156: 23-33.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA Y FILOGENIA DE LAS SECUENCIAS CANDIDATAS A GENES DE RESISTENCIA DE LA CLASE NBS-LRR EN COCOTERO.

3.1 INTRODUCCIÓN

El cultivo de cocotero está ampliamente distribuido en el mundo y posee un alto valor económico. La producción mundial, se estima en 40 billones de nueces, principalmente para la producción de aceite (Harries, 1995).

Entre los patógenos que principalmente afectan al cocotero, destaca el Amarillamiento Letal (AL), el cual en los últimos años ha destruido millones de palmas en Jamaica, Florida, Belice y Honduras (Harrison *et al.*, 1999). Para el caso de México, el AL ha eliminado virtualmente al cocotero Alto del Atlántico en toda la costa de Quintana Roo, Yucatán y Campeche (Domínguez *et al.*, 1999) y se estima que ha devastado aproximadamente unas 13 mil ha de la plantación (Doyle, 1998) quedando actualmente una superficie cultivada cercana a 100 mil ha (www.conacoco.com.mx, 2008).

Estudiar los mecanismos de defensa en este cultivo, podría ser una herramienta importante para el desarrollo de nuevas tecnologías para hacer frente a los patógenos que lo afectan. La resistencia y susceptibilidad mostrada por ciertos ecotipos de cocotero ante la enfermedad del amarillamiento letal (Zizumbo *et al.*, 2008), podría ser explicada por estos mecanismos, en donde el reconocimiento oportuno de un microorganismo invasor acoplado con la inducción rápida y eficaz de las respuestas de defensa parece ser una diferencia clave entre la resistencia y la susceptibilidad (Bari y Jones, 2009).

En los mecanismos de defensa, las proteínas de resistencia codificadas por los genes de resistencia, juegan un papel fundamental a través del reconocimiento de patógenos y responden mediante la activación de las vías de transducción de señales que conducen a la resistencia a enfermedades (Belkhadir *et al.*, 2004). La mayoría de estos genes,

codifican para proteínas con un dominio de unión a nucleótidos (NBS) más un dominio rico repetidos en leucina (LRR), los cuales confieren resistencia a una amplia variedad de patógenos y plagas, incluyendo virus, bacterias, hongos, nematodos e insectos (Dangl y Jones, 2001).

La clase NBS-LRR de genes *R* es dividida en dos principales subclases en base a la presencia o ausencia de un dominio en la región N-terminal, el cual muestra similitud al receptor Toll de *Drosophila* y el receptor de Interleucina-1 en mamíferos (TIR) (Meyers *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000). La subclase non-TIR comúnmente comprende en la región N-terminal una estructura coiled-coil, algunas veces en forma de sierre de Leucina (Meyers *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000). En el caso de la subclase TIR, aparece restringida en especies de dicotiledóneas, mientras que las non-TIR, se encuentra tanto en monocotiledóneas como dicotiledóneas. Dentro del dominio NBS, ocho motivos conservados han sido identificados, los cuales son específicos para cada subclase.

En este capítulo, nuestro objetivo principal, fue la caracterización e identificación de las secuencias obtenidas por medio de diferentes programas bioinformáticos. Para lo cual, se evaluarán los porcentajes de identidad de las secuencias con genes de resistencia descritas en otras especies de plantas, se identificarán los motivos característicos de los genes de resistencia y se realizarán análisis filogenéticos para sustentar las relaciones filogenéticas con genes *R*.

3.2 MATERIALES Y METODOS

3.2.1 Porcentaje de identidad con las accesiones del Gen Bank

Las secuencias obtenidas fueron analizadas por medio del programa BLASTX para determinar su porcentaje de identidad con genes de resistencia descritas en otras especies de plantas en base a las accesiones del Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov), así como también los valores de E (probabilidad de que el alineamiento BLAST no haya ocurrido al azar). La homología de nuestras secuencias con los genes de resistencia, fue hecha a base de comprobar que existe un grado de similitud suficientemente alto entre las secuencias comparadas.

3.2.2 Obtención de los marcos de lectura abierta e Identificación de los motivos característicos de las proteínas de resistencia

Todas las secuencias que presentaron homología a genes de resistencia, fueron sometidas al programa Fr33 translator, con la finalidad de obtener la secuencia deducida de aminoácidos e identificar los posibles marcos de lectura abierta. Posteriormente las secuencias fueron alineadas por medio del software ClustalX (Larkin *et al.*, 2007) y el sombreado de los aminoácidos conservados se realizó utilizando el programa Boxshade v.3.21. De esta manera se pudo identificar la presencia de los motivos característicos de los genes *R*.

3.2.3 Clasificación de las secuencias en base a su porcentaje de identidad

Una vez identificados los motivos característicos, se realizó una comparación entre las diferentes secuencias obtenidas por medio del programa BLASTP y las que presentaron mayor a un 90% de identidad fueron clasificadas dentro de un mismo grupo. Posteriormente se realizó un alineamiento usando el software Mega versión 5.0 y un árbol filogenético fue obtenido de dicho alineamiento siguiendo el método de neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) y un análisis de bootstrap con 1000 replicas (Felsenstein, 1985).

3.2.4 Análisis filogenético

Para realizar el análisis filogenético se utilizaron 40 secuencias de proteínas de resistencia de la clase NBS-LRR, de las cuales 11 pertenecieron a la familia TIR-NBS-LRR y 29 a la familia non-TIR-NBS-LRR. En el análisis filogenético se agregó una secuencia representativa de cada uno de los grupos de RGCs identificados en cocotero. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) y un análisis de bootstrap con 1000 replicas. Este análisis filogenético fue realizado utilizando el software MEGA v. 5.0.

3.3. RESULTADOS

3.3.1 Porcentaje de secuencias con homología a genes de resistencia

Un número representativo de colonias obtenidas con cada combinación de iniciadores (C1, C2 y C6) fueron posteriormente secuenciados. En total se secuenciaron 132 colonias, de las cuales, en base a los análisis bioinformáticos 80 (61%) presentaron homología a genes de resistencia descritos en otras especies de plantas (cuadro 3.1). De las 52 (39%) restantes, una secuencia (1.9%) presentó identidad a una proteína CIPK (proteína cinasa de interacción con calcineurina) las cuales se encuentran involucradas en las respuestas a condiciones abióticas principalmente frío, sequía y salinidad. Las otras 51, no presentaron identidad con alguna de las secuencias reportadas en el Genbank.

Para la C1, de las 70 colonias obtenidas, todas fueron secuenciadas y en base a los análisis bioinformáticos 54 presentaron homología a genes de resistencia. La mayoría de las secuencias con homología a genes *R*, pertenecieron al ecotipo Alto del Pacífico (36 secuencias) y en menor número al ecotipo Enano Malayo Amarillo (18 secuencias).

Por otro lado, con la C2, 42 colonias positivas fueron obtenidas y 32 fueron secuenciadas. De estas 32 secuencias, solamente 12 presentaron homología a genes de resistencia. En este caso, el número de colonias obtenidas y secuenciadas fue mayor para el ecotipo Enano Malayo Amarillo, sin embargo, al final, el número de secuencias que presentó homología a genes *R* fue igual para ambos ecotipos (6 secuencias).

Por último, con la C6, de las 149 colonias positivas obtenidas, 30 fueron secuenciadas y 14 presentaron homología a genes de resistencia, 6 fueron del Alto del Pacífico y 8 del Enano Malayo Amarillo.

Los datos antes mencionados son presentados en el cuadro 3.1, en donde se puede observar el número de colonias obtenidas con cada combinación de iniciadores, el número de colonias secuenciadas y el número de secuencias que presentó homología a genes de resistencia en cada ecotipo.

Cuadro 3.1. Número colonias obtenidas para cada combinación de iniciadores por ecotipo, número de colonias secuenciadas y número de secuencias que presentaron homología a genes *R*.

Combinaciones de iniciadores	Ecotipos	Colonias obtenidas	Colonias secuenciadas	Secuencias con homología a genes <i>R</i>
C1	AP	45	45	36
	EMA	25	25	18
	Total	70	70	54
C2	AP	6	6	6
	EMA	36	26	6
	Total	42	32	12
C6	AP	70	6	6
	EMA	79	24	8
	Total	149	30	14
TOTAL		261	132	80

A grandes rasgos, con la combinación C1, se obtuvo un 41% de las secuencias que presentaron homología a genes de resistencia del lote total enviadas a secuenciar (132 colonias), mientras que con la C2 se obtuvo un 9% y con la C6 un 11%. Representando de esta manera el 61% de las secuencias que presentaron homología a genes *R*. El otro 39% fueron secuencias que no presentaron homología a genes *R* (figura 3.1).

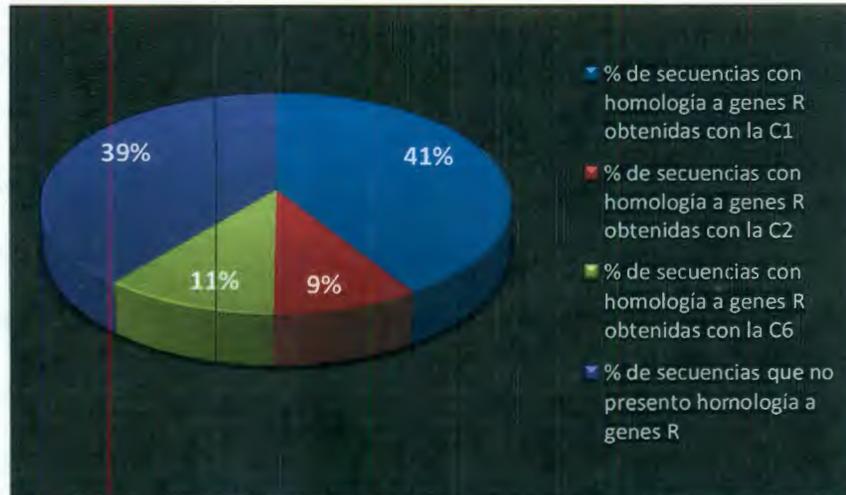


Figura 3.1. Porcentajes de las secuencias que presentaron homología a genes de resistencia, obtenidas con cada combinación de iniciadores (C1-2-6).

3.3.2 Porcentaje de identidad con las accesiones del Gen Bank

La homología de nuestras secuencias obtenidas con los genes de resistencia, fue hecha a base de comprobar que existe un grado de similitud suficientemente alto entre las secuencias comparadas, utilizando el programa BLASTX (Altschul *et al.*, 1990).

Las 132 secuencias obtenidas, fueron sometidas una por una en dicho programa para ser comparadas con las accesiones del GenBank y de esta manera determinar su similaridad a genes de resistencia o RGCs descritos en otras especies de plantas.

En el cuadro 3.2, se indican los porcentajes de identidad de algunas secuencias representativas aisladas en cocotero, así como también, la secuencia con la que presento mayor similitud, el porcentaje de identidad y el valor de E (probabilidad de que el alineamiento BLAST no haya ocurrido al azar), para cada una de ellas. Los porcentajes de identidad más bajos se obtuvieron con la proteína OsJ_02018 de *Oriza sativa* (30%) y la proteína CC-NBS-LRR de *Populus trichocarpata* (39%), mientras que el porcentaje más alto se obtuvo con un RGC de *Elais guineensis* (85%). (Cuadro 3.2).

Cuadro 3.2. Resultados de la identidad encontrada entre las secuencias de cocotero y las secuencias del Gen Bank usando el programas BlastX.

Ecotipo	Mayor similitud	% identidad	E ^b	Ecotipo	Mayor similitud	% identidad	E ^b
EMA15	Proteína R <i>Hordeum vulgare</i>	52	8e-61	AP31	Proteína OsJ_02018 <i>Oryza sativa</i>	30	2e-08
EMA33	Proteína NBS Musa grupo ABB	53	5e-10	AP31.5	Proteína VITISV_037152 <i>Vitis vinifera</i>	44	2e-39
EMA37	Proteína NBS-LRR <i>Citrus trifoliata</i>	43	5e-46	AP28	Proteína LRR <i>Ricinus communis</i>	51	3e-61
EMA32	Proteína cc-nbs-lrr <i>Populus trichocarpa</i>	44	3e-50	AP4	RGC5 <i>Musa acuminata</i>	44	2e-51
EMA13	Proteína R <i>Brassica rapa</i>	41	5e-43	AP12	RGC <i>Elaeis guineensis</i>		4e-80
EMA17	Proteína R <i>Capsicum annuum</i>	54	8e-70	AP39	RGC5 <i>Musa acuminata</i>	51	1e-59
EMA5	Proteína cc-nbs-lrr <i>Populus trichocarpa</i>	39	2e-43	AP19	SORBIDRAFT_07g020500 <i>Sorghum bicolor</i>	49	8e-60
EMA29	Proteína LRR <i>Ricinus communis</i>	53	3e-61	AP27	Proteína putativa R 2 <i>Oryza sativa</i>	46	7e-54
EMA4	Proteína CC-NBS-LRR <i>Musa balbisiana</i>	57	4e-63	AP18	Proteína NBS-LRR <i>Hordeum vulgare</i>	44	4e-53
EMA9	RGC <i>Elaeis guineensis</i>	82	1e-74	AP22	Putativa NBS-LRR <i>Sansevieria trifasciata</i>	55	6e-55
EMA16	RCC8 <i>Manihot esculenta</i>	50	6e-45	AP46	RGC <i>Elaeis guineensis</i>	82	6e-76
AP23	Protein LRR <i>Ricinus communis</i>	60	2e-76	AP7	RGC <i>Elaeis guineensis</i>	81	4e-74
AP24	Proteína R <i>Capsicum annuum</i>	58	4e-70	AP6	RGC <i>Elaeis guineensis</i>	73	3e-63
AP42	Proteína LRR <i>Ricinus communis</i>	59	1e-77	AP34	RGC <i>Elaeis guineensis</i>	83	5e-79
AP45	Proteína NB-ARC <i>Oryza sativa</i>	51	1e-49				

3.3.3 Obtención de los marcos de lectura abierta

Las secuencias que se obtuvieron y que presentaron homología a genes de resistencia fueron fragmentos de diferentes tamaños, debido a que se utilizaron tres combinaciones de iniciadores (C1=700 pb, C2=650 pb y C3=530 pb) que flanquearon diferentes sitios. Todas las secuencias fueron sometidas al programa Fr33 traductor con la finalidad de obtener los posibles marcos de lectura abierta. De las 80 secuencias obtenidas, 76 (95%) presentaron marcos de lectura abierta y 4 (5%) presentaron codones de paro (figura 3.2). En el siguiente cuadro (Cuadro 3.3), se describe el tamaño del fragmento amplificado en pares de bases, en aminoácidos (aa), si presentó o no marco de lectura abierta y el ecotipo de donde fue aislada.

Cuadro 3.3. Descripción de las secuencias obtenidas en cocotero, en cuanto a su tamaño en pares de bases, aminoácidos y si presentó o no marco de lectura abierta.

Ecotipo	Pb	# de aa	Marco de lectura	Ecotipo	Pb	# de aa	Marco de lectura
EMA1	702	233	▲	AP9	510	169	▲
EMA2	721	240	▲	AP10	499	165	▲
EMA3	693	240	▲	AP11	693	230	▲
EMA4	684	228	▲	AP12	703	234	▲
EMA5	707	235	▲	AP13	701	233	▲
EMA6	510	169	▲	AP14	692	230	▲
EMA7	510	169	▲	AP15	692	229	▲
EMA8	173	57	▲	AP16	695	231	▲
EMA9	699	232	▲	AP18	745	243	▲
EMA10	707	235	▲	AP19	706	232	▲
EMA11	722	240	▲	AP20	703	233	▲
EMA12	698	232	▲	AP21	721	239	▲
EMA13	706	234	▲	AP22	699	232	▲
EMA14	723	240	▲	AP23	702	234	▲
EMA15	723	240	▲	AP24	701	233	▲
EMA16	693	230	▲	AP25	732	243	▲
EMA17	690	229	▲	AP26	704	234	▲
EMA18	719	239	▲	AP27	731	243	▲
EMA19	723	240	▲	AP28	669	221	▲
EMA20	723	240	▲	AP29	669	222	▲
EMA21	705	234	▲	AP30	669	222	▲
EMA22	669	222	▲	AP31	884	294	■ ++++++
EMA23	673	224	■ ++++++	AP31.5	716	238	■ +
EMA24	510	169	▲	AP32	669	222	▲
EMA25	510	169	▲	AP32.1	510	169	▲
EMA26	705	234	▲	AP33	693	230	▲

EMA27	173	114	▲	AP34	699	232	▲
EMA28	675	224	■ +	AP35	696	231	▲
EMA29	510	169	▲	AP36	720	239	▲
EMA30	510	169	▲	AP37	719	239	▲
EMA31	708	235	▲	AP38	690	229	▲
EMA32	705	234	▲	AP39	705	234	▲
AP1	701	233	▲	AP40	719	239	▲
AP2	691	230	▲	AP41	729	242	▲
AP3	705	234	▲	AP42	699	232	▲
AP4	701	233	▲	AP43	700	233	▲
AP5	699	232	▲	AP44	700	232	▲
AP6	499	165	▲	AP45	696	231	▲
AP7	511	169	▲	AP46	700	233	▲
AP8	510	169	▲	AP47	700	233	▲

▲ : Marco de lectura abierta

+ : Número de codones de paro

■ : Marco de lectura con codones de paro

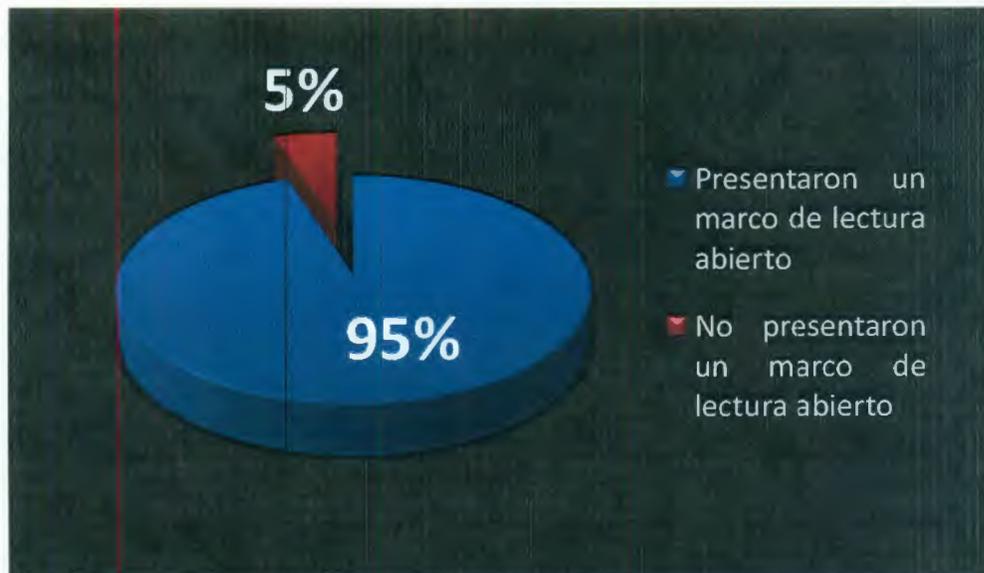


Figura 3.2. Porcentajes de secuencias que presento un marco de lectura abierto.

3.3.4 Árbol filogenético de las secuencias obtenidas

Se realizó un alineamiento múltiple con la secuencia deducida de aminoácidos por medio del programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Un árbol filogenético fue obtenido por el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) y un análisis de bootstrap con 1000 replicas (Felsenstein, 1985). Todas las secuencias con >90% de identidad fueron clasificadas dentro de un mismo grupo, obteniendo 29 grupos diferentes (figura 3.3).

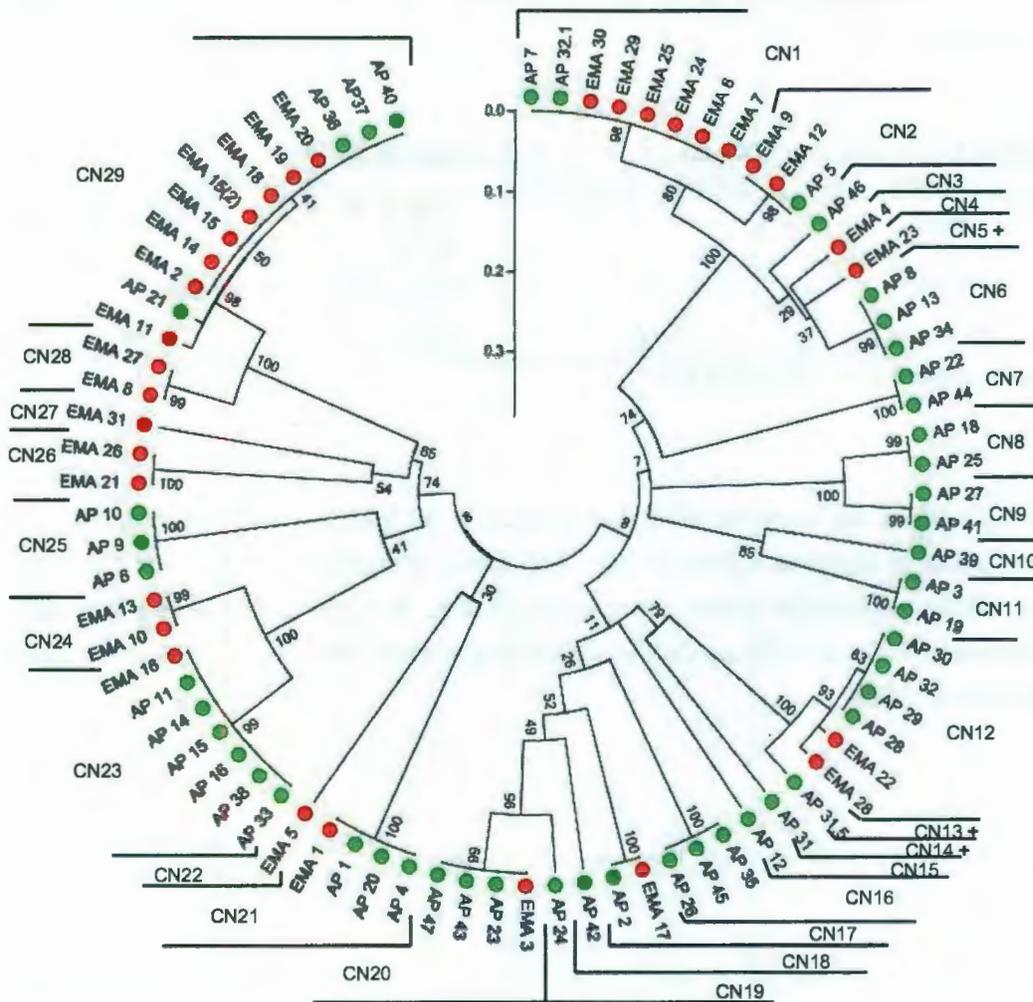


Figura 3.3. Clasificación de los secuencias de RGCs aislados en cocotero. Círculos verdes; Alto del Pacifico, Círculos rojos; Enano Malayo Amarillo.

El árbol filogenético obtenido, nos muestra claramente secuencias de RGCs que comparten tanto el Alto del Pacífico como el Enano Malayo Amarillo (8 grupos diferentes), así como también secuencias que solamente fueron identificadas en Enano Malayo Amarillo (7 grupos diferentes) o en Alto del Pacífico (14 grupos diferentes). Las secuencias que presentan ambos ecotipos, podrían estar involucrados en conferir resistencia ante un mismo patógeno que afecte este cultivo, sin embargo, de las secuencias que se encontraron solamente en un ecotipo, podría explicar algunas de las diferencias en cuanto a los niveles de resistencia o susceptibilidad ante los patógenos (cuadro 3.4).

Cuadro 3.4. Grupos de RGCs en los diferentes ecotipos de cocotero.

Ecotipo	Número de grupos	Grupos (CN)
●AP	14	3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13+, 14+, 15, 16, 18, 19, 25.
●EMA	7	4, 5+, 22, 24, 26, 27, 28.
●AP + ●EMA	8	1, 2, 12, 17, 20, 21, 23 y 29.

+ Grupo que presenta codones de paro

Los porcentajes de identidad entre los 29 grupos de RGCs aislados en cocotero se describen en el siguiente cuadro (cuadro 3.5). Como se puede observar los porcentajes de identidad entre los 29 grupos son menores al 90%. El menor porcentaje de identidad se obtuvo al comparar el grupo CN8 con el CN14 y el valor más alto al comparar el grupo CN28 con el CN29.

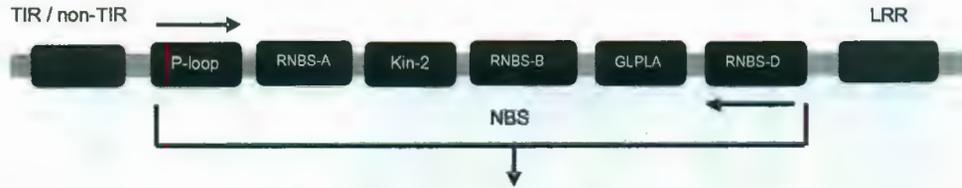
Cuadro 3.5. Porcentaje de identidad derivada de la comparación entre los 28 grupos de RGAS aislados en coctero.

CM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	100	87	83	74	82	79	46	32	34	36	37	42	34	27	34	30	35	40	36	37	33	32	31	32	31	29	24	23	26
2		100	85	77	82	83	49	32	32	37	37	41	35	30	34	44	39	41	38	38	34	33	32	32	31	30	24	17	26
3			100	74	84	83	50	34	39	39	36	39	33	28	39	36	38	42	40	37	34	34	31	32	29	27	22	28	26
4				100	82	80	50	33	33	40	39	39	32	27	38	38	38	40	41	41	34	34	31	33	31	26	27	30	25
5					100	83	45	35	39	37	37	41	39	24	37	38	41	38	42	44	36	31	31	32	33	30	22	33	24
6						100	47	32	34	39	35	37	33	26	37	35	38	40	38	39	34	34	33	32	32	27	28	28	26
7							100	32	29	38	36	38	35	36	36	38	38	40	35	35	33	37	32	31	29	32	25	22	27
8								100	79	33	31	31	28	14	30	32	33	32	33	33	29	30	31	28	30	27	28	22	25
9									100	31	31	30	28	36	33	32	34	34	33	33	28	31	33	30	29	28	28	36	26
10										100	61	38	31	24	45	44	44	44	42	43	48	40	32	32	27	27	28	30	23
11											100	35	30	21	45	41	42	43	41	42	45	38	33	30	25	22	28	21	25
12												100	88	45	45	58	46	48	46	47	36	35	33	27	32	31	28	30	28
13													100	44	38	46	40	42	39	39	34	35	27	24	27	27	24	39	25
14														100	28	32	36	30	29	29	22	26	35	28	41	29	30	22	27
15															100	48	65	50	50	49	43	44	31	28	30	25	30	33	23
16																100	68	49	50	51	40	38	35	31	31	33	25	26	30
17																	100	53	54	55	41	43	31	28	32	29	30	18	30
18																		100	61	60	39	41	31	29	34	29	31	25	28
19																			100	85	38	42	29	31	33	28	25	38	23
20																				100	39	42	31	30	32	28	25	38	25
21																					100	38	33	29	29	31	24	34	25
22																						100	32	29	23	24	25	18	23
23																							100	78	42	36	32	29	32
24																								100	42	34	32	38	29
25																									100	33	31	37	28
26																										100	45	36	35
27																											100	31	35
28																												100	38
29																													100

3.3.5 Identificación de los motivos característicos

Una vez obtenida la secuencia deducida de aminoácidos, se prosiguió a la identificación de los motivos característicos de los genes de resistencia del tipo NBS-LRR. Esto se realizó por medio del alineamiento de una secuencia representativa de cada grupo de RGCs, utilizando el programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) y el programa Boxshade v.3.21 para sombrear las regiones conservadas. Las secuencias obtenidas con cada combinación de iniciadores fueron alineados de manera independiente.

La C1, flanquea los motivos P-loop y RNBS-D, obteniendo de esta manera un producto de 700 pb. La secuencia deducida de aminoácidos reveló la presencia de los motivos característicos de las proteínas de resistencia del tipo NBS-LRR, los cuales son P-loop/kinasa-1 (GVGKTT), Kinasa-2 (LLVLDDVW), RNBS-B (GSRIITTRD), GLPLA y RNBS-D (CFLYCALFPED) (Meyers *et al.*, 1999) (figura 3.4). El motivo non-TIR (WVxxIRELAYDIEDIVDxY) (Bai *et al.*, 2002) se encuentra asociado con la subfamilia de secuencias non-TIR-NBS-LRR, el cual fue identificado en todos los grupos de RGCs para la combinación 1. Por otra parte también, se identificó en 16 de los 19 grupos de RGCs la presencia del residuo de triptófano (W) localizado al final de kinasa-2, el cual también es característico de la familia non-TIR-NBS-LRR (Meyers *et al.*, 1999) (figura 3.3).



		P-loop	RNBS-A	Non-TIR
CN29	1	GWGGGKTTLLNEFNNALEKKRADYEVVINDVENSETLLNVVDIQMIADRLG---- <td></td> <td></td>		
CN24	1	GWGGGKTTLLVKNLNKLRG-TEHFVWVLFVTLER---DWNKLNLRNDIAKEIL----L		
CN23	1	MGGGGKTTLVNNTNKKIRG-TQHFVWVLFVTVSR---DWNKLNLRNDIAKKLD----L		
CN22	1	WDGGGGKTTVAQSVYNDPR-VCEHFQKMLWVYVSDDFDIKRTITSTIEETVSE-----		
CN21	1	WDGGGGKTTVAQSVYNDLR-VREHFQKMLWVYVSDYFDIKREITRSEIEESASG-----		
CN20	1	GMGGGGKTTLADVYHDMT-VVCHFKKFWVCALDDFDVPKIVKAIISVTK-----		
CN19	1	GMGGGGKTTLADLVYNDRF-IEECPFLRMWVCISKNFDIPRIINAIIRMMG-----		
CN18	1	GMGGGGKTTLADLVYNDRF-VQVYFDMAWVNVSLDFDVRICQATIQSVSK-----		
CN14	1	GMGGGGKTTLADYAGDKR-VEKYFHSFVWICASDDINVMRAGVIEGPPVTNR--VD		
CN13	1	WDGGGGKTTLADLVYNDGK-IDGHFLEMWVHVEEDFSVRRITREIEESASK-----G		
CN12	1	GMGGGGKTTLADLVYNHQE-VTGHFRFVAFVSDRLDEIRLRDVTESVAG-----		
CN11	1	GMGGGGKTTLADLVYNDLR-VVEHFVDFWVVCVSDSFEIRITREIEESVSN-----D		
CN10	1	--GGGGKTTLADLVYNDRF-VGEYFVDFWVVCISDFEIEISITREIEESATD-----E		
CN9	1	WDGGGGKTTLVNDVYRSQE-ARRHFVDFWVVRVIOKTAEDIMPRMEDLYNENRDILF		
CN8	1	GWGGGKTTLVNDVYESQE-VKRHFVDFWVVRVIOKTAEDIMPRMEDLYNENRDILF		
CN7	1	GMGGGGKTTLASRYNHET-ISKNFVDFWVWACVSDSFEIEMITREIEESDAGG-----		
CN4	1	GMGGGGKTTLAKKLYNDQR-IQEEFVDFWVWVQVSDSFEIEMITREIEESDAGG-----		
CN3	1	GMGGGGKTTLAKKLYNDHM-IQEEFVDFWVWVQVSDSFEIEMITREIEESDAGG-----		
CN2	1	GMGGGGKTTLAKKLYNDGR-IEDGFVDFWVWVQVSDSFEIEMITREIEESDAGG-----		

		Kinasa-2
CN29	56	PLKDNDS EILRAKVL LRAFKKFTK FVLLDDV R-----EFSLEDDVGIPTPGREIHC
CN24	52	DLSAEEDETRASRL LFNMLKCKKFL LLDLDMW-----KVDLEKIGVPAPKENQSC
CN23	51	DLSKKEDETGASTL LFNMLKCKKFL LLDLDMW-----KVDLEKIGVPTPKENNGC
CN22	53	SECSLTGMDLMQHE LKQKFKRFL VLDLDMW-----ENYEKWRNRRTVLI GSAFGS
CN21	53	SECNLTMDMLQK LKRLKFKRFL VLDLDMW-----ENYEKWRNRRTVLI GSAFGS
CN20	52	RKCKVSDMDPLKEE LREILKSKRFL VLDLDMW-----ENEAKWYGLQDVLTVGAFGS
CN19	52	TNCELSDIEMQSL LREKLRQKFL VLDLDMW-----EEEAEWRLKPLLRGGKIGS
CN18	52	EPCELTELSAVQA LKEELKCKKFL VLDLDMW-----EKLNLWDFNFRVALTGGGWC
CN14	56	EISQLEKLDLEGI LKEELKCKRFL VLDLDMW-----IEMTRFAAIIKSGQFGS
CN13	54	RQSELVNWNVQDK LKGLQCKRY LLDLDMW-----EDRNQWEPFLPLMYGEFGS
CN12	53	LRPYLKTLDLSQSR LEEELKCKRFL VLDLDMW-----TQQHLWEVDFRPLNCGLFGS
CN11	53	AIGDATNLNKLQE LQKIMS EKYLLVLDLDMW AENMEEWENRDRR KKLAPLRF GAFGS
CN10	51	KHDEVVNFDKLQK LKRLKSKRFL VLDLDMW RIDEERRK WENKERASKKLAPLQ FGESGS
CN9	60	GNIDAMPDCSLAE VLHGYLQCKRY LLDLDMW-----INGWDEELSPVLVDNKGCS
CN8	60	GNIDAMPDRDSLE ETLRSYLQCKRY LLDLDMW-----INRCDFEFGSVLVDSKORN
CN7	52	KNGEAEKAE LVPRLSSILS-KRFVLDLDMW-----KDVWEKLRYSATENAAATG
CN4	49	-DAKQSRSLLEPR LQKNLRK KFLVLDLDMW-----AKVWCDLERTLYS CAAGS
CN3	52	DLAGDESKSSLEPK VESSLGCKKFL VLDLDMW-----AKVWCDLERTLYS CAAGS
CN2	52	DLARDQSRSSLEPK VERSLGCKKFL VLDLDMW-----AKVWCDLERTLYS CAAGS

RNBS-B

```

CN29 107 KLI IASRSEDVCIKMGHQCLTEMQCLEEEAAMEMFCSNLTRRAKREIDENNAIREHAMA
CN24 103 KIV IATRKRGCNDMET-DEEIMVEVLSDEAWELFQKKVGSVISSDLEP-----IALD
CN23 102 KIVITTRNRGVCNDMET-DEEIVREVLPEREAWELFQEKAGSAISSDLEP-----IARD
CN22 106 RVI VTRSARVASIMGT-VAPHFLSGLSEEDCWLLFEKRAFGLGG--CEKTPYLVAIGKE
CN21 106 KVI VTRSBERGCSVMGT-VAPHLLSGLSEDDCWQLFEKRAFGLGS--CEKTPNLVIGIKE
CN20 105 SVI VTRSMMKVVSSIVGT-VEAYQLRPLSEHDCWLLFKKLAEGR-S--TEEPQNLVITIGQK
CN19 105 KII VTSR SERVASIMGS-FAPERLQVLSIDECWILFRORAFGLGK--GEETSRLVEIGKE
CN18 104 KII VTRNESVARIMQT-VLPYHLDCLPEDQSWLLFEQSAEDGLE--PKEHPNLVEIGIK
CN14 106 KIVITARREEVDEEVR-RNKIFLEGLKGGDFCLFRKCAFGEDED--PKHLELQRIIGKE
CN13 107 KILITTONKNVANIMDM-TSLYCLEGLSNRDOWLIFKRFAFGNEG--SSGNPKLEGIGKE
CN12 106 KVI MTRNQSALAENVP-TTQIILDPM SNKFCMSIFOKIAFTGAL--LSDRNPLERIGKE
CN11 113 KII LATTRMEMVVTMLGA-VNSTIYLKGLRDDYWLIFQKHAFGCEN--PDNHLELLRIGTQ
CN10 111 RILV TTRMGMAEMLDS-MSPVFLKGLASDFYWLIFKKCAFGESE--FCGYLELQVIGRE
CN9 112 RIVITTRNHDVAYLAVE-SRVLELQPLQEGD SWILFCNKAFWKYK-DRSCPSDLEYWARK
CN8 112 RIVITTRIHDVAYLAAE-SHVLELQPLQEGD SWILFCNKAFWKDK-DRSCPSDLKHWATE
CN7 103 KILITTRHTNVASNTA-K-IHQVDKMDNDSCKKLLHKNVFEDDDEEBEET SRLKEIGVQ
CN4 100 RILV TTRNEQTAMQMA-VNTHMDKLSLDDSWSL LCKKVLTG--EEGETIQLKDIGME
CN3 104 RILV TTRNEQTAMQVSA-VKIHVNKLSLEDGWILLCKKVALTG--KEGEMQHKDIGME
CN2 104 RILV TTRNEQTAMQLA-VDIRRVNKL SVEGCWSSLLCKKVLTG--EEGETIQLKDIGME
    
```

GLPLA

```

CN29 167 IFRSCFGLPLAINVVGRAVAGSK--DPREWRRAAKAMKAMPSRI PGVD-DMFAKLKYSYD
CN24 156 VCKEBCGLPLA IIVVGRALRKEA--NREVWKNALRVLKTSQFELKGMEREVYLPLKFTYD
CN23 155 VCKEBCGLPLA IIVVGRALRKET--HMVVWENALRMLQNSQFELRGMEREVYLPLKFSYD
CN22 163 IVK KCGVPLAKALGSLMRFR--RAEQWLAIKESE-VWNLP-DDETEILP-ALMLSYN
CN21 163 IVK KCGVPLAFAKALGSLMRFR--RGESQWFAIKESE-IWNLP-DDENEILP-ALMLSYN
CN20 161 IVK KCGPLAKKMLGTLMSLK--SKEQEWRSVMRSD-IWDLR-GNQ--ILP-WLRLSYN
CN19 162 IVK KCGPLAKALGSLMSSR--RGEVEWLAVKNSE-IWKLP-TKETGILS-ALRLSYD
CN18 161 IVRKNGLPLAKITLGGLLRF--TAEERWEDILQSD-LWELD-EQEDDILP-ALKLSYH
CN14 163 VAEKLGGLPLAKVVVGGLLQAN--LDGGHWRNLRSE-LWEL-AEDPYDIMP-SSRLGVQ
CN13 164 MVGKIKGLPLAKITLGGLLCSK--LDEDSWRIILESE-IWEL-PPNAKNILS-ALRLSYQ
CN12 163 IANKACGMPLAKALGDIARSIGLSNQHRWSNLSRTE-LSQLREEDGVNIIIS-VLRLSYQ
CN11 170 IABRLNGSPLAKVVVGGMLNAE--LDVGKWKVNLKSD-IWD-----GIMP-VLRLSYQ
CN10 168 IABRLNGSPLAKAVGGRLKHN--LDIKWKTLIDRE-VWD-----DIMP-VLISSYQ
CN9 170 IILQRCHGLPLA VAAGSSLSYRE-KEELEWRKFFEGL-DWEETKMPMSRVRNVLELSEG
CN8 170 IILKRCHGLPLA VAAGSALSURE-KEELQWREFCKGL-DWGETSMPMSDVKNIILNLSFR
CN7 161 IVEKCHGLPLA KVIAGVLRSE-RSNLEWNVKVLKSE-VWSMS-ELDKETPG-ALFLSYD
CN4 157 FVKKCHGLPLA KAVAGVLCMKE-KTRRANRVLEST-AWSTA-GLPEEVMG-ALYLSYE
CN3 161 IVK KCHGLPLA KAVAGVLCMKE-RTGRANRVLEST-AWSTS-GLPEGVKG-ALYLSYE
CN2 161 IVK KCHGLPLA KAVAGVLCMKE-MTRSAWNTVLGST-AWSTS-GLPEVQVQ-ALYLSYE
    
```

RNBS-D

```

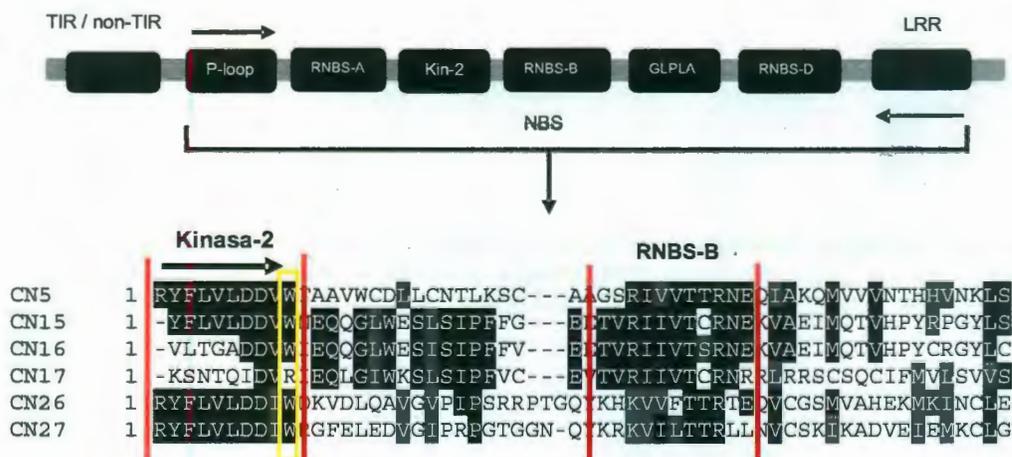
CN29 224 RLDG-----ALQKCFPYCSLF
CN24 214 HIKNDSENDILQNCFLYCCFF
CN23 213 HLETDT---LRNCFPYCSFF
CN22 218 HLP-----SILKQCFPLLYPLP
CN21 218 HLP-----SILKQCFLYCSFF
CN20 214 HLP-----SILKQCFRYCALF
CN19 217 HLP-----SILKQCFLYCTLF
CN18 216 WMP-----TILKPCFRYCSLF
    
```



CN14	218	HLP	----	S	H	L	Q	W	C	F	F	Y	C	A	F	F	-
CN13	219	QLP	----	A	H	L	K	Q	C	F	F	Y	C	T	F	F	-
CN12	221	QLP	----	A	P	L	K	Q	C	F	F	T	A	P	S	-	-
CN11	219	NLP	----	A	H	L	Q	R	C	F	L	Y	C	S	L	F	-
CN10	217	NLP	----	V	H	L	Q	R	C	F	R	Y	C	G	F	F	-
CN9	228	DLS	----	H	L	R	N	C	F	R	Y	C	C	F	F	-	-
CN8	228	DLP	----	Y	R	L	R	I	C	F	L	Y	C	S	F	F	-
CN7	217	DLS	----	S	D	L	K	Q	C	F	L	Y	C	S	L	F	-
CN4	213	DLP	----	S	M	L	K	Q	C	F	L	Y	C	T	F	F	-
CN3	217	DLP	----	S	M	L	K	Q	C	F	L	Y	C	T	L	F	-
CN2	217	DLP	----	S	M	L	K	Q	C	F	R	Y	C	S	L	F	-

Figura 3.4. Identificación de los motivos característicos de las proteínas de resistencia del tipo NBS-LRR en la secuencia deducida de aminoácidos de los RGCs aislados en cocotero, utilizando la C1. Las líneas en rojo indican las secuencias consenso para cada motivo y el cuadro amarillo al final del motivo de kinasa-2, indica el residuo de triptófano (W) característico de las proteínas de resistencia del tipo non-TIR NBS-LRR. Las flechas indican el sitio de unión de los iniciadores.

La C2 flanquea el motivo cinasa 2 del dominio NBS y parte del dominio LRR. Con esta combinación se amplificó un producto de 650 pb. La secuencia deducida de aminoácidos reveló la presencia de los motivos característicos de las proteínas tipo NBS-LRR. El residuo de triptófano (W) localizado al final del motivo de kinasa-2, característico de la familia non-TIR-NBS-LRR fue identificada en 5 de los 6 grupos de RGCs (figura 3.5).



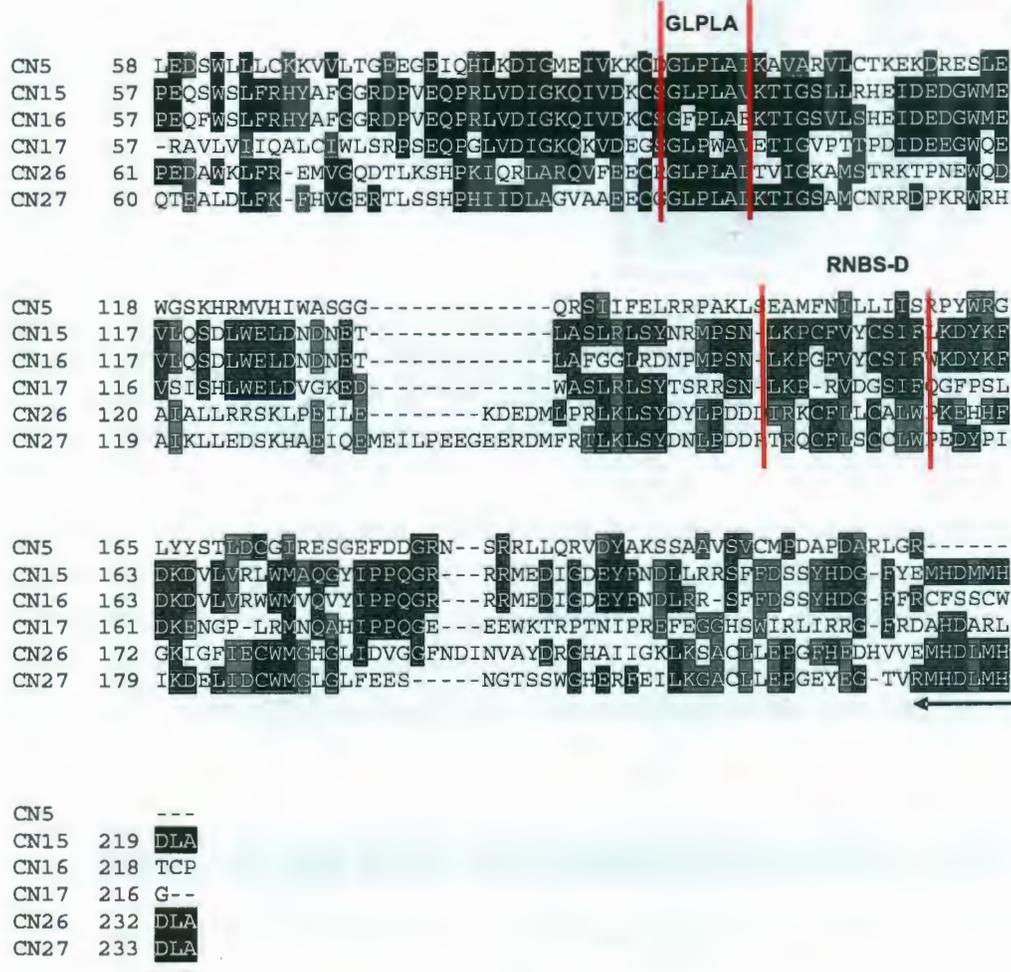


Figura 3.5. Secuencias deducidas de aminoácidos de los RGCs aislados con la combinación C2. Las líneas rojas, indican los motivos conservados y el cuadro en amarillo al final del motivo de quinasa-2 resalta el residuo de triptófano (W), característico de la familia non-TIR-NBS-LRR.

La C6, flanquea los motivos P-loop y GLPLA ubicados en el dominio NBS, amplificando un producto de 530 pb. La secuencia deducida de aminoácidos reveló la presencia de los motivos característicos de las proteínas tipo NBS-LRR. Para estos cuatro grupos en todos se identificó el residuo de triptófano (W) ubicado al final de kinasa-2 (figura 3.6).

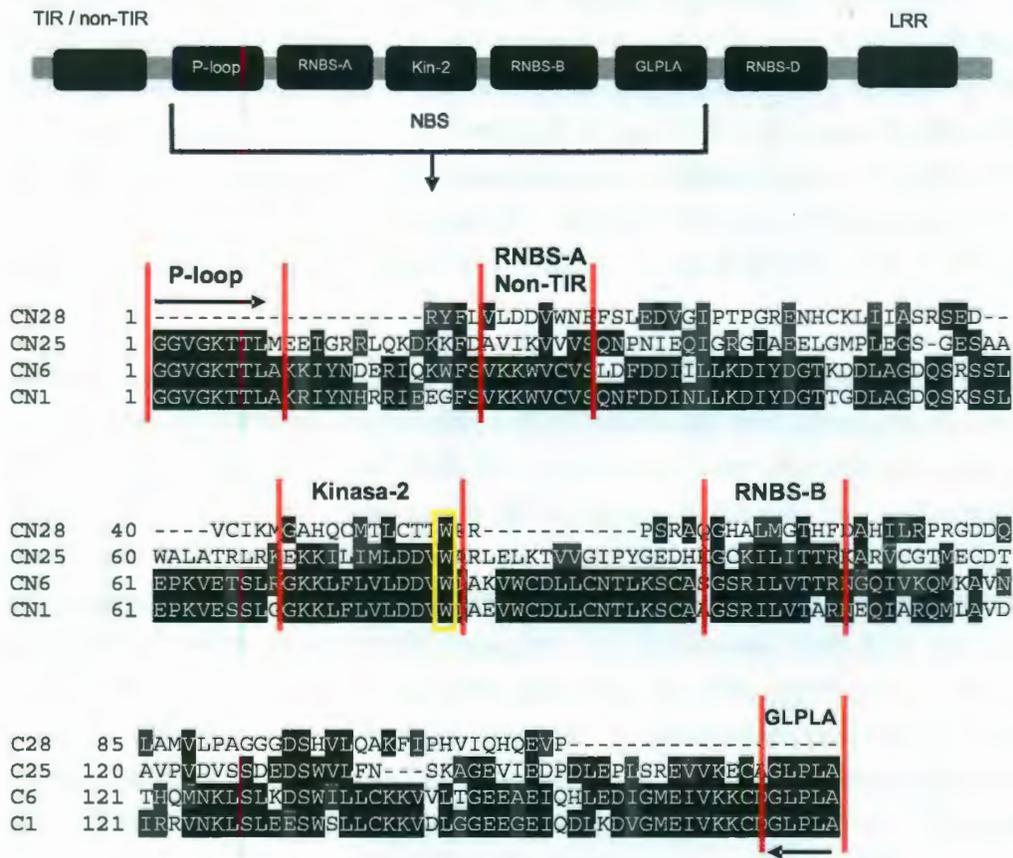


Figura 3.6. Secuencias deducidas de aminoácidos de los RGCs aislados con la combinación 6 de iniciadores. Las líneas rojas, indican los motivos conservados y el cuadro en amarillo al final del motivo de kinasa-2 resalta el residuo de triptófano (W), característico de la familia non-TIR-NBS-LRR.

3.3.6 Análisis filogenético

Se construyó un árbol filogenético de los grupos de RGCs aisladas en este estudio en conjunto con otras secuencias de genes *R* y RGCs tanto de la familia no-TIR-NBS-LRR como TIR-NBS-LRR, siguiendo el método de neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) y un análisis de bootstrap con 1000 replicas (Felsenstein, 1985), utilizando el software MEGA v. 5.0. El análisis filogenético se realizó a través de la región que comprende sólo el dominio NBS (P-loop a GLPLA) ya que se encuentra presente tanto en las proteínas TIR y no-TIR-NBS-LRR y que contiene numerosos motivos conservados que ayudan a la alineación correcta. Por otra parte también, las secuencias que presentaron codones de paro (CN5, CN13 y CN14) no fueron incluidas en el alineamiento para realizar este árbol filogenético.

Como se puede observar en la figura 3.7, dos grandes clados fueron formados. En uno se encuentran agrupadas todas las secuencias que pertenecen a la familia TIR-NBS-LRR y en el otro, los pertenecientes a la familia non-TIR-NBS-LRR. Sin embargo, los RGCs de cocotero están agrupados con la familia non-TIR, el cual apoya que los RGCs de cocotero han perdido el dominio TIR en la región N-terminal. La distribución de los RGCs de cocotero en diferentes ramas del grupo non-TIR-NBS-LRR indica mayores niveles de divergencia para estas secuencias. Por otra parte, las asociaciones con proteínas de resistencia non-TIR-NBS-LRR de funciones conocidas sugieren que los RGCs de cocotero pueden codificar proteínas de resistencia de especificidad desconocida. En base a los análisis bioinformáticos, las secuencias de RGCs que se lograron aislar en cocotero pertenecen a la familia non-TIR-NBS-LRR y el análisis filogenético sustenta esta afirmación. Nuestros resultados coinciden con lo reportado en la bibliografía, en donde los genes *TIR-NBS-LRR* solamente han sido reportados en dicotiledóneas, mientras que los *non-TIR-NBS-LRR* han sido reportados tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (Ellen y Helen, 2009).

Los grupos CN8 y CN9 (grupos formados por secuencias de alto del pacifico) formaron un clado monofilético y en conjunto con CN7, CN1, CN6, CN2, CN4 y CN3 formaron un grupo con genes de resistencia de función conocida como *Solanum Sw-5* (proteína de

resistencia a tospovirus), *Solanum* hero (confiere resistencia al nematodo *Globodera rostochiensis*), *Solanum* AAC67238 (confiere resistencia a *Bemisia tabaci* y al nematodo agallador), *Capsicum* BS2 (confiere resistencia a *Xanthomonas campestris*), *Solanum* Rx (Confiere resistencia contra el virus de la papa PVX) y el gen Pi-ta de *Oriza sativa* (confiere resistencia a la enfermedad del tizón del arroz). Dentro de este clado se pudo observar RGCs de cocotero aislados tanto en Enano Malayo Amarillo (CN4), Alto del Pacifico (CN8, CN9, CN7, CN 6 y CN3), así como también en ambos ecotipos (CN1 y CN2).

Por otro lado, los otros grupos de RGCs de cocotero (CN20, CN17, CN18, CN19, CN12, CN16, CN21, CN15, CN22, CN11, CN10), fueron agrupados con otros genes de resistencia conocidos, tal como es el caso del gen *Solanum* 12 (confiere resistencia a *Fusarium oxysporum*), *Saccharum* N11 (confiere resistencia al virus del mosaico de la caña de azúcar) y *Oriza* BPH14 (confiere resistencia a un insecto). Dentro de este grupo se puede observar más divergencia en los RGCs que fueron obtenidos en cocotero. Se puede observar también que CN26, CN27, CN25, CN23 y CN24, se encuentran formando un grupo con la proteína RPS5 de *Arabidopsis thaliana* el cual confiere resistencia a *Pseudomonas syringae* y un RGC de *Oriza sativa* (3.6).

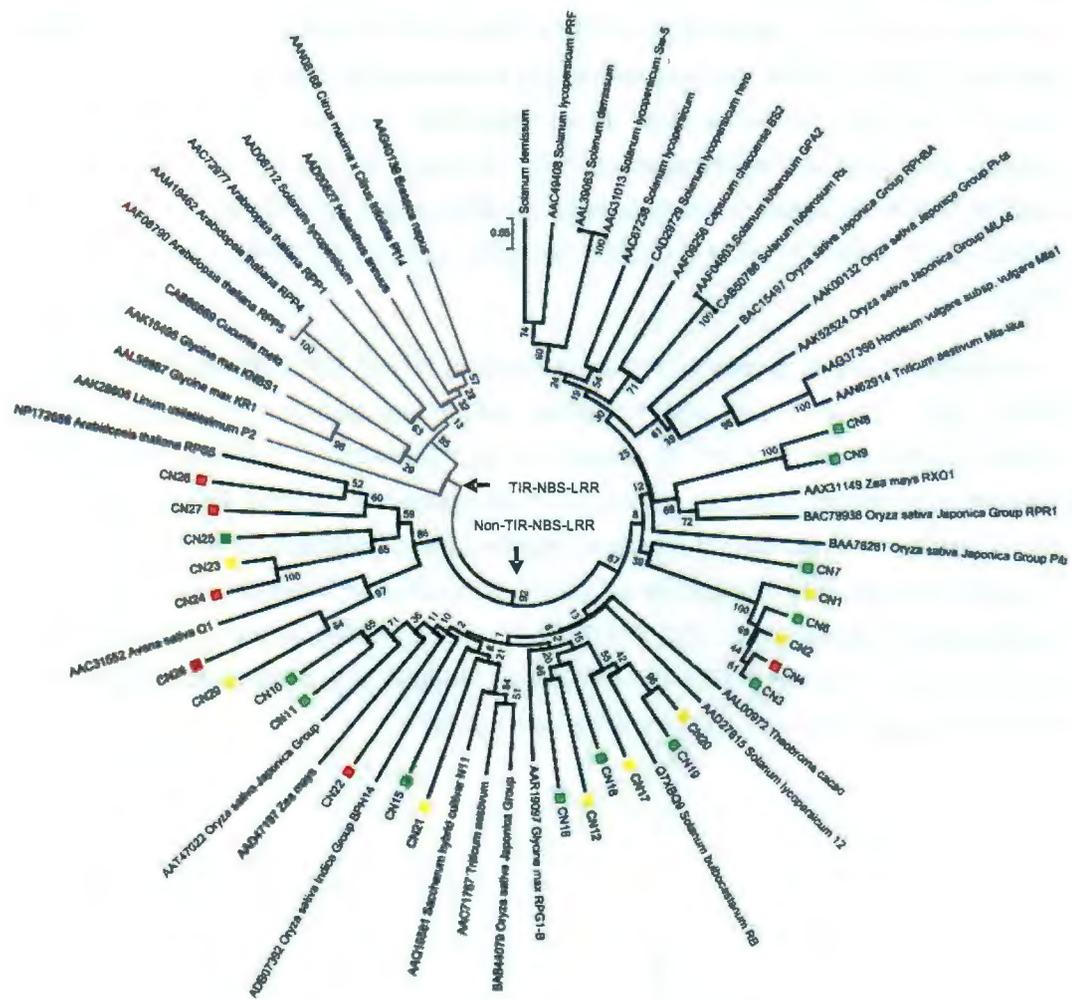


Figura 3.7. Árbol filogenético de los grupos de RGCs aislados en cocotero con proteínas de resistencia y RGCs descritos en otras especies de plantas. ■ Grupos formados por RGCs aisladas solo en Enano malayo amarillo. ■ Grupos formados por RGCs aisladas solo en Alto del pacifico. ■ Grupos formados por RGCs aislados de ambos ecotipos.

3.4 DISCUSIÓN

Los RGCs proveen valiosos recursos de secuencias para clonar genes *R* (Pflieger *et al.*, 2001). Algunas evidencias sustentan que estas secuencias están relacionadas en conferir resistencia ante ciertos patógenos que afectan a los cultivos, como es el caso de Leister *et al.*, (1996) quienes obtuvieron productos de PCR en papa que fueron homólogos a genes de resistencia conocidos, y que se encontraban ligados al locus de resistencia a nematodos (*Gro1*) y al locus de resistencia al tizón tardío (*R7*). Similarmente Kanazin *et al.*, (1996) mapearon varios loci de RGCs que fueron cercanos a genes de resistencia conocidos en soya. Por otro lado también, Yu *et al.* (1996) lograron mapear RGCs para resistencia contra ciertos patógenos como el potyvirus (*Rsv1* y *Rpv*), contra *Phytophthora* causante de la pudrición de la raíz (*Rps1*, *Rps2* y *Rps3*) y para *Peronospora parasítica* en este mismo cultivar. En cocotero, la gran importancia en entender los mecanismo de defensa que son activados en respuesta patógenos y con la finalidad de desarrollar nuevas estrategias para su control nos hemos enfocado en la búsqueda de secuencias candidatas a genes de resistencia (RGCs) que pudieran estar jugando un papel fundamental en el reconocimiento de ciertos patógenos y la activación de las respuestas de defensa. Más de 250 colonias fueron obtenidas con tres combinaciones de iniciadores seleccionados en base a los mejores resultados observados en las pruebas de optimización, de las cuales 130 fueron secuenciadas. Los análisis bioinformáticos, revelaron que 80 de las 130 secuencias presentaron homología a genes de resistencia descritos en otras especies de plantas, es decir el 61%. De estas 80 secuencias, 48 fueron aisladas del ecotipo Alto del Pacífico y 32 del Enano Malayo Amarillo. Posteriormente se prosiguió a la identificación de los marcos de lectura abierta, en donde 76 secuencias si lo presentaron, mientras que 4 presentaron codones de paro. Los RGCs con un marco de lectura abierta en cocotero, es posible que puedan ser funcionales contra diversos patógenos y por lo tanto ser candidatos a genes de resistencia, mientras que los que presentaron codones de paro probablemente sean pseudogenes que fueron co-amplificados o probablemente errores introducidos por la enzima Taq polimeraza. Estos probablemente surgieron por mutaciones puntuales, inserciones o deleciones de nucleótidos y que actúan como reservorios para la variación y ofrecen el potencial de

recombinación o conversión de genes entre alelos de genes *R* o parálogos (Michelmore y Meyers, 1998).

En nuestro caso, las secuencias que presentaron mayor a 90% de identidad fueron clasificadas dentro de un mismo grupo, obteniendo de esta manera 29 grupos diferentes, 14 de los cuales fueron constituidos por RGCs aislados del ecotipo Alto del pacífico, 7 del Enano Malayo Amarillo y 8 de ambos ecotipos, cada grupo estaría representando secuencias diferentes y los miembros que los conforman podrían ser secuencias redundantes.

En cocotero, a pesar de la gran diversidad de RGCs que fueron aislados en este estudio (figura 3.3), esta diversidad solamente refleja una pequeña porción de las aproximadamente 600 secuencias NBS-LRR reportadas en arroz (Goff *et al.*, 2002).

Los 29 grupos de RGCs aisladas con las tres combinaciones de iniciadores pertenecieron a la familia non-TIR-NBS-LRR, tal como se esperaba, debido a que la familia TIR no ha sido reportada en monocotiledoneas. Cabe recalcar que para el caso de las dicotiledóneas ambas familias (TIR y non-TIR) han sido reportadas (Meyers *et al.*, 1999; Bai *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2000). La ausencia de genes *TIR-NBS-LRR* en monocotiledoneas puede deberse a que nunca las desarrollaron o las pudieron haber perdido durante la divergencia entre monocotiledoneas y dicotiledóneas (Pan *et al.*, 2000).

Por otra parte, las secuencias TIR-NBS-LRR son relativamente homogéneas y forman un solo clado, mientras que las secuencias non-TIR forman múltiples clados que probablemente se originaron antes de dividirse entre angiospermas y gimnospermas (Cannon *et al.*, 2002; Bai *et al.*, 2002). Este patrón fue observado con las secuencias de RGCs obtenidas en cocotero, la distribución en diferentes ramas dentro del grupo non-TIR-NBS-LRR indica mayores niveles de divergencia para estas secuencias, de la misma manera la diversidad sugiere así mismo, una contribución hacia su propiedad evolutiva en la planta, debido a que los genes *R* y los genes *Avr* se encuentran bajo constante presión evolutiva. El entendimiento de los mecanismos evolutivos de los genes *R* es esencial para determinar cómo las plantas mantienen su resistencia a patógenos (Hammond y Jones, 1997; Pan *et al.*, 2000).

Los análisis filogenéticos realizados en conjunto con secuencias de genes de resistencia tanto de la subclase TIR como no-TIR-NBS-LRR apoyaron la clasificación de los RGCs de cocotero dentro de la subclase non-TIR. Por otra parte también, la presencia del motivo RNBS-A-non TIR y el residuo de triptófano al final de kinasa-2 sugieren que las secuencias de cocotero representan genes de resistencia del tipo non-TIR-NBS-LRR. Por otro lado, también se pudo determinar que los RGCs de cocotero se encuentran filogenéticamente relacionados a genes de resistencia de función conocida, esto provee evidencia de que ciertas regiones genómicas probablemente codifican para resistencia ante patógenos, a pesar de que solamente se cuente con fragmentos del dominio NBS y LRR.

En cocotero este es el primer estudio que reporta el aislamiento de secuencias candidatas a genes de resistencia en ecotipos resistentes a la enfermedad del amarillamiento letal y que las asociaciones observadas en los análisis filogenéticos con otras proteínas de resistencia non-TIR-NBS-LRR de funciones conocidas, sugieren que los RGCs de cocotero pueden estar involucrados en conferir resistencia ante los patógenos que lo afectan.

3.5 CONCLUSIONES

1. De las 132 secuencias obtenidas, 80 presentaron homología a genes de resistencia descritas en otras especies de plantas.
2. 29 grupos diferentes de RGCs fueron obtenidos en base a un >90% de identidad.
3. Los 29 grupos de RGCs presentaron los motivos característicos de las proteínas de resistencia del tipo NBS-LRR conocidas en otras especies de plantas.
4. Los 29 grupos de RGCs presentaron las características de la familia non-TIR-NBS-LRR y los análisis filogenéticos los agruparon dentro de esta misma familia.

3.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215:403–410.
- Bai, J., Pennill, L.A, Ning, J., Lee, S.W., Ramalingam, J., Leach, J.E. and Hulbert, S.H. (2002). Diversity in nucleotide binding site leucine rich repeat genes in cereals. *Genome Res*, 12:1871–1884.
- Bari, R. and Jones, D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol*, 69:473–488.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R. and Dangl, J.L. (2004). Plant disease resistance protein signalling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol*, 7:391–399.
- Cannon, S.b., Zhu H, Baumgarten, A.M., Splander, R., May, G., Cook, D.R. and Young, N.D. (2002). Diversity, distribution, and ancient taxonomic relationships within the TIR and non-TIR NBS-LRR resistance gene subfamilies. *J Mol Evol*. 54: 548-562.
- CONACOCO 2008. Consejo Nacional del cocotero, www.conacoco.com.mx.
- Dangl, L. and Jones, J. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826–833.
- Di Gaspero, G., and Cipriani, G. (2002). Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 163–172.
- Dominguez, E., López, J., Castillo, R. and Ruiz, P. (1999). El cocotero (*Cocos nucifera* L.) Manual para la producción en México. INIFAP. Libro técnico. No 6. 133 p.
- Doyle, P. (1998). The impact of lethal yellowing type coconut diseases on small farmers. Natural Resources Institute, UK.
- Ellen, K. and Helen, M. (2009). TIR-NBS-LRR genes are rare in monocots: evidence from diverse monocot orders. *BMC Research Notes*, 2: 197.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutchison, D., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B.M., Moughamer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkowski, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W.L., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T.C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Cannings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J.,

- Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R.M., Bhatnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalma, T., Oliphant, A. and Briggs, S. (2002). A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 296:92-100.
- Hammond-Kosack, K.E and Jones JD. (1997). Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48:575-607.
- 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., Cordova, I., Richardson, P. and Dibonito, R. (1999). Detection and diagnosis of lethal yellowing. In: C. Oropeza, J.L. Verdeil, G.R. Ashburner, R. Cardeña and J.M. Santamaría (Eds) *Current Advance in Coconut Biotechnology*, Pp 183-196. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherland (In press).
- Kanazin, V., Marek., L. and Shoemaker, R.C. (1996). Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 11 746 – 11 750.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N. P., Brown, R., Chenna, P.A., McGettigan, H., McWilliam, F., Valentin, I.M., Wallace, A., Wilm, R., Lopez, J.D., Thompson, T.J., Gibson and D.G. Higgins. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Leister, D., A. Ballvora, F. Salamini and C. Gebhardt. (1996). A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nature Genetic*, 14:421-429.
- Limei, He, Chunguang, Du, Lina Covalada, Zhanyou Xu, A. Forest Robinson, John Z. Yu, Russell J. Kohel, and Hong-Bin Zhang. (2004). Cloning, Characterization, and Evolution of the NBS-LRR-Encoding Resistance Gene Analogue Family in Polyploid Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 1234–1241.
- Meyers, B., Dickerman, A., Michelmore, R., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. and Young, N. (1999). Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J*, 20:317-332.
- Michelmore, R.W. and Meyers, B.C. (1998). Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome Res*, 8:1113-1130.
- Pan, Q., Wendel, J. and Fluhr, R. (2000). Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J Mol Evol*, 50:203–213.
- Peraza-Echeverria. S., Dale, J.L., Harding, R.M., Smith, K. Mike, and Collet, C. (2008). Characterization of disease resistance gene candidates of the nucleotide binding site (NBS) type from banana and correlation of a transcriptional

- polymorphism with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4. Mol Breeding, 22, 565–579.
- Pflieger, S., V. Lefebvre and M. Causse. (2001). The candidate gene approach in plant genetics: a review. Molecular Breeding, 7:275-291.
- Saitou, N. and M. Nei. (1987). The Neighbor-Joining Method: A new Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Molecular Biology and Evolution, 4, 406-425.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. (1997). The clustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic acids Res 24: 4876-4882.
- Yong, G. Yu., Glenin R. Buss and M.A. Saghai. (1996). Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11751–11756.
- Yu, Y.G., Buss, G.R. and Saghai M.A. (1996). Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93; 11751–11756.
- Zizumbo-Villareal, D., Colunga-García, P., Fernández-Barrera, M., Torres-Hernández, N., Oropeza, C. (2008). Mortality of Mexican coconut germplasm due to lethal yellowing. Plant Genetic Resources Newsletter, FAO-Bioversity 156: 23-33

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Los genes de resistencia codifican para proteínas que proveen efectiva inmunidad en la planta hospedera a través del reconocimiento de moléculas efectoras individuales (Chisholm *et al.*, 2006). La introgresión de genes *R* dentro de cultivares susceptibles de plantas hospederas confieren eficiente inmunidad a infección con patógenos que expresan el mismo efector (Dennis *et al.*, 2008). Sin embargo, algunos genes *R* parecen reconocer efectores con amplia distribución entre microbios, por lo tanto proveen tasas durables de resistencia y son los de principal interés para el mejoramiento de la inmunidad de las plantas, tal es el caso de el gene *Rpi-blb1* de *Solanum bulbocastanum* dentro del cultivo de papa el cual ha proveído resistencia durable ante el hongo *Phytophthora infestans* (Song *et al.*, 2003; Vleeshouwers *et al.*, 2009). Así como también al gen *Rpg1* el cual ha conferido resistencia perdurable a las infecciones de la rolla del tallo (Brueggeman *et al.*, 2002; Horvath *et al.*, 2003).

La eficiencia de las proteínas *R* en conferir inmunidad a través de las fronteras del género de plantas ha llevado a los investigadores a buscar nuevas variedades de genes *R* en los cultivos o sus parientes silvestres e introducirlos en los cultivos de interés (Dennis *et al.*, 2008).

La PCR utilizando iniciadores degenerados ha sido una de las principales estrategias actualmente utilizadas para el aislamiento de RGCs en diferentes cultivos. Varios RGCs han facilitado la clonación de la longitud total de genes *R* funcionales, incluyendo el gene *Dm3* de lechuga que confiere resistencia a 'mildió veloso' (*Bremia lactucae*; Meyers *et al.*, 1998) y el gen *Rpp8* de *Arabidopsis*, que es responsable de la resistencia a *Peronospora parasitica* (Aarts *et al.*, 1998). En cocotero esta estrategia fue utilizada para el aislamiento de RGCs lográndose identificar 80 secuencias que mostraron homología a genes de resistencia y otros RGCs descritos en otras especies de plantas. Dichas secuencias fueron clasificadas en 29 grupos diferentes y la secuencia deducida de aminoácidos reveló la presencia de los motivos característicos de los genes de resistencia, así como también el motivo RNBS-A non TIR y el residuo de triptófano al final

de kinasa-2 característico de la subfamilia no-TIR-NBS-LRR. Los análisis filogenéticos sustentaron esta misma clasificación al agrupar a los RGCs de cocotero dentro de los genes de la subfamilia no-TIR-NBS-LRR. Los alineamientos de las secuencias de proteínas de los RGCs y secuencias de genes de resistencia previamente caracterizadas, permitió observar que las secuencias aisladas en cocotero se encuentran filogenéticamente relacionadas con genes de resistencia involucrados en el reconocimiento de proteínas de avirulencia de patógenos, por lo tanto, es muy probable que las secuencias estudiadas sean genes de resistencia que reconozcan a los patógenos de este cultivo y que activen los mecanismos de defensa en la palma.

En cocotero este es el primer estudio que reporta el aislamiento masivo de RGCs y que abre una puerta para el estudio de la interacción planta-patógeno. Las secuencias de RGCs con las que actualmente contamos, proveen una fuente muy importante para la clonación de genes de resistencia y la valoración de su funcionalidad, así como también para el desarrollo de marcadores moleculares relacionados a resistencia ante patógenos o plagas. Los progresos en este campo contribuyen al entendimiento de los mecanismos de resistencia a enfermedades, poco conocidos en este cultivo y al desarrollo de nuevas estrategias para el control de las enfermedades que afectan su productividad. El encontrar genes de gran utilidad para el desarrollo biotecnológico de nuevas variedades de plantas cada vez se hace más importante en un mundo en constante crecimiento poblacional que contrasta con una menor producción de alimentos.

Esperamos que los resultados obtenidos en este estudio puedan de alguna manera contribuir al desarrollo biotecnológico de variedades de cocotero con nuevas características de resistencia ante las diversas enfermedades que afecten este cultivo, incluyendo a la enfermedad del Amarillamiento Letal, una de las principales enfermedades que actualmente se encuentra presente en el país.

4.2 CONCLUSIONES GENERALES

1. Utilizando diferentes juegos de iniciadores degenerados, logramos aislar y caracterizar 80 secuencias candidatas a genes de resistencia en cocotero.
2. Este es el primer estudio que reporta el aislamiento de secuencias candidatas a genes de resistencia en cocotero.

4.3 PERSPECTIVAS

Hasta ahora se han logrado aislar e identificar secuencias candidatas a genes de resistencia en los ecotipos resistentes a la enfermedad del amarillamiento letal, sin embargo, el aislamiento de estas secuencias en el ecotipo altamente susceptible al AL y la comparación con las obtenidas con los ecotipos resistentes podría darnos una perspectiva sobre la posible resistencia y susceptibilidad ante dicha enfermedad.

Los RGCs con los que contamos actualmente reúnen las características estructurales para actuar como proteínas de resistencia activadoras de las rutas de ácido salicílico o de jasmonico y etileno que a su vez dirige hacia la activación de genes *PR*. Sin embargo, es de suma importancia realizar análisis funcionales que comprueben esta hipótesis. Esperamos que al someter plántulas de cocotero ante algún tipo de patógeno o a ácido salicílico se aumente la expresión de las secuencias obtenidas.

Las secuencias que presenten los mejores resultados en cuanto a los análisis funcionales serían excelentes candidatos para el aislamiento del gen completo por medio de la técnica de RACE (Rápida amplificación de los extremos terminales del cDNA) y realizar ensayos de interacción proteína-proteína del tipo de dos híbridos, que demuestren que las proteínas no-TIR-NBS-LRR interactúan con proteínas de avirulencia y de esta manera tener más evidencia acerca de su función.

En *Arabidopsis*, el mapeo genético ha proporcionado evidencia de que las posiciones de los RGCs identificados, corresponden a 21 loci de genes de resistencia conocidos (Speelman *et al.*, 1998) y ellos co-segregan con los marcadores relacionados a enfermedades de hongos (Aarts *et al.*, 1998). Puesto que las secuencias NBS-LRR están vinculadas a, o posiblemente, parte de los genes de resistencia están bien conservados en el reino vegetal, ellos proveen una herramienta molecular para el mapeo genético y la clonación posicional de genes de resistencia en cocotero. Por lo tanto, el desarrollo de un juego de marcadores moleculares basados en secuencias NBS es de gran importancia para la identificación de genotipos resistentes y susceptibles a ciertas enfermedades que lo afectan.

4.4 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aarts, M., te Lintel, H., Holub, E., Beynon, J., Stiekema, W. and Pereira, A. (1998). Identification of R-gene homologous DNA fragments genetically linked to disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*, 11:251-258.
- Brueggeman, R., Rostoks, N., Kudrna, D., Kilian, A., Han, F., Chen, J., Druka, A., Steffenson, B., and Kleinhofs, A. (2002). The barley stem rust resistance gene Rpg1 is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:9328-9333.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124:803-814.
- Dennis, E.S., Ellis, J., Green, A., Llewellyn, D., Morell, M., Tabe, L. and Peacock, W.J. (2008). Genetic contributions to agricultural sustainability. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363:591-609.
- Horvath, H., Rostoks, N., Brueggeman, R., Steffenson, B., von Wettstein, D. and Kleinhofs A. (2003). Genetically engineered stem rust resistance in barley using the Rpg1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:364-369.
- Meyers, B.C., D.B. Chin, K.A. Shen, S. Sivaramakrishnan, D.O. Lavelle, Z. Zhang and R.W. Michelmore (1998). The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell* 10:1817-1832.
- Song, J., Bradeen, J.M., Naess, S.K., Raasch, J.A., Wielgus, S.M., Haberalach, G.T., Liu, J., Kuang, H., Austin-Phillips, S. and Buell, C.R. (2003). Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:9128-9133.
- Speulman, E., Bouchez, D., Holub, E.B. and Beynon, J.L. (1998). Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 14:467-474.
- Vleeshouwers, V. G., Rietman, H., Krenek, P., Champouret, N., Young, C., Oh, S.K., Wang, M., Bouwmeester, K., Vosman, B., Visser, R.G. (2009). Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS One*, 3:e2875.