



Cinvestav
Unidad Irapuato

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA E INGENIERÍA GENÉTICA DE PLANTAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA GENÉTICA**

“Uso de genes involucrados en la inmunidad innata vegetal como estrategia para conferir resistencia ante bacterias fitopatógenas en jitomate (*Solanum lycopersicum*), por medio de ingeniería genética”

Tesis que presenta:

M.C. Marco Miguel Plancarte De la Torre

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias en la especialidad de:

Biología de plantas.

Director de tesis: **Dr. Miguel Ángel Gómez Lim.**

Irapuato, Guanajuato.

Agosto de 2016.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas y Microorganismos del Departamento de Ingeniería Genética de la Unidad Irapuato del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la asesoría del Doctor Miguel Ángel Gómez Lim.

Director de Tesis:

Dr. Miguel Ángel Gómez Lim.

Sinodales:

Dr. John Paul Délano Frier.

Dr. Víctor Olalde Portugal.

Dra. Laila Pamela Partida Martínez.

Sinodal externo:

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe-Balch.

A PRAYER FOR GRAD STUDENTS



AGRADECIMIENTOS

El trabajo presentado en esta Tesis no podría haber sido culminado exitosamente sin la ayuda y colaboración de muchísimas personas muy valiosas que, de alguna u otra manera, contribuyeron en algo al desarrollo del mismo y a mi formación profesional y humana. A todos ustedes, todo mi reconocimiento y mi más sincero agradecimiento.

A Dios, por permitirme llegar con salud a este punto de mi vida, y por poner en mi camino a tantas personas maravillosas.

A mi familia, por su apoyo incondicional, por estar ahí siempre que los he necesitado, por cobijarme con su cariño, por enseñarme que la familia es lo primero, por tantos y tantos buenos momentos a lo largo de mi vida.

Al Dr. Miguel Ángel Gómez Lim, por abrirme las puertas de su laboratorio desde hace 15 años para un verano científico, y de nuevo varios años después como estudiante de doctorado. Por confiar en mí, por su guía y su apoyo a lo largo de todo este tiempo.

A mis sinodales, la Dra. Laila Pamela Partida Martínez, el Dr. John Paul Délano Frier y el Dr. Víctor Olalde Portugal. Por sus sabios consejos y observaciones, las cuales ayudaron en mucho al enriquecimiento de este trabajo. Al Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch, por toda su ayuda a mi formación académica al ser mi maestro en la Carrera y en la Maestría, mi director de tesis en la Maestría y mi sinodal externo en el Doctorado.

A Luis Jorge Saucedo Arias, José Luis Hernández Chávez y Brisia Alejandra Aguilar Barragán, todos ellos auxiliares del laboratorio en diferentes puntos de mi proyecto de Doctorado, por toda la ayuda y consejos técnicos brindados.

A todo el personal del Cinvestav que, con su trabajo diario, nos facilitan la vida a los estudiantes. A todas las secretarias, al personal de invernaderos, al de medios, al de almacén y compras, al de mantenimiento, al de intendencia. De manera especial a Dora Elia Anguiano Jaime por toda la ayuda y por ser un ejemplo de eficiencia, a Leticia Chong y a Laura Camacho que siempre fueron muy serviciales, y a Antonio Cisneros por su ayuda con las fotos y por su apoyo al Cineclub.

A mis amigos del Cinvestav, con los que he compartido tantos buenos momentos y que se convirtieron en mi familia irapuatense. A los que aún siguen en el Cinvestav pero también a los que ya han seguido su camino. A Nelly Vázquez, a Margarita López, a Víctor Vázquez, a Lina Escobar, a Anny Vallejo, a Paco Castillo, a Nancy Coconi, a Dennis Magaña, a Andrea Palmeros, a Diana Zavala, a Luis Miguel Alfaro, a Rafa González, a Cristian López, a Eliana Valencia, a Fernando Suárez, a Yardená García, a Uriel Rojas, a Laura Uribe, a Beto Medina, a Mayté Jiménez.

A todos aquellos con los que he convivido en diferentes grupos y actividades. A los que formaron parte de los equipos de volley en los que estuve (Real-coholicos, Mumzilla, Me hago Doctor y los Majos), a las chicas de las Rabiosas y Rabiozonas, a los miembros anteriores y actuales del Cecig, y a los que me apoyaron con el proyecto del Cineclub y me ayudaron a mantenerlo con vida.

A Kena, por aparecer en el momento oportuno, por atreverse, por correr el riesgo, por ser como es, por quererme como soy. Por existir.

Finalmente quiero dar gracias al Conejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haberme apoyado con la beca doctoral 161889, la cual fue de gran ayuda para poder llevar a su culminación este proyecto de investigación.

Dedicatorias...

Este trabajo está dedicado a mi familia.

A mis padres, Lupita y Ángel.

A ustedes les debo todo lo que soy, y sólo les puedo pagar con mi eterno agradecimiento y amor.

A mis hermanos, Anilú y Ángel.

Mis primeros amigos, mis compañeros de infancia, mis cómplices. Siempre estaré muy orgulloso de ustedes.

A mis sobrinas, Valeria y Carolina.

Una, un ejemplo de tenacidad y fortaleza; la otra, siempre traviesa, alegre y cariñosa. Las dos, el amor fraternal.

A mis tías, Lula y Mela.

Pocas personas tienen la fortuna de crecer con tres mamás.

Yo la tuve.

ÍNDICE

COMITÉ DE SINODALES.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIAS.....	V
ÍNDICE.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XI
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Las plantas y sus enfermedades.....	2
I.2 El sistema inmune innato vegetal.....	8
I.3 El modelo de estudio y sus patógenos bacterianos.....	20
I.4 Inducción de resistencia a bacterias en cultivos por medio de ingeniería genética.....	29
I.5 Particularidades, innovaciones e hipótesis.....	33
II. OBJETIVOS.....	35
III. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES.....	37
IV. RESULTADOS.....	45
IV.1 Diseño de oligonucleótidos y aislamiento de los genes <i>EFR</i> , <i>BAK1</i> y <i>FLS2</i>	45
IV.2 Clonación de los genes <i>EFR</i> , <i>BAK1</i> y <i>FLS2</i> en células de <i>Escherichia coli</i>	47
IV.3 Construcción del casete utilizado en la transformación de plantas.....	48
IV.4 Transformación genética de jitomate.....	60
IV.5 Pruebas moleculares.....	62
IV.6 Retos con bacterias fitopatógenas.....	67
IV.7 Análisis por PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR).....	77
V. DISCUSIÓN.....	79
VI. CONCLUSIONES.....	87
VII. PERSPECTIVAS.....	89
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Vector LJMS.....	39
Figura 2. Mapa de los genes <i>EFR</i> , <i>BAK1</i> y <i>FLS2</i>	45
Figura 3. Amplificación de los genes <i>EFR</i> , <i>BAK1</i> y <i>FLS2</i>	46
Figura 4. Genes <i>BAK1</i> , <i>FLS2</i> y <i>EFR</i> clonados en <i>E. coli</i>	47
Figura 5. Enlazadores génicos.....	48
Figura 6. Plásmido pBlueScript SK (+)-Enlazador EUB- <i>BAK1</i>	51
Figura 7. Plásmido pBlueScript SK (+)-Enlazador BUF- <i>FLS2</i>	52
Figura 8. Parches para añadir sitios de restricción al inicio y al final de la construcción.....	54
Figura 9. Plásmido pJET1.2 conteniendo el gen <i>EFR</i> editado con <i>Bam</i> HI.....	55
Figura 10. Plásmido pBlueScript SK (+) conteniendo el enlazador BUF y el gen <i>FLS2</i> editado con <i>Sal</i> I.....	56
Figura 11. Construcción completa del casete usado para la transformación de las plantas.....	57
Figura 12. Análisis de mapeo por restricción del casete <i>EFR</i> -UB- <i>BAK1</i> -UB- <i>FLS2</i> clonado dentro del vector LJMS.....	58
Figura 13. Proceso de transformación y regeneración de las plantas de jitomate.....	60
Figura 14. Ensayos de GUS en tejidos de jitomate.....	63
Figura 15. Germinación y desarrollo de plantas de jitomate F1-F4.....	64
Figura 16. Evidencia molecular de la transformación de jitomate.....	66
Figura 17. Cepas bacterianas utilizadas para los retos a las plantas transgénicas.....	67
Figura 18. Desarrollo de síntomas ante la infección con <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>	69
Figura 19. Conteo de unidades formadoras de colonia para la infección con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	70
Figura 20. Desarrollo de síntomas ante la infección con <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	72
Figura 21. Conteo de unidades formadoras de colonia para la infección con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	73
Figura 22. Desarrollo de síntomas ante la infección con <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	75

Figura 23. Conteo de unidades formadoras de colonia para la infección con <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	76
Figura 24. Análisis por PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) de las líneas transgénicas de jitomate.....	78
Tabla 1. Detalles de la primera estrategia que se siguió para la construcción del casete.....	49
Tabla 2. Detalles de la segunda estrategia que se siguió para la construcción del casete.....	50
Tabla 3. Detalles de la tercera estrategia que se siguió para la construcción del casete.....	53
Tabla 4. Detalles de la estrategia que se siguió para la construcción final del casete dentro del vector LJMS.....	57

RESUMEN

Las enfermedades de las plantas exacerbaban el actual problema de hambruna que azota a buena parte de la población mundial. Los recientes avances en genómica y genética molecular de la patogénesis y de la resistencia del hospedero, dan esperanzas de nuevas soluciones para muchas enfermedades importantes de los cultivos. Para defenderse contra infecciones, las plantas responden a moléculas básicas y características de los patógenos llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs por sus siglas en inglés), lo que activa respuestas de inmunidad basal conocidas como inmunidad activada por PAMP (PTI por sus siglas en inglés). Es posible que la actividad de los receptores de reconocimiento de PAMPs se mantenga después de su transferencia entre familias vegetales. El objetivo de este trabajo fue transferir los genes *EFR*, *FLS2* y *BAK1*, involucrados en el reconocimiento de PAMPs y en la activación de la PTI en *Arabidopsis*, a plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), con el fin de generar una resistencia de amplio espectro y larga duración contra patógenos bacterianos. Para lograrlo, tras probar diferentes estrategias de ligación que resultaron fallidas utilizando diferentes vectores comerciales como el pUC57, el pUC19 y el pBlueScript SK (+), finalmente se logró construir un plásmido con un casete de locus sencillo con los genes antes mencionados, utilizando el vector LJMS, el cual fue construido anteriormente en nuestro laboratorio. Con dicho plásmido, se siguió una estrategia basada en la transformación genética de plantas vía *Agrobacterium tumefaciens*, retando posteriormente a las plantas transgénicas con bacterias patógenas. Logramos producir plantas de jitomate F4 que mostraron un aumento de resistencia a las bacterias, sin efectos considerables en detrimento de su productividad. Una línea en particular mostró cerca del 40, 27 y 17% de la infección bacteriana comparada con plantas silvestres no transgénicas cuando fueron infectadas con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* respectivamente. Nuestros resultados sugieren que la expresión heteróloga de múltiples genes involucrados en la PTI bajo el control de un solo promotor puede ser usada para diseñar una resistencia de amplio espectro a patógenos bacterianos en cultivos importantes.

ABSTRACT

Plant diseases exacerbate the current problem of famine plaguing much of the world's population. Recent advances in genomics and the molecular genetics of host resistance and pathogenesis provide hope of finding novel solutions to many important crop diseases. To defend against infections, plants respond to pathogen's basic and characteristic molecules called pathogen associated molecular patterns (PAMPs), which activate basal immunity responses known as PAMP triggered immunity (PTI). It is possible that the activity of PAMPs recognition receptors is retained after their transfer between plant families. The objective of this work was to transfer the *EFR*, *FLS2*, and *BAK1* genes, involved in the recognition of PAMPs and activation of PTI in *Arabidopsis*, into tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.), with the goal of generating a wide-range, long-lasting resistance against bacterial pathogens. To reach that objective, after unsuccessfully trying different ligation strategies using different commercial vectors such as pUC57, pUC19, and pBluescript SK (+), we finally managed to construct a plasmid with a single locus cassette containing the aforementioned genes, using the LIMS vector, which was built earlier in our laboratory. With this plasmid, a strategy based on the genetic transformation of plants via *Agrobacterium tumefaciens* was followed, subsequently challenging the transgenic plants with pathogenic bacteria. We managed to produce transgenic F4 tomato plants that showed increased resistance to bacteria, with no significant detrimental effects on productivity. One line in particular showed about 40, 27 and 17% of bacterial infection compared with wild-type non transgenic plants when infected with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, respectively. Our results suggest that the heterologous expression of multiple PTI-involved genes under the control of a single promoter could be used to engineer broad-spectrum disease resistance to bacterial pathogens in important crops.

I. INTRODUCCIÓN

Los parásitos y patógenos de plantas son una amenaza significativa y creciente para la producción de cultivos en todo el mundo. Por lo tanto, el objetivo de producir cultivos con resistencia duradera a un espectro de enfermedades, es un aspecto importante en la investigación de plantas. En el pasado, la resistencia duradera a enfermedades se ha buscado a través de métodos tradicionales de cultivo, o por la aplicación generalizada de plaguicidas. Ningún enfoque ha producido resultados duraderos.

La ingeniería genética de plantas ha abierto nuevas vías para modificar los cultivos, y esto ofrece nuevas soluciones para resolver necesidades específicas. El desarrollo de procedimientos en biología celular para regenerar plantas a partir de células individuales o tejidos organizados y el descubrimiento de nuevas técnicas para transferir genes a las células vegetales, han venido a cumplir el prerrequisito para el uso práctico de la ingeniería genética en la modificación y mejora de los cultivos.

Para poder diseñar plantas con una mayor y más durable resistencia a enfermedades utilizando las tecnologías transgénicas hay que abordar dos cuestiones. En primer lugar, ¿qué gen o genes queremos expresar para mejorar la resistencia a las enfermedades? Y en segundo lugar, ¿cómo se van a expresar estos genes para que los rendimientos de los cultivos realmente se incrementen? Las tecnologías emergentes están proporcionando una gran cantidad de genes candidatos que podrían conducir a una mejor protección de los cultivos, a través de la ingeniería genética.

La tecnología de transformación de plantas se ha convertido en una plataforma adaptable para la mejora de cultivares, así como para el estudio de la función de los genes en las plantas. Este éxito representa la culminación de años de esfuerzos en la mejora de cultivo de tejidos, en las técnicas de transformación y en la ingeniería genética. Los vectores y las metodologías de transformación de plantas se han superado continuamente para aumentar la eficiencia de transformación y para lograr la expresión estable de transgenes en las plantas.

1.1. Las plantas y sus enfermedades

Las enfermedades de las plantas

Las plantas no solamente constituyen la mayor parte del ambiente vivo de la Tierra, ya sea en forma de hierbas, arbustos o árboles, sino que además, constituyen también, de manera directa o indirecta gran parte de la dieta de la cual dependemos los humanos y todos los demás animales. Incluso alimentos como la carne, la leche y los huevos que nosotros y otros animales carnívoros consumimos, provienen de animales que a su vez dependen de las plantas para su propia alimentación (Keen, 2000; Lucas, 2009). Las plantas son los organismos más complejos capaces de convertir la energía de la luz solar en energía química utilizable, la cual almacenan en moléculas de carbohidratos, proteínas y lípidos. Así pues, todos los animales, incluyendo a los humanos, dependemos de estas sustancias vegetales para nuestra supervivencia (Keen, 2000).

El grado de resistencia que presenta una planta contra el ataque de parásitos y patógenos determina en cierta medida el crecimiento y rendimiento de la misma. Ciertamente todos los factores que afectan la salud de una planta influyen en su crecimiento y producción, disminuyendo así notablemente su rendimiento. Son muchas las causas que ocasionan el crecimiento deficiente de las plantas y la destrucción de cosechas, pero las más comunes son los fitopatógenos, el clima desfavorable, las malezas y las plagas de insectos (Agrios, 2005).

Cuando una o varias de las funciones de una planta se ven alteradas, ya sea por organismos patógenos o por determinadas condiciones del medio, algún tipo de enfermedad se presentará en la misma. Son dos las causas principales de enfermedad en las plantas: los organismos patógenos y los factores del ambiente físico. Los procesos que caracterizan a una enfermedad pueden ser muy variados y dependerán, en gran medida, tanto del agente causal de la enfermedad como de la planta misma. En un principio, la reacción de la planta ante el agente que ocasiona su enfermedad se concentra en la zona enferma, y es de naturaleza química e invisible a simple vista. Sin embargo, poco tiempo después, la reacción se difunde y se producen cambios histológicos que se hacen notables y constituyen los síntomas de la enfermedad (Schaad *et al.*, 2003).

Las células y los tejidos afectados de las plantas enfermas, comúnmente se debilitan o destruyen a causa de los agentes que ocasionan la enfermedad. La

capacidad que tienen esas células y tejidos para llevar a cabo sus funciones normales, disminuye o se anula por completo; como resultado, la planta muere o merma su crecimiento (Goto, 2012). Los tipos de células o tejidos que son infectados determinan el tipo de función fisiológica de la planta que será afectada. Así, la infección de la raíz (por ejemplo, la pudrición), dificulta la absorción del agua y de los nutrientes del suelo; la infección de los vasos del xilema (marchitamientos vasculares y ciertos cánceres) interfiere con la translocación del agua y los minerales hasta la parte superior de la planta; la infección del follaje (manchas foliares, tizones y mosaicos), afecta la fotosíntesis; la infección de la corteza (cáncer cortical e infecciones virales del floema), obstaculiza la translocación, hasta la parte inferior de la planta, de los productos fotosintéticos; las infecciones florales (tizones bacterianos y fungos, e infecciones ocasionadas por virus, micoplasmas y hongos), interfieren con la reproducción, y las infecciones del fruto (pudriciones), entorpecen la reproducción y/ o el almacenamiento de las reservas alimenticias para la nueva planta (Madden y Wheelis, 2003).

En contraste con lo anterior, hay otro grupo de enfermedades en las que las células afectadas en vez de ser debilitadas o destruidas, son estimuladas para dividirse con mayor rapidez (hiperplasia), o para crecer mucho más (hipertrofia), que las células normales. Por lo general, las células hipertrofiadas o hiperplásicas dan como resultado el desarrollo de órganos comúnmente no funcionales que se dividen y crecen de manera anormal, así como la formación de sobrecrecimientos amorfos sobre los órganos en apariencia normales. Las células y tejidos estimulados en exceso, no sólo absorben muchos de los nutrientes disponibles en perjuicio de los tejidos normales, sino también, debido a su crecimiento excesivo, pueden presionar a los tejidos normales adyacentes dificultando las funciones fisiológicas de la planta (Madden y Wheelis, 2003; Heitefuss y Williams, 2012). Por lo tanto, la enfermedad en las plantas se define como el mal funcionamiento de las células y tejidos del hospedero, debido al efecto continuo sobre éstos de un organismo patógeno o factor ambiental, y que origina la aparición de los síntomas. La enfermedad es un estado que implica cambios anormales en la forma, fisiología, integridad o comportamiento de la planta. Dichos cambios conducen a la alteración parcial o muerte de la planta, o de sus órganos (Madden y Wheelis, 2003).

Las plantas cultivadas se ven afectadas por un gran número de enfermedades. Cada tipo de cultivo puede ser susceptible, en promedio, a más de cien

enfermedades. En cuanto a los organismos patógenos, el grado de especificidad varía, desde los que pueden atacar solamente a una variedad de cultivo, hasta los que pueden atacar a varias docenas o incluso a cientos de especies vegetales (Agrios, 2005).

Aunque los hongos y los virus pueden ser considerados como los fitopatógenos más importantes, algunas infecciones por fitopatógenos bacterianos también causan pérdidas significativas en la agricultura. La fitopatogenicidad no es un rasgo muy extendido entre las bacterias, ya que se pueden encontrar bacterias fitopatógenas sólo en unos pocos géneros. Durante los últimos años, la investigación ha generado una amplia información sobre los mecanismos moleculares por los cuales las bacterias interactúan con su planta hospedera, pero este progreso en la comprensión de las enfermedades bacterianas de las plantas se ha logrado principalmente para los fitopatógenos gram negativos. Esto es debido al hecho de que la mayoría de las bacterias fitopatógenas son precisamente gram negativas y, a menudo pertenecen a géneros para los que los métodos y herramientas para un análisis molecular se encuentran ya disponibles (Eichenlaub *et al.*, 2006).

Pérdidas causadas por las enfermedades de las plantas

Las enfermedades vegetales son de vital importancia para los humanos, debido a que estas dañan a las plantas y a los productos de las plantas de los cuales los humanos dependen para su alimento, vestido, muebles, ambiente, y en muchos casos incluso para su casa. Para millones de personas en todo el mundo que aún dependen de su propia producción de plantas para sobrevivir, las enfermedades vegetales pueden ser la diferencia entre una vida cómoda, y una vida perseguida por el hambre o incluso de una muerte por inanición. Para los países en donde la comida es abundante, las enfermedades vegetales son importantes principalmente porque causan pérdidas económicas a los agricultores (Schaad *et al.*, 2003; Horsfall y Cowling, 2012). Sin embargo, las enfermedades vegetales también ocasionan un incremento de precios de los productos para los consumidores; algunas veces causan efectos patológicos severos y directos para los humanos y animales que comen productos de plantas enfermas (no tanto por el agente causal en sí, sino por productos tóxicos que estos pueden producir, como por ejemplo las micotoxinas producidas por ciertos hongos fitopatógenos), y en el intento de controlar las enfermedades, la gente libera

millones de kilogramos de pesticidas tóxicos que contaminan el agua y el ambiente (Schaad *et al.*, 2003; Goto, 2012).

Los tipos y cantidades de pérdidas causadas por las enfermedades vegetales varían dependiendo de la planta o del producto vegetal, del patógeno, de la localidad, del ambiente, de las medidas de control empleadas, y de la combinación de estos factores. Las pérdidas pueden variar de muy ligeras hasta llegar al 100%. Las plantas o productos vegetales pueden reducir su cantidad por enfermedad en el campo, como de hecho es el caso con la mayoría de las enfermedades vegetales, o por enfermedades durante el almacenamiento, como es el caso de las pudriciones de frutos, verduras, granos y fibras almacenados (Brown y Ogle, 1997; Lucas, 2009). Con frecuencia, pérdidas severas pueden ser ocasionadas por la reducción de la calidad de los productos vegetales. Por ejemplo, mientras que las manchas, roñas y pústulas en frutos, verduras o plantas ornamentales pueden tener poco efecto en la cantidad producida, la calidad inferior del producto puede reducir tanto el valor de mercado, que la producción no sea costeable o sea una pérdida total (Brown y Ogle, 1997).

Aunque las pérdidas directas en producción y calidad ocasionadas por las enfermedades vegetales suelen a menudo considerarse como las más importantes, existen también pérdidas financieras que pueden surgir de muchas maneras y que no deben ser menospreciadas. Los agricultores pueden verse obligados a plantar una variedad de planta específica que sea resistente a enfermedades, pero que no sea tan productiva, o que sea más costosa o menos costeable comercialmente que otras variedades. Pueden verse forzados a aplicar métodos de control para la enfermedad, incurriendo así en una serie de gastos como pueden ser por maquinaria, químicos, almacenes, mano de obra, etc. Otra fuente de pérdida económica puede venir del incremento de costos de transporte al tener que proporcionar almacenaje y vehículos con refrigeración. En muchas ocasiones las enfermedades de las plantas afectan la vida de anaquel de un producto, obligando a los agricultores a vender sus cosechas durante un período corto, cuando el producto abunda y su precio disminuye. Igualmente puede ser necesaria una separación física de los productos vegetales sanos y enfermos, esto para evitar la diseminación de la enfermedad, ocasionando esto, un incremento en los costos por manejo (Agrios, 2005).

El costo de controlar las enfermedades vegetales, así como la productividad perdida, son atribuibles en su mayor parte a los patógenos. Algunas enfermedades vegetales pueden ser controladas casi completamente por uno u otro método,

resultando así en pérdidas financieras correspondientes sólo al costo del control. Algunas veces sin embargo, este costo puede ser casi tan alto, o incluso más alto que el que se espera obtener de la comercialización del cultivo, como es el caso de ciertas enfermedades de granos pequeños. Para otras enfermedades aún no se conocen medidas de control efectivas, y solo una combinación de prácticas de cultivo y el uso de variedades con cierta resistencia hacen posible su cultivo (Schaad *et al.*, 2003; Heitefuss y Williams, 2012). Sin embargo, para la mayoría de las enfermedades vegetales, mientras se siga contando con pesticidas químicos, habrá disponibilidad de controles prácticos, aunque se incurra en algunas pérdidas a pesar de las medidas de control tomadas. En estos casos, los beneficios del control aplicado son generalmente mucho mayores que la combinación de las pérdidas directas por la enfermedad y las pérdidas indirectas por los gastos de control (Schaad *et al.*, 2003).

Control químico de enfermedades vegetales

A mediados de la década de 1950, los científicos se percataron de que existían cepas de bacterias fitopatógenas que mostraban resistencia ante ciertos antibióticos, asimismo, para 1963 se habían encontrado variedades de hongos fitopatógenos resistentes a algunos fungicidas protectores. No obstante, fue hasta que se hizo general el uso de fungicidas sistémicos en la década de 1970, que aparecieron nuevas cepas/aislados de hongos fitopatógenos resistentes a fungicidas que habían probado ser efectivos anteriormente. Este fenómeno propició el desarrollo de nuevas estrategias para el control efectivo de las enfermedades vegetales mediante el uso de fungicidas y bactericidas más efectivos. Algunas de las estrategias que se desarrollaron a partir de esto son el uso de mezclas de fungicidas, alternando diferentes sustancias en aplicaciones sucesivas, o aplicando primeramente un compuesto de acción sistémica durante las etapas tempranas de la enfermedad y posteriormente un compuesto de amplio espectro en las etapas tardías de la misma (Agrios, 2005).

Desde hace mucho tiempo se ha sabido que los pesticidas químicos son venenos tóxicos. En un inicio, el público asumió que los pesticidas eran tóxicos solo contra los tipos de plagas para las que estaban destinados. Tanto los científicos como los usuarios estaban seguros de que los animales y humanos no eran afectados por los pesticidas, a menos de que fueran alimentados con ellos en grandes cantidades, ya fuera accidental o intencionalmente. Por lo tanto, durante un largo tiempo, los

pesticidas se aplicaron libremente en campos, frutas, verduras, aguas estancadas, e incluso directamente en animales y humanos para controlar insectos y enfermedades que los afectaban. Cientos de pesticidas fueron producidos anualmente, y muchos de los pesticidas más nuevos eran mucho más tóxicos que los anteriores. En otras palabras, podían matar o dañar seriamente microbios, plagas, animales superiores y humanos, a concentraciones mucho más bajas y mucho más rápido que los pesticidas anteriores. Algunos de los pesticidas se descomponían en compuestos no tóxicos o mucho menos tóxicos poco después de ser aplicados y de exponerse al aire, sol y humedad. Otros, sin embargo, como el DDT y los hidrocarburos clorados, consistían de moléculas persistentes que resistían la degradación y permanecían tóxicos por muchos años o indefinidamente (Schaad *et al.*, 2003).

Durante la década de 1950 hubo grupos de activistas que trataron de poner en la agenda pública la preocupación concerniente al uso de pesticidas, sin embargo, como los beneficios que proporcionaban estos para el control de insectos y de enfermedades tanto vegetales como animales eran tan grandes, y como los científicos e industriales de esa época aseguraban de manera contundente que el uso de pesticidas no representaba ningún riesgo, dichas voces de alarma no llegaron al oído del público general. Hoy en día, el uso de pesticidas se encuentra mucho más restringido, y las personas que manejan productos tratados con pesticidas deben seguir reglas muy estrictas. Esto ha hecho que, por un lado el uso de los pesticidas sea cada vez más seguro, pero por el otro lado, que sea también cada vez más costoso económicamente. Se prevé que en algún punto en el futuro habrá una carencia en el suministro de pesticidas efectivos, esto ha propiciado que se redoblen los esfuerzos para el desarrollo de métodos de control alternativos. Algunas posibles alternativas son el control biológico mediante el uso de microorganismos antagonistas, el mejoramiento de las antiguas prácticas de cultivo, así como el desarrollo de nuevas prácticas. De particular interés por los beneficios que conllevan, son los nuevos métodos de control que generan nuevas variedades de cultivos que ya llevan incorporada la resistencia a enfermedades. Esto se puede lograr por métodos convencionales o por medio de técnicas de ingeniería genética. Asimismo es posible usar compuestos no tóxicos cuya función es activar las defensas naturales de la planta (Agrios, 2005).

1.2. El sistema inmune innato vegetal

Como organismos sésiles, las plantas no pueden evitar ser confrontadas por muchos patógenos a lo largo de su ciclo de vida. Las plantas han evolucionado diferentes mecanismos de defensa. Uno de ellos son las barreras mecánicas no específicas, como por ejemplo las paredes celulares rígidas y la cutícula cerosa en la superficie foliar (Fu y Dong, 2013). Asimismo, las plantas también usan dos tipos de barreras químicas: barreras preformadas y barreras inducidas. Los compuestos químicos preformados pueden almacenarse en órganos o tejidos especializados (p.ej., tricomas, glándulas de aceite o capas celulares epidérmicas), y son liberados tras el ataque y subsiguiente daño mecánico causado por el patógeno. Las barreras químicas inducidas se producen después de que se detecta el ataque de un patógeno (Bednarek, 2009). Aun así, un pequeño número de patógenos logra evadir todas estas defensas. En ese caso, se activa el bien adaptado sistema inmune innato de las plantas (Walters, 2015).

Inmunidad innata vegetal

Los patógenos que logran evadir las primeras barreras inespecíficas son confrontados por el sistema inmune innato vegetal. A diferencia de los animales, las plantas no cuentan con células inmunes especializadas, ni con sistemas de inmunidad adquirida. Aun así, cuentan con un sistema inmune innato de dos niveles bien adaptado, que consiste de dos sistemas de percepción: la inmunidad activada por PAMP (PTI, por sus siglas en inglés), y la inmunidad activada por efectores (ETI por sus siglas en inglés) (Jones y Dangl, 2006).

Inmunidad activada por PAMP

Durante los últimos años, el reconocimiento de patrones moleculares ha emergido como un proceso fundamental en la respuesta inmune, tanto de plantas como de animales. Ambos poseen receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés), capaces de percibir firmas moleculares que identifican a clases enteras de microbios (como la quitina para los hongos o los peptidoglucanos para las bacterias), pero que están ausentes en el hospedero, lo que permite el reconocimiento de lo “no propio”. Aunque convencionalmente son llamados

patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés), los patrones moleculares reconocidos por los PRRs típicamente están asociados con una clase de microbios sin importar su patogenicidad; de hecho, los patrones pueden estar ausentes o disfrazados en los miembros patógenos de alguna clase de microbios. Por lo tanto, se les prefiere definir como patrones moleculares asociados a microbios (MAMPs, por sus siglas en inglés). Señales similares pueden surgir de la misma planta debido al daño causado por los microbios, en la forma de lo que originalmente eran llamados inductores endógenos (Darvill y Albersheim, 1984), y que ahora son descritos por los inmunólogos como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés) (Lotze *et al.*, 2007). La percepción de MAMPs o DAMPs por los PRRs inicia una respuesta de defensa activa, llamada inmunidad basal o PTI en plantas, e inmunidad innata en animales, la que se cree que mantiene a raya a los patógenos no adaptados. Sin embargo, los patógenos microbianos bien adaptados han encontrado maneras de romper esta primera línea de defensa activa. En una especie de carrera armamentista, plantas y animales han evolucionado una segunda línea de defensa: inmunidad adaptativa o adquirida en el caso de vertebrados superiores, y resistencia basada en genes *R*, o ETI, en el caso de las plantas (Boller y Felix, 2009).

Cuando los PRRs detectan algún MAMP, se activa una cascada de rutas de señalización, lo que provoca la activación de mecanismos de defensa, y finalmente lleva a la resistencia y en algunos casos, a una muerte celular programada y localizada (Walters, 2015).

Receptores de reconocimiento de patrones

En el campo biomédico, la inmunología se ha enfocado de manera clásica en la inmunidad adquirida o adaptada. Basándose en la combinación aleatoria de los genes de inmunoglobulinas, y de los genes de los receptores de células T durante el desarrollo de cada individuo, esta forma de inmunidad es capaz de formar un repertorio casi ilimitado de sistemas de percepción para patógenos invasores. Sin embargo, en años recientes la inmunidad innata ha recibido cada vez más atención. Basándose en el reconocimiento de MAMP o DAMP por un número más bien limitado de PRRs determinados desde la línea germinal, la inmunidad innata representa una primera línea de defensa contra patógenos invasores, y también es un elemento clave para el desarrollo de la inmunidad adaptativa (Akira *et al.*, 2006). La inmunidad innata

es evolutivamente muy antigua, y los animales invertebrados dependen completamente de esta forma de defensa (Alper *et al.*, 2007). Las plantas también dependen exclusivamente de mecanismos de inmunidad innata. Sin embargo, cuentan con dos tipos de inmunidad adaptativa (Abramovitch *et al.*, 2006).

Antiguamente estas dos formas de inmunidad eran llamadas resistencia basal u horizontal, y resistencia vertical o basada en genes *R*; estas dos formas de inmunidad ahora se dividen en PTI y ETI, que constituye una nueva terminología que ha encontrado amplia aceptación (Chisholm *et al.*, 2006).

La PTI (antiguamente llamada resistencia basal u horizontal), se basa en el reconocimiento de MAMPs y DAMPs (que anteriormente eran denominados inductores generales), por medio de PRRs (Boller, 1995). La PTI en plantas es muy similar a la inmunidad innata en animales. El concepto de inmunidad innata en el campo biomédico es congruente con el concepto de inductor propuesto desde hace mucho para la defensa de plantas (Darvill y Albersheim, 1984). Como un buen ejemplo de esta congruencia, la flagelina bacteriana es percibida como MAMP en las plantas a través de dominios de repeticiones ricas en leucina (LRR, por sus siglas en inglés), del receptor FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) (Gómez-Gómez y Boller, 2000), y por el receptor tipo Toll TLR5 en vertebrados (Hayashi *et al.*, 2001). Los dos receptores reconocen partes de la flagelina altamente conservadas, pero diferentes (Smith *et al.*, 2003), indicando que plantas y animales han evolucionado sus sistemas de percepción de flagelina de manera independiente. De manera más general, se puede decir que las similitudes en la inmunidad innata de plantas y animales se deben a un caso de evolución convergente (Ausubel, 2005).

La ETI (antiguamente llamada resistencia vertical o basada en genes *R*), se basa en la interacción altamente específica, directa o indirecta, de los efectores patógenos con los productos de los genes *R* de las plantas, de acuerdo a la teoría del gen por gen (Flor, 1971; Martin *et al.*, 2003). Este evento de reconocimiento generalmente lleva a un tipo vigoroso de reacción de defensa, llamado respuesta hipersensible, caracterizada por una rápida muerte celular apoptótica acompañada, en ocasiones, por necrosis local (Martin *et al.*, 2003). En la mayoría de los casos, los genes de resistencia codifican para proteínas de la clase NB-LRR, las cuales son proteínas citoplásmicas con un sitio de unión nuclear (NB), además de una serie de LRRs (Caplan *et al.*, 2008).

La evidencia actual indica que la percepción de señales de peligro puede ocurrir en tres formas: a través del reconocimiento de MAMPs, DAMPs o efectores. Estas señales de peligro, al menos en su fase inicial, activan una respuesta de defensa estereotípica común, ya sea que se origine de virus, bacterias, hongos u oomicetos. Aunque similares en términos cualitativos, estas respuestas pueden ser diferentes en términos cuantitativos y cinéticos, de acuerdo a las señales de peligro involucradas en cada caso particular (Boller y Felix, 2009).

Resistencia sistémica

La percepción de señales de peligro ocurre en los alrededores inmediatos a la herida o al sitio de invasión del patógeno. Aparte de las respuestas locales de defensa, un ataque microbiano puede activar respuestas de defensa de manera sistémica. En años recientes, dos tipos de resistencia sistémica han adquirido mucha atención: la resistencia sistémica adquirida (SAR, por sus siglas en inglés), y la resistencia sistémica inducida (ISR, por sus siglas en inglés) (Pieterse y Dicke, 2007). Estas respuestas sistémicas son consecuencia de la percepción local de MAMPs, o de otras señales de peligro en el sitio de invasión.

Pares de MAMP/ PRR caracterizados hasta el momento

El sistema de percepción de flagelina en plantas fue descubierto de manera fortuita cuando se estudiaba el efecto de una preparación de la proteína harpina, considerado un factor de virulencia de *Pseudomonas*, en células de jitomate. Se demostró que la proteína que tenía la actividad inductora era la flagelina, y no la harpina (Felix *et al.*, 1999). Péptidos sintéticos que representan la parte más conservada del extremo N de la flagelina bacteriana, como el péptido de 22 aminoácidos conocido como flg22, actúan como potentes inductores a concentraciones subnanomolares en varias especies vegetales (Felix *et al.*, 1999). En *Arabidopsis*, flg22 también induce la formación de calosa, la acumulación de la proteína de defensa PR1, y una fuerte inhibición del crecimiento de las plántulas (Gómez-Gómez *et al.*, 1999).

La sensibilidad a flg22 es compartida por miembros de todos los principales grupos de plantas superiores, indicando que el PRR para este epítipo de la flagelina

bacteriana es evolutivamente antiguo. De hecho, se han encontrado ortólogos de *FLS2* con un alto grado de conservación en los genomas de todas las plantas superiores analizadas hasta el momento. Se ha obtenido evidencia directa de la funcionalidad receptora para flg22 de los ortólogos de *FLS2* de jitomate (Robatzek *et al.*, 2007), y de tabaco (Hann y Rathjen, 2007). De manera interesante, el arroz tiene un ortólogo de *FLS2* bien conservado, el cual se ha demostrado que funciona como receptor para flg22 por sobreexpresión en arroz, y por expresión heteróloga en mutantes *fls2* de *Arabidopsis* (Takai *et al.*, 2008). En contraste, el musgo *Physcomitrella patens* contiene muchas LRR-RKs en su genoma, pero no presenta un ortólogo de *FLS2* y no muestra respuesta a flg22 (Boller y Felix, 2009).

En una compilación de todas las cinasas tipo receptor (RLKs) de *Arabidopsis*, agrupadas de acuerdo a las similitudes de los dominios de cinasa de proteínas, *FLS2* pertenece a la familia LRR XII, la cual tiene diez miembros (Shiu y Bleecker, 2003). Los ortólogos de *FLS2* tienen una arquitectura altamente conservada, lo cual sugiere una importancia funcional de las características conservadas. El dominio LRR extracelular se encuentra flanqueado por dominios con motivos característicos de doble cisteína. Estos dominios se conocen como el dominio LRR del extremo N (LRRNT), y el dominio LRR del extremo C (LRRCT), típicos de las proteínas LRR extracelulares (Liu *et al.*, 2008). El dominio LRRNT está particularmente bien conservado entre los ortólogos de *FLS2*. Los ortólogos de *FLS2* tienen 28 LRRs, con excepción de la variante del arroz, la cual carece del LRR2. Se sabe por estudios de cristalografía, que los dominios LRR forman una estructura solenoide altamente ordenada con forma de herradura, con un esqueleto estructural que consiste de una α -hélice y de residuos que conectan en el lado convexo externo de la herradura, y una lámina- β con la secuencia LxxLxLxxN en el lado cóncavo interno, donde se cree que los residuos x expuestos al solvente están involucrados en la unión del ligando (Bent y Mackey, 2007). Se ha identificado que las posiciones x de los LRRs 9-15 son importantes para la función de *FLS2*. Dichas posiciones x en la lámina- β de los LRRs 12-14, muestran una conservación particularmente alta en los ortólogos de *FLS2* de 18 brassicáceas diferentes. En contraste, cuando se comparan los dominios LRR de ocho ortólogos de *FLS2* de diferentes familias vegetales, la lámina- β tiene aminoácidos conservados en las posiciones x del LRR1 y los LRR22-28, pero no muestran una clara conservación en los LRR2-22. También se encuentran posiciones altamente conservadas en el esqueleto convexo, indicando que dicho esqueleto también puede ser funcionalmente

importante. Estas posiciones incluyen 17 sitios de N-glicosilación potenciales que están parcial o completamente conservados (Boller y Felix, 2009).

La región del extremo C de FLS2 tiene todos los elementos estructurales de una cinasa de proteínas de Ser/ Tre. Sin embargo, el bucle catalítico de FLS2 contiene la secuencia CD en lugar de la normal RD. Esto puede ser una característica distintiva de las cinasas PRR. Aunque las cinasas sin RD son infrecuentes en los genomas de plantas y animales, 15 de las 18 cinasas receptoras identificadas como PRRs pertenecen a la clase de cinasas de proteínas sin RD. El extremo C de FLS2 contiene posiciones altamente conservadas más allá del dominio cinasa de la proteína, indicando una función conservada (Boller y Felix, 2009).

La actividad inductora del EF-Tu también fue descubierta de manera fortuita: en experimentos control con extractos hervidos de una mutante *flic⁻* de *Escherichia coli* carente de flagelina, se detectó una proteína adicional con fuerte actividad inductora y se identificó como el factor de elongación EF-Tu, una de las proteínas más abundantes y más conservadas en las bacterias (Kunze *et al.*, 2004). Su actividad MAMP fue asignada a su extremo N, ya que péptidos que corresponden al extremo N acetilado de EF-Tu, llamados elf18 y elf26, activaron respuestas MAMP en *Arabidopsis* a concentraciones subnanomolares (Kunze *et al.*, 2004). La sensibilidad a elf18/ elf26 se encontró en varias especies de Brassicaceae pero no en los miembros de otras familias analizadas, indicando que la percepción de EF-Tu como MAMP es una innovación en Brassicaceae (Kunze *et al.*, 2004).

La expresión transitoria del gen *EFR* en *Nicotiana benthamiana*, una planta que carece de un sistema endógeno de percepción de EF-Tu, le confirió sensibilidad a elf18/ elf26, demostrando directamente que EFR es el PRR de EF-Tu (Zipfel *et al.*, 2006) y, por lo tanto, que los elementos río abajo de la activación de PRRs se encuentran conservados en *Arabidopsis* y *Nicotiana* (Boller y Felix, 2009).

La proteína EFR tiene una estructura similar a FLS2 y también pertenece a la familia LRR-RK XII de las RLK, pero contiene 21 LRRs en lugar de 28 (Shiu y Bleecker, 2003). Seis genes dentro de esta familia, incluyendo a *EFR*, están muy cercanamente emparentados con respecto al dominio cinasa. De manera interesante, el homólogo más similar a EFR con respecto al dominio de cinasa de proteínas, carece de todos los LRRs y su función es desconocida. Los otros cinco tienen 21 LRRs, como en el caso de *EFR*, y es posible que funcionen como receptores con ligandos desconocidos (Boller y Felix, 2009).

Debido a que la percepción de EF-Tu está restringida a la familia Brassicaceae (Zipfel *et al.*, 2006), no se espera que miembros de otras familias vegetales posean un ortólogo de *EFR*. Sin embargo, los genomas tanto del álamo como del arroz, contienen numerosos genes que codifican para LRR-RKs de arquitectura muy similar, sugiriendo que podrían funcionar como PRRs para MAMPs aún no identificados. Un posible ejemplo de esto lo representa el producto del muy estudiado gen *Xa21* de arroz, el cual confiere resistencia a cierto número de razas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Song *et al.*, 1995). Aunque *Xa21* ha sido designado como un gen *R*, puede ser que de hecho represente a un PRR para un MAMP: el gen bacteriano cognado *AvrX21* que no codifica para uno de los inductores usuales. En cambio, parece estar involucrado en la producción de una molécula sulfatada que es secretada y que posiblemente actúa como una señal quórum de detección (Lee *et al.*, 2006), una clase de moléculas predestinadas a actuar como MAMPs.

Los homólogos de *EFR* contienen 21 LRRs flanqueadas por unos dominios LRRNT y LRRCT bien conservados, con un par de cisteínas cada uno; el esqueleto convexo que contiene la α -hélice del dominio LRR tiene un patrón conservado de seis sitios de N-glucosilación potenciales. Los motivos de lámina- β muestran apenas algún grado de conservación en sus posiciones x , como se esperaría de PRRs que reconocen diferentes MAMPs, excepto por un potencial sitio de glucosilación parcialmente conservado en LRR21. Sin embargo, LRR11 muestra una marcada anomalía completamente conservada, con una extensión de cinco aminoácidos que contiene un sitio de glucosilación insertado antes de la lámina- β . Como en el caso de FLS2, la familia *EFR*/*Xa21* pertenece a las cinasas sin RD (Dardick y Ronald, 2006), y su extremo C contiene posiciones altamente conservadas (Boller y Felix, 2009).

Oligomerización de receptores - Interacción FLS2-BAK1 inducida por ligando

Ya se ha demostrado que FLS2 se asocia con la cinasa receptora LRR BAK1 (Heese *et al.*, 2007). BAK1 es una cinasa de proteínas que pertenece a la familia LRR II, la cual cuenta con 14 miembros (Shiu y Bleecker, 2003), y dentro de esa familia pertenece al grupo de cinco cinasas relacionadas con la embriogénesis somática (SERKs, por sus siglas en inglés).

FLS2 y BAK1 no se encuentran asociadas en células no estimuladas, pero forman un complejo dentro de los primeros dos minutos después de ser tratadas con

flg22 (Chinchilla *et al.*, 2007). Esta interacción parece ser funcionalmente importante, ya que las plantas de *Arabidopsis* que tienen una mutación *bak1* muestran respuestas a flg22 y elf18 fuertemente reducidas (Chinchilla *et al.*, 2007). La respuesta residual que aun presentan puede deberse a la sustitución de BAK1 en el complejo receptor por otros miembros de la familia SERK. En *N. benthamiana*, el silenciamiento génico inducido por virus, de un homólogo de BAK1/ SERK afecta las respuestas a la proteína de choque frío bacteriana, a la flagelina y a la elicitorina, pero no a la quitina (Heese *et al.*, 2007). Estos datos muestran que BAK1 y sus parientes funcionan como correceptores, no sólo en la señalización de brasinólidos y en el desarrollo, sino también en la señalización de MAMP y en la inmunidad innata (Boller y Felix, 2009).

Parientes cercanos de BAK1 existen no sólo en todas las angiospermas, sino también en el musgo *P. patens*, con un grado asombroso de homología. Ambos dominios LRRNT y LRRCT están casi perfectamente conservados, con la sorprendente excepción de que BAK1 y SERK4 carecen del LRRCT. Los cuatro LRRs tienen dos sitios de glucosilación conservados y posiciones x altamente conservadas en sus laminas- β . El dominio cinasa pertenece a las cinasas RD (Dardick y Ronald, 2006). El extremo C muestra un sorprendente grado de conservación: todos tienen los cuatro aminoácidos SGPR en el extremo C, como en la mayoría de los miembros de la familia LRR II. En adición a esto, SERK1/ SERK2 y los dos homólogos del musgo tienen siete aminoácidos conservados justo antes de la secuencia SGPR. También de manera sorprendente, BAK1 y SERK4 tienen una secuencia diferente en estas posiciones. De acuerdo a las bases de datos de etiquetas de secuencia expresadas (EST) de plantas, homólogos de SERK con el extremo C casi idéntico al de SERK1/ SERK2 se presentan en todos los grupos de plantas superiores, mientras que el extremo de BAK1/ SERK4 es único de la familia Brassicaceae (Boller y Felix, 2009). La presencia de la familia SERK en *Physcomitrella* (el cual no presenta homólogos de BRI1, FLS2 o EFR), indica una función ancestral como correceptor con receptores desconocidos. Parece ser que BAK1 y SERK4 representan una variante que ha evolucionado apenas recientemente en la familia Brassicaceae, y que pueden tener funciones especiales; de manera interesante, dobles mutantes *bak1/ serk4* son letales en la etapa de plántula (Chinchilla *et al.*, 2007).

La dimerización de receptores juega un papel esencial en la señalización de MAMP en animales. Un estudio cristalográfico ha demostrado que los receptores de MAMP, TLR1 y TLR2, forman un heterodímero bajo estimulación con un lipopéptido

triacilado. Parece ser que esta interacción extracelular mueve los dominios TIR intracelulares a una proximidad cercana para iniciar la señalización intracelular (Jin *et al.*, 2007). De manera similar, el receptor tipo Toll TLR3 homodimeriza después de la unión de ARN de doble cadena, y una vez más, se cree que esta dimerización provoca una interacción de los dominios TIR intracelulares para iniciar la señalización (Liu *et al.*, 2008).

La señalización por flagelina en las plantas puede seguir una ruta similar, aunque ligeramente diferente, ya que flg22 no se une a BAK1 (Chinchilla *et al.*, 2007). En células no estimuladas, FLS2 y BAK1 pueden estar presentes, como en el caso de TLR1 y TLR2 (Jin *et al.*, 2007), pero no forman un complejo fuerte. Tras la unión de flg22, el dominio LRR de FLS2 cambia su conformación, permitiéndole formar un heterodímero con BAK1 para así formar un complejo en estrecha unión. La interacción de los ectodominios de FLS2 y BAK1 también lleva a que entren en contacto los dominios de cinasa intracelulares, permitiendo así el inicio de la señalización intracelular, muy probablemente por eventos de transfosforilación (Boller y Felix, 2009).

Percepción de efectores intracelulares por proteínas NB-LRR

Los patógenos bacterianos exitosos han evolucionado contramedidas para evadir la PTI, al introducir efectores directamente al citoplasma de la planta, frecuentemente por medio de sistemas de secreción tipo tres (TTSS, por sus siglas en inglés) (Abramovitch *et al.*, 2006). Dichos efectores son típicos de patógenos individuales bien adaptados y no están presentes en los microbios en general. Por lo tanto, son estos efectores los que representan a los PAMPs en un sentido más verdadero, y son buenos blancos para la eficiente percepción de patógenos específicos por parte del hospedero. De hecho, las plantas han evolucionado sistemas de percepción para reconocer la presencia de efectores y para activar la ETI (Jones y Dangl, 2006). Los receptores vegetales involucrados en la ETI son los productos de los genes *R*, y la mayor parte de ellos se encuentran dentro de la gran familia de proteínas con sitio de unión a nucleótidos-LRR, o NB-LRR, la cual contiene 149 miembros en *Arabidopsis*. Algunos de estos receptores, como los productos de los clásicos genes *R* del lino, reconocen efectores del patógeno correspondiente, como ha sido demostrado con estudios de interacción proteína-proteína (Ellis *et al.*, 2007). Sin embargo, es más común que las NB-LRRs parezcan actuar como guardianas de

proteínas importantes del hospedero, para asegurar la presencia y función correctas de la proteína protegida. De modo que perciben alteraciones o ausencias de la proteína protegida como una señal para inducir la ETI (Jones y Dangl, 2006). El modelo de la proteína guardiana es muy similar al concepto de los DAMPs, de acuerdo al cual el daño inducido por los patógenos a las proteínas del hospedero es reconocido como un patrón molecular para activar una respuesta inmune (Lotze *et al.*, 2007).

De manera interesante, el sistema inmune innato de los mamíferos contiene una clase de proteínas estructuralmente similares, llamadas NACHT-LRRs, las cuales reconocen MAMPs y DAMPs intracelulares (Caplan *et al.*, 2008). Aunque similares en estructura y función, estas proteínas parecen haber evolucionado de manera independiente en los reinos animal y vegetal (Caplan *et al.*, 2008).

Efectores bacterianos y señalización MAMP

Las bacterias fitopatógenas generalmente usan el TTSS para introducir proteínas efectoras directamente al citoplasma de la planta. Se ha demostrado que muchos de estos efectores suprimen la PTI (Abramovitch *et al.*, 2006). AvrPto y AvrPtoB son dos receptores de *P. syringae* DC3000 sin relación de secuencia, los cuales interrumpen la señalización de flg22 un paso río arriba de la MAPK cinasa cinasa (MAPKKK), la cual se encuentra en la cima de la cascada de MAPK (He *et al.*, 2006). Debido a que el producto de *Pto* es una cinasa de proteínas, y debido a que ambos efectores se asocian físicamente con Pto (Xing *et al.*, 2007), una hipótesis plausible sería que su blanco en plantas susceptibles fuera el dominio cinasa de los PRRs. De hecho, AvrPto interactúa con FLS2 y EFR cuando es sobreexpresada en protoplastos de *Arabidopsis* (Xiang *et al.*, 2008). Sin embargo, bajo expresión más débil de AvrPto, anticuerpos contra AvrPto sólo coinmunoprecipitan a BAK1 y no a FLS2 (Shan *et al.*, 2008). De manera interesante, tanto AvrPto como AvrPtoB inhiben la interacción FLS2-BAK1 inducida por flg22, y por lo tanto parece ser que el blanco es BAK1 como un correceptor integrativo, en vez de varios PRRs diferentes. Ambos efectores también inhiben la señalización inducida por la percepción de quitina (Shan *et al.*, 2008), la cual no depende de BAK1 (Heese *et al.*, 2007). Por lo tanto, es probable que estos efectores tengan blancos adicionales, tal vez otros miembros de la familia de las cinasas receptoras de embriogénesis somática (SERK), actuando como correceptores, o una cinasa río abajo desconocida involucrada en la señalización de MAMP (Boller y Felix, 2009).

La evidencia genética demuestra directamente la importancia de la percepción de MAMPs en ciertas interacciones planta-patógeno. De modo que plantas comprometidas en la percepción de flagelina, como mutantes *fls2* de *Arabidopsis*, o *N. benthamiana* silenciada en la expresión de *FLS2*, son más susceptibles a *P. syringae* DC3000 (Hann y Rathjen, 2007). Igualmente, las mutantes *efr* son más susceptibles a la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, lo cual indica que la interacción del receptor de superficie EFR con su ligando EF-Tu, el cual normalmente reside en el citoplasma de la bacteria, juega un papel biológico en la resistencia parcial de *Arabidopsis* contra la enfermedad de la agalla de la corona (Zipfel *et al.*, 2006).

Sin embargo, es de esperar que la pérdida de un solo PRR no afecte de manera grave la viabilidad de una planta. Por ejemplo, al menos dos ecotipos de *Arabidopsis*, Ws-0 y Cvi-0, poseen genes *FLS2* no funcionales por mutaciones del codón de paro. Estos ecotipos pueden sobrevivir en un sentido evolutivo, debido a que cuentan con otros PRRs que detectan infecciones bacterianas. De hecho, los sistemas de percepción de MAMP parecen ser altamente redundantes en las plantas, en otras palabras, una clase dada de microbios es percibida a través de muchos PRRs. Por ejemplo, *Arabidopsis* puede reconocer bacterias a través de sistemas de percepción de flagelina, de EF-Tu, de lipopolisacáridos, de peptidoglucanos, y probablemente de otros MAMPs. En paralelo, los patógenos han evolucionado conjuntos de efectores para inhibir en diferentes puntos la señalización de defensa en los hospederos. Esta forma de redundancia ha hecho que sea difícil revelar la función de virulencia de los efectores (Abramovitch *et al.*, 2006). De hecho, debido a que algunos de estos efectores pueden también representar blancos para los sistemas de reconocimiento del hospedero, y activar la ETI, por muchos años fueron agrupados en la confusa categoría de factores de avirulencia (Boller y Feix, 2009).

Aunque los modelos actuales que tratan de explicar la PTI/ ETI postulan dos formas diferentes de inmunidad innata vegetal, la mayor parte de la evidencia indica que solo existe una forma. La PTI y la ETI han coexistido desde el comienzo de la evolución de las plantas con semilla. Mecanismos de percepción similares a los de PTI se encuentran presentes tanto en gimnospermas como en angiospermas, así como también los genes que codifican para NB-LRRs (McDowell y Simon, 2008). Así pues, es plausible suponer que la inmunidad innata efectiva en plantas, como ocurre con la inmunidad innata de vertebrados, sea mediada a través de un único principio global, que es la percepción de señales de peligro (Lotze *et al.*, 2007). Lo que podría ser

categorizado por un observador científico como MAMPs, DAMPs y efectores, para la planta podrían parecer como una sola y la misma señal que indica una situación de peligro. Mientras que esta fase inicial de la respuesta inmune parece no discriminar entre diferentes tipos de amenazas, puede ocurrir una modulación en base a tipos más específicos de señales en etapas posteriores de las interacciones planta-patógeno (Boller y Felix, 2009).

De hecho, los datos de expresión génica indican que existe un considerable traslape entre las respuestas de defensa inducidas por MAMPs, efectores e inductores endógenos (Wise *et al.*, 2007). Así mismo, en sus respuestas de defensa, las plantas no parecen discriminar entre MAMPs o DAMPs y efectores originados de bacterias, hongos u oomicetos. Más bien, la percepción de todos estos tipos de señales parece activar el mismo programa estereotípico de defensa, aunque con diferencias cinéticas y cuantitativas en la inducción. En este sentido, la respuesta inducida por efectores a menudo parece ser más fuerte y más duradera que la respuesta inducida por MAMPs o DAMPs (Wise *et al.*, 2007). Además, la respuesta a efectores típicamente resulta en una respuesta hipersensible, mientras que MAMPs o DAMPs normalmente no causan muerte celular. Sin embargo, esto no es una regla general ya que algunos MAMPs sí inducen una respuesta hipersensible (Takemoto *et al.*, 2005), mientras que algunos genes de resistencia proveen protección sin respuesta hipersensible (Lee *et al.*, 2006).

Para resumir, el sistema inmune innato vegetal se basa en tres pilares, y todos ellos pueden ser considerados bajo la idea del reconocimiento de patrones que representan peligro. Aún queda por dilucidar como la señalización a través de MAMPs, DAMPs endógenos y efectores, converge en una respuesta estereotípica de defensa.

1.3. El modelo de estudio y sus patógenos bacterianos

Modelo de estudio: jitomate

El jitomate cultivado (*Solanum lycopersicum* Mill.), es un cultivo que ha alcanzado gran prominencia y popularidad en los tres siglos pasados. Su versatilidad en forma fresca o procesada y su adaptabilidad, han sido factores clave en su uso rápidamente generalizado. La producción y el consumo mundial del jitomate se han incrementado dramáticamente en las últimas décadas. A pesar de la importancia nutricional del jitomate como fuente de vitaminas A y C, su consumo per cápita es aproximadamente cuatro veces más alto en países desarrollados que en los que están en vías de desarrollo. Sigue siendo un cultivo menor con un estatus de lujo en muchas áreas del mundo, y existen oportunidades substanciales para incrementar sus contribuciones a la nutrición y bienestar humanos (Tigchelaar, 1991).

El jitomate y sus parientes cercanos tienen su centro de origen en una región montañosa, estrecha y alargada, de los Andes en Perú, Ecuador y Chile. Aunado a esto, parientes distintivos del jitomate cultivado son parte de la flora nativa y única de las islas Galápagos (Rick, 1978).

La domesticación y el cultivo del jitomate fuera de su centro de origen parecen haber ocurrido primeramente en las antiguas civilizaciones de México. El nombre tomate/ jitomate viene del náhuatl y variantes de este nombre han seguido al jitomate en su distribución a lo largo del mundo. Una gran diversidad de formas cultivadas de jitomate aún pueden ser encontradas en estos primeros centros de domesticación (Tigchelaar, 1991).

Las formas cultivadas del jitomate son diploides ($2x = 2n = 24$), de autopolinización. Son plantas herbáceas perennes, cultivadas casi universalmente como cultivos anuales. Comúnmente se clasifica como un cultivo de hortaliza suave, de temporada cálida, con una temperatura media óptima de crecimiento en el rango de 21-23°C. El crecimiento y el desarrollo se detienen virtualmente a temperaturas por debajo de los 10°C (Rick, 1978).

La flor del jitomate es perfecta, con partes masculinas y femeninas funcionales. Las variedades cultivadas forman un estrecho cono de anteras protectoras que rodean al estigma, lo que conduce predominantemente a la autofecundación. Después de la polinización y la fecundación, el crecimiento del fruto ocurre a través

de división celular seguida de alargamiento celular. Varias flores (usualmente de cuatro a ocho), nacen en cada inflorescencia compuesta, y una sólo planta indeterminada puede producir, bajo condiciones de invernadero, hasta 20 o más inflorescencias sucesivas durante su ciclo de cultivo. El período de tiempo de la polinización a la madurez del fruto varía de menos de 6 semanas hasta más de 10 semanas, dependiendo de la variedad y las temperaturas. La semilla del jitomate es fisiológicamente madura cuando la madurez del fruto se ha completado (Rick, 1978).

Un fruto de jitomate consiste en 94-95% de agua; el 5-6% restante es una mezcla compleja de constituyentes predominantemente orgánicos, los cuales le dan al fruto su sabor y textura característicos. Azúcares libres y ácidos orgánicos son los determinantes principales del sabor del jitomate. Sin embargo, la textura del fruto y otros constituyentes orgánicos complejos también parecen contribuir al sabor típico del jitomate. El ambiente de crecimiento puede influenciar de manera muy marcada la tasa de crecimiento, así como el rendimiento y la calidad del fruto (Taylor, 1986).

Los esfuerzos en el mejoramiento del jitomate de las últimas décadas han resultado en cultivares adaptados para una variedad de ambientes, métodos de producción y usos alimenticios. Un aspecto principal de estos esfuerzos ha sido el desarrollo de cultivares resistentes a enfermedades del jitomate prevalentes. Los parientes silvestres del jitomate cultivado han proporcionado con frecuencia la única fuente inicial de resistencia a estas enfermedades (Tigchelaar, 1991).

Enfermedades bacterianas del jitomate

El jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una de las principales hortalizas que se cultivan en México, sin embargo, su producción se ve fuertemente amenazada año tras año por el ataque de enfermedades de origen biótico. Las enfermedades constituyen un factor limitante en la producción de jitomate en muchas partes del mundo cuando no se utilizan cultivares con resistencia a varias de ellas. Existen diversas enfermedades del jitomate con diferentes causas y etiologías, para cuyo control se utilizan cultivares resistentes, así como medidas de exclusión, erradicación y protección, en el contexto de un programa de control integrado (Jones *et al.*, 2001; Pernezny *et al.*, 2003). Existen cerca de 200 enfermedades conocidas del jitomate, de diversas causas y etiologías. El control de dichas enfermedades implica la resistencia del huésped, la exclusión, erradicación y protección en un programa de manejo

integrado de plagas. La resistencia implica el desarrollo y el uso de variedades que impidan o dificulten la actividad del patógeno y que exploten las diferencias genéticamente controladas en la susceptibilidad a la enfermedad en jitomate. Son siete las principales enfermedades bacterianas que atacan al jitomate: la mancha bacteriana, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*; la pudrición del tallo bacteriana, causada por *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; la marchitez bacteriana, causada por *Ralstonia solanacearum*; la necrosis del haz vascular del jitomate, causada por *Pseudomonas corrugata*; la mancha foliar, causada por *P. syringae* pv. *syringae*; la mancha bacteriana, causada por *P. syringae* pv. *tomato*; y el cáncer bacteriano, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Pernezny *et al.*, 2003).

A continuación se profundizará en estas tres últimas enfermedades por ser las que directamente están involucradas en el trabajo aquí presentado.

Mancha foliar por *P. syringae*

La identificación correcta de las enfermedades conocidas en conjunto como mancha foliar bacteriana de las plantas de jitomate, resulta difícil si el diagnóstico se basa solamente en los síntomas. Los síntomas tempranos de la mayoría de las manchas foliares bacterianas son la aparición de lesiones de consistencia húmeda, con áreas necróticas bien definidas, las cuales pueden o no estar rodeadas por un halo amarillo. El problema se complica por la diversidad de cultivares de jitomate y de cepas bacterianas, las cuales pueden también afectar la expresión de los síntomas. El diagnóstico correcto es crítico debido a que la mancha foliar por *P. syringae* es relativamente inocua. Por lo general, se permite que las plantas que sólo presentan mancha foliar por *P. syringae* mantengan su certificación de libres de enfermedad, mientras que las plantas con mancha bacteriana son puestas bajo cuarentena (Bonn y Gitaitis, 1987).

Los síntomas varían de pequeñas lesiones marrón sin halos, a lesiones casi negras con brillantes halos amarillos parecidos a los de la mancha bacteriana. En algunas ocasiones, el patógeno puede ser aislado de la necrosis marginal, de las áreas con marchitez extendida y de tejidos que han sufrido de aparente daño por congelación. Los síntomas son extremadamente difíciles de reproducir en invernadero. El desarrollo de la enfermedad se favorece por alta humedad y por

heridas. El desarrollo de síntomas es más severo en ciertos cultivares que en otros (Gitaitis, 1991b).

El organismo causal es *P. syringae* pv. *syringae*, una bacteria no formadora de esporas, gram negativa, aerobia y con forma de bacilo. Es fluorescente en medio King B, y es positiva para producción de levano, induce reacción hipersensible en tabaco y es negativa para oxidasa, dihidrolasa de arginina y pudrición suave de papa. Sin embargo, estas pruebas no son útiles para separarla de *P. syringae* pv. *tomato*, con la que es más comúnmente confundida. Los dos organismos pueden ser diferenciados por sus perfiles de ácidos grasos. Aunque los dos perfiles son casi idénticos, *P. syringae* pv. *syringae* contiene una cantidad importante de ácido δ -cis-9,10-metileno hexadecanoico, el cual está ausente en *P. syringae* pv. *tomato*. El uso de eritriol, sacarosa y DL-lactato como únicas fuentes de carbono por parte de *P. syringae* pv. *syringae*, la separa de *P. syringae* pv. *tomato* y de *P. viridiflava*, las cuales no utilizan todos los compuestos. La mayoría de las cepas aisladas de plantas de jitomate son activas para nucleación de hielo, lo que también puede separar a este organismo de *P. syringae* pv. *tomato*. La mayoría de las cepas recuperadas de jitomate producen syringomicina, e inducen una reacción hipersensible en el garbanzo cultivar California Blackeye #3 (Jones *et al.*, 1986).

Las únicas fuentes conocidas de inóculo son otras plantas hospederas epífitas. Las dos fuentes más comunes en los campos han sido el centeno, el cual es usado como cultivo protector, en invierno, y los árboles de cerezo silvestres que se encuentran a lo largo del borde de los campos de cultivo. Las áreas con un gran número de árboles de cerezo han tenido cada año alta incidencia de mancha foliar por *P. syringae*. *P. syringae* pv. *syringae* es un patógeno oportunista débil, encontrado frecuentemente en heridas y como organismo secundario en infecciones mezcladas con otros patógenos de mancha foliar (Gitaitis, 1991b).

Las aplicaciones débiles de bactericidas controlan adecuadamente esta enfermedad. Aunque en la mayoría de los casos no existe daño económico y no son necesarias medidas de control. Sin embargo, para asegurarse de que el problema es mancha foliar por *P. syringae* se requiere una caracterización precisa y completa del agente causal, para tomar las medidas necesarias en caso de que se trate de una enfermedad que requiera de procedimientos de control más precisos (Gitaitis, 1991b).

Mancha bacteriana

La mancha bacteriana y su agente causal fueron originalmente descritos e identificados en Taiwán y Estados Unidos en 1933. Se trata de una enfermedad cosmopolita, generalmente de baja prevalencia. La enfermedad se ve favorecida por bajas temperaturas y condiciones de alta humedad. El manchado severo en el fruto puede reducir el rendimiento de mercado. Ha habido un incremento en los reportes de esta enfermedad en las últimas décadas (McCarter *et al.*, 1983).

Los síntomas incluyen lesiones redondas de color marrón oscuro a negro en los folíolos. El halo está ausente en las etapas tempranas, pero se desarrolla con el tiempo. La lesión se extiende por toda la hoja, pero es más prominente en la superficie abaxial. Las manchas se pueden juntar, matando grandes áreas de tejido. También se ven afectados tallos, peciolo, pedúnculos, pedicelos y sépalos. Las lesiones en estas partes de la planta son de ovaladas a alargadas. En el fruto se desarrollan lesiones minúsculas o pecas, las cuales son oscuras y raramente más grandes que 1 mm de diámetro. El tejido alrededor de cada mancha puede ser de un verde más intenso que las áreas no afectadas. Las lesiones son ligeramente elevadas o planas cuando se observan por primera vez. En algunos casos las manchas pueden ser hundidas. Un halo verde oscuro se puede asociar con la mancha (Jones, 1991).

El organismo causal es *P. syringae* pv. *tomato*, el cual es un bacilo de 0.69-0.97 x 1.8-2.8 μm , estrictamente aerobio, gram negativo. La bacteria produce un pigmento verde difusible, el cual fluoresce cuando es expuesto a luz ultravioleta en medio King B. Es negativa para la reacción de oxidasa y para dihidrolasa de arginina. El organismo causa acumulación de polipectato de sodio a pH 4, es positivo para producción de levano y para actividad β -glucosidasa, utiliza D (-) tartrato pero no eritriol ni DL-lactato como únicas fuentes de carbono, y produce una reacción hipersensible cuando es infiltrado en tabaco a altas concentraciones (10^8 UFC/ ml) (McCarter *et al.*, 1983).

Esta bacteria se transmite por semilla. La importancia de la semilla para la diseminación de la bacteria es especulativa, pero podría ayudar a explicar el reciente incremento de reportes en todo el mundo. La bacteria se disemina por lluvia y por maquinaria usada en el proceso de cultivo. En un número importante de estudios, *P. syringae* pv. *tomato* sobrevivió en residuos de cultivo por un período extenso (hasta 30 semanas). Algunas especies de malezas son capaces de contener poblaciones de

la bacteria tanto en la rizosfera como en el filoplano. La supervivencia de la bacteria en suelo no tratado es de corto término (menos de 30 días). Tanto la alta humedad como las bajas temperaturas (18-24°C), favorecen el desarrollo de la mancha bacteriana (Jones, 1991).

Para controlar la enfermedad se evita plantar dos años consecutivos en el mismo campo. Se producen plantas libres de enfermedad en lugares donde la producción de jitomate es inexistente. El tratamiento de semillas debe ser un procedimiento de rutina. Se deben mantener todos los campos de producción libres de malezas. No deben colocarse pilas de desechos cerca de los campos de producción. Se deben aplicar bactericidas apropiados cuando sea recomendado (Jones, 1991).

Cáncer bacteriano

El cáncer bacteriano del jitomate es una enfermedad seria que se presenta en todo el mundo. Su presencia es esporádica, pero puede ser devastadora. El jitomate en todos los tipos de cultivo es propenso a serias pérdidas. Sin embargo, la enfermedad es especialmente severa en jitomates trasplantados o directos de semilla que han sido recortados o podados. La enfermedad se observó por primera vez en 1909 en Michigan y originalmente se le llamó la enfermedad de los Grand Rapids. Hasta 1927 se creía que la enfermedad estaba confinada al noreste de los Estados Unidos. Después de esa fecha, se presentaron numerosos reportes de su presencia en todas las regiones tomateras de los Estados Unidos, incluyendo los estados del sur y del occidente, y las áreas de mayor producción de semilla (Gitaitits, 1991a).

Una característica general de las enfermedades causadas por *Clavibacter* es la aparición de plantas asintomáticas con infecciones latentes. Dichas plantas pueden ser una fuente de reinfección o de propagación de la enfermedad, especialmente si se utilizan trasplantes (Frank, 1999).

Las semillas de tomate infectadas crecen y se desarrollan como plantas contaminadas. La propagación de la enfermedad entre plantas individuales se produce a través del agua (e.g., por salpicadura o riego), o por prácticas culturales como la poda. Las bacterias infectan las plantas hospederas a través de las raíces o heridas, a través de los estomas y otras aberturas naturales, e invaden los vasos del xilema, seguido de una infección sistémica del hospedero. En condiciones naturales, se necesita un largo período de latencia hasta que aparecen los primeros síntomas

(Strider, 1969). En el campo, el primer síntoma de infección de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* es la desecación en las puntas de los folíolos en las partes bajas de la planta joven. Por lo general, la planta se seca lentamente sin mostrar los síntomas típicos de marchitamiento. En etapas posteriores, se presenta retraso en el crecimiento, marchitamiento, decoloración vascular, desarrollo de chancros de tallo abierto y lesiones en los frutos. Manchas de ‘ojo de pájaro’, relativamente pequeñas y rodeadas por un halo blanco, se desarrollan en los frutos. Estos frutos a menudo no logran desarrollarse y caen, o maduran de manera desigual (Eichenlaub *et al.*, 2006).

El organismo causal es una bacteria aerobia, no formadora de esporas, no acidorresistente. El género bacteriano *Clavibacter* pertenece a los actinomicetos Gram-positivos (familia Microbacteriaceae) (Park *et al.*, 1993). El género *Clavibacter* consiste de una sola especie, *C. michiganensis* (Cm), que es fitopatógena y está subdividida en cinco subespecies de acuerdo con su especificidad de hospedero. *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) causa la marchitez bacteriana y cáncer del jitomate (*S. lycopersicum*), que puede ser considerada como la enfermedad bacteriana más importante del jitomate. *Clavibacter* se caracteriza por carecer de motilidad, la presencia de D- y L-diaminobutirato en la pared celular, la menaquinona MK-9, y las poliaminas espermina y espermidina (Altenburger *et al.*, 1997).

Las subespecies son altamente específicas para su planta hospedera y unas pocas especies de plantas estrechamente relacionadas. Cierta número de otras especies/géneros del mismo género o familia pueden ser infectados artificialmente. En algunas especies esto conduce al desarrollo de los síntomas de la enfermedad, pero también son comunes infecciones sin síntomas visibles de la enfermedad y ocurren incluso en las principales plantas hospederas (Eichenlaub *et al.*, 2006).

Todas las subespecies de *Clavibacter* son patógenos de plantas vasculares que causan infecciones sistémicas. Su principal hábitat es el fluido del xilema ligeramente ácido y pobre en nutrientes. Después de la infección, *Clavibacter* se disemina en los vasos del xilema. *Clavibacter* es biotrófica, y principalmente vive y se multiplica en el interior de la planta hospedera. Sólo en etapas posteriores de la infección, Cmm deja los vasos del xilema y entra en los tejidos circundantes después de la degradación de las paredes celulares de la planta, lo que conduce a maceraciones tisulares (Baer y Gudmestad, 1995). Esto parece ser causado por la producción de enzimas degradadoras de la pared celular (por ejemplo, celulasas, poligalacturonasas, xilanasas) (Beimen *et al.*, 1992). *Clavibacter* es capaz de producir algunas hormonas

vegetales. Por ejemplo, *Cmm* puede producir ácido indolacético (IAA). La vía utilizada para la producción de IAA es desconocida. También se desconoce si las fitohormonas desempeñan un papel en el desarrollo de los síntomas, como sucede en el caso del fitopatógeno relacionado *Rhodococcus fascians*. Sin embargo, la aparición de síntomas como retraso de crecimiento en *Medicago*, y otros síntomas atípicos en papa y maíz, sugieren cierta participación de ellas (Laurila *et al.*, 2003).

Las fuentes de inóculo para esta enfermedad incluyen restos vegetales en el suelo fuera de temporada, malezas hospederas, plantas voluntarias, estacas de madera contaminadas y semillas. La diseminación secundaria puede ocurrir por medio de salpicaduras de agua, equipo contaminado, y manos de trabajadores. La enfermedad también se disemina por estacas de jitomate podadas y por transplantes recortados. En las plantas de tomate en estacas, los síntomas del cáncer pueden ser obvios, primeramente, en el tallo donde el hilo ha causado una abrasión. En los transplantes recortados, el período de latencia puede ser de 3-6 semanas, lo cual crea problemas en los programas de certificación de plantas que están basados en la apariencia visual. Las plantas infectadas desde semilla pueden morir, no producir frutos o no presentar síntomas. La diseminación secundaria a menudo resulta solamente en síntomas foliares, manchas de ojo de pájaro en el fruto, o ambas. Sin embargo, la diseminación secundaria por recorte en los campos de transplante resulta en infección sistémica y muerte de la planta después de transplantada (Gitaitis, 1991a).

El limpiado de semillas y de transplantes son los controles más importantes que se pueden emplear. Las semillas deben ser probadas por un método aceptable y confiable, capaz de analizar un gran número de las mismas. Un ejemplo es el lavado de 10,000 semillas, donde la muestra concentrada se siembra en medio semiselectivo. Las colonias sospechosas por su color y características de crecimiento, pueden ser completamente identificadas rápidamente por sus perfiles de ácidos grasos y su habilidad para inducir una reacción hipersensible en hojas de clavellina (*Mirabilis jalapa*). La semilla debe ser tratada con ácido clorhídrico diluido, hipoclorito de calcio o agua caliente para asegurar su desinfección. En operaciones de invernadero, se debe usar suelo, mezcla de siembra y macetas esterilizadas. Las herramientas de poda deben ser desinfectadas entre un uso y otro. Si se van a reusar las estacas, deben ser lavadas con una solución de blanqueador al 1%. Si el cáncer bacteriano ha estado presente en un campo, las plantas de jitomate deben ser

incorporadas al suelo para fomentar la descomposición de los desechos. Se recomienda la rotación de cultivos con una planta no hospedera (Gitaitis, 1991a).

1.4. Inducción de resistencia a bacterias en cultivos por medio de ingeniería genética

Antecedentes de la resistencia a bacterias en cultivos por ingeniería genética

Las enfermedades bacterianas son de gran importancia económica para muchos cultivos. Las mayores pérdidas se presentan en cereales, verduras y frutas. En la mayoría de los casos, las aplicaciones de agroquímicos protectores, cuando son factibles, no son suficientes para controlar las enfermedades bacterianas. Más aún, el uso de químicos está sujeto cada vez a mayores restricciones debido a su impacto potencialmente dañino para el ambiente, y así, el control de las enfermedades bacterianas a menudo está limitado a la profilaxis. Sin embargo, la existencia de fuentes naturales de resistencia a enfermedades bacterianas, ha hecho posible la selección de cierto número de variedades resistentes por medio de métodos convencionales. Obviamente, la hibridación clásica está restringida a plantas de la misma especie (o de especies cercanamente relacionadas), mientras que mecanismos de resistencia potencialmente efectivos pueden existir en otras partes. Aunado a esto, puede ser difícil y muy tardado introducir resistencia de especies silvestres en cultivares comerciales. Sin embargo, las recientes mejoras en las técnicas de transformación de plantas, y los progresos en el entendimiento de las interacciones planta-patógeno, hacen posible el uso de la ingeniería genética para la creación racional de plantas resistentes a enfermedades. A diferencia de los métodos clásicos, la ingeniería genética permite la modificación o introducción de una o más características de resistencia en variedades susceptibles. Hasta la fecha, se ha dedicado menos esfuerzo a la creación de plantas transgénicas que sean resistentes a las bacterias que a los hongos (Shah, 1997).

En los pocos casos reportados de manipulación genética de plantas para conferir resistencia ante bacterias, ésta se ha conseguido siguiendo una de las siguientes cuatro estrategias:

1) Produciendo proteínas antibacterianas de origen no vegetal. Algunos ejemplos son: i) la transformación genética de tabaco con el gen de la proteína MB39 de la polilla de seda gigante, para conferirle resistencia parcial a *P. syringae* pv. *tabaci* (Huang *et al.*, 1997); ii) la transformación de papa con el gen de la lisozima del bacteriófago T4, para conferirle resistencia parcial a *Erwinia carotovora* (Düring *et al.*, 1993); iii) la transformación de tabaco con el gen de la lactoferrina humana, para

conferirle resistencia parcial a *Ralstonia solanacearum* (Mitra y Zhang, 1994); iv) la transformación de papa con el gen de la taquiplesina del cangrejo herradura, para conferirle resistencia parcial a *E. carotovora* (Allefs *et al.*, 1996); v) la transformación de papa con el gen de la lactonasa AiiA de *Bacillus*, para conferirle resistencia a *E. carotovora* (Dong *et al.*, 2001), y la transformación de tabaco con el gen del péptido antimicrobiano D4E1 de la polilla de cecropia, para conferirle resistencia a *Agrobacterium tumefaciens* y a *Xanthomonas populi* pv. *populi* (Mentag *et al.*, 2003).

2) Inhibiendo la patogenicidad bacteriana o el efecto de los factores de virulencia. Algunos ejemplos son: la transformación de tabaco con el gen de la proteína de resistencia a tabtoxina de *P. syringae* pv. *tabaci*, para conferirle resistencia a *P. syringae* (Anzai *et al.*, 1989), y la transformación de frijol con el gen de la ornitina carbamoiltransferasa de *P. syringae* pv. *phaseolicola*, para conferirle resistencia al mismo (Herrera-Estrella y Simpson, 1995).

3) Potenciando las defensas naturales de la planta. Algunos ejemplos son: i) la transformación de papa con el gen de la pectato liasa de *E. carotovora*, para conferirle resistencia parcial a este patógeno (Wegener *et al.*, 1996); ii) la transformación de papa con el gen de la glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, para conferirle resistencia parcial a *E. carotovora* (Wu *et al.*, 1995); iii) la transformación de tabaco con el gen de la tionina de cebada, para conferirle resistencia parcial a *P. syringae* pv. *tabaci* (Carmona *et al.*, 1993); iv) la transformación de arroz con el gen de la NB-LRR Xa21 de cultivares resistentes de arroz, para conferirle resistencia a *X. oryzae* pv. *oryzae* (Wang *et al.*, 2007); v) la transformación de jitomate con el gen de la proteína NB-LRR Pto de *Solanum pimpinellifolium*, para conferirle resistencia a *P. syringae* pv. *tomato* (Tang *et al.*, 1999), y la transformación de *A. thaliana* con el gen de la proteína NB-LRR NPR1 de *A. thaliana*, para conferirle resistencia a *P. syringae* (Cao *et al.*, 1998).

4) Induciendo artificialmente la muerte celular programada en el sitio de infección. Un ejemplo es la transformación de tabaco con el gen de la bacterio-opsina de *Halobacterium halobium*, para conferirle resistencia a *P. syringae* pv. *tabaci* (Mittler *et al.*, 1995).

Uso de casetes multigénicos en ingeniería genética

La ingeniería genética de plantas de cultivo se ha convertido en una estrategia importante para incrementar la producción agrícola y, al mismo tiempo, minimizar el

uso de químicos y el impacto ambiental. Los enfoques actuales, típicamente implican la manipulación de rasgos sencillos que sólo requieren una proteína transgénica. Sin embargo, conforme se va intentando experimentar con rasgos más complejos, son esenciales métodos que introduzcan múltiples proteínas fácilmente. Algunos ejemplos actuales, incluyen el uso de plantas para producir anticuerpos expresando tanto la cadena pesada como la ligera (Stoger *et al.*, 2002), la generación de plantas con resistencia tanto a herbicidas como a insectos (Wenzel, 2006), y la manipulación de toda la ruta enzimática necesaria para la síntesis de vitamina A (Ye *et al.*, 2000) o de plásticos biodegradables (Nawrath *et al.*, 1994).

Aunque la expresión de una proteína en plantas de cultivo es algo relativamente sencillo, la expresión coordinada de múltiples proteínas a menudo es difícil por varias razones. Típicamente, introducir cada gen requiere de varias rondas individuales de transformación, una práctica que es costosa y a menudo está limitada en muchos cultivos por el reducido número de marcadores de selección aceptables. Posteriormente, la expresión balanceada se puede lograr llevando a cabo un tamizado de los transformantes individuales para cada gen, para identificar aquellos con niveles de expresión de proteínas comparables, y cruzando las plantas para generar líneas que expresen los niveles correctos de ambos. Desafortunadamente, mantener el rasgo complejo en subsecuentes proyectos de reproducción es un gran reto debido a la segregación independiente de cada locus (Walker y Vierstra, 2007).

Es obvio que se necesitan nuevos enfoques para expresar más de una proteína transgénica en plantas. Un enfoque promisorio es el uso de vectores basados en ubiquitina para expresar dos o más proteínas (Hondred *et al.*, 1999). Su potencial se deriva del hecho de que la ubiquitina es sintetizada naturalmente como una fusión de proteína, ya sea como una poliubiquitina, o como una ubiquitina unida al extremo N de una proteína no relacionada (Smalle y Vierstra, 2004). Después de la traducción, las fusiones son procesadas rápidamente y de manera precisa *in vivo* por enzimas desubiquitinizantes (DUBs), las que liberan monómeros de ubiquitina de 76 aminoácidos y la proteína fusionada en forma libre y funcional (Wilkinson, 2000). Las DUBs son específicas de ubiquitina y removerán casi cualquier polipéptido que esté unido al extremo C de la ubiquitina, la excepción siendo las extensiones que llevan prolina como primer residuo libre. Utilizando las DUBs, se ha logrado expresar una variedad de proteínas transgénicamente como fusiones de ubiquitina, incluyendo aquellas cuyos residuos del extremo N no son metionina (Hondred *et al.*, 1999).

Dadas las necesidades actuales y futuras de manipular rasgos complejos en plantas, el desarrollo de estrategias para expresar múltiples proteínas de manera coordinada y estequiométrica es altamente beneficioso. La aplicación de vectores policistronicos que expresen dos o más proteínas a partir de un solo ARN mensajero es particularmente ventajosa, ya que minimiza el número de loci distribuidos independientemente, mejora los patrones de expresión coordinada, reduce las complicaciones del silenciamiento génico para loci individuales, y reduce los pasos de transformación necesarios para manipular el genotipo deseado (de Felipe *et al.*, 2006).

La ingeniería genética de rasgos complejos en plantas de cultivo requiere, en última instancia, de estrategias para coexpresar más de una proteína al mismo tiempo.

1.5. Particularidades, innovaciones e hipótesis

Este proyecto presenta algunas innovaciones en aspectos muy relevantes del proceso de defensa contra patógenos en plantas, las cuales lo hacen un trabajo original. A continuación se mencionan algunas de dichas innovaciones y la importancia y repercusiones que tienen cada una de ellas.

- 1) El uso de MAMPs en vez del producto de genes *R* para generar la resistencia contra bacterias. Tradicionalmente se ha optado por usar los productos de genes *R* para generar resistencia en las plantas. Esto ha sido así porque, antiguamente, se consideraba a los genes *R* como genes de resistencia cuyo producto generaba resistencia ante microbios que poseían lo que antes se conocía como genes de avirulencia. Actualmente se sabe que los genes de avirulencia codifican, en realidad, para efectores cuya función es evadir el reconocimiento del patógeno por parte de la planta, y que los genes *R* codifican para receptores que reconocen a dichos efectores. El problema es que estos efectores son específicos de razas o patovares concretos, y que al no codificar para proteínas que sean esenciales para la supervivencia del microbio, son fácilmente desechados o mutados por los mismos, evadiendo así la resistencia generada por la expresión de los genes *R*. El optar por el uso de MAMPs evita estos problemas, ya que los MAMPs están presentes no en patovares concretos sino en todo un amplio grupo de microbios, y al ser proteínas esenciales para la vida de los mismos, no se pueden deshacer fácilmente de ellos para evadir la resistencia de la planta.
- 2) El transformar no solamente con un gen codificante de PRR. Al transformar las plantas con dos genes codificantes de PRRs se les provee de la capacidad para reconocer a un mayor número de patógenos bacterianos, además de que al estar involucrados más genes en la resistencia, es más difícil que esta pueda ser revertida por los patógenos.
- 3) El sobreexpresar el correceptor BAK1. Aunque las plantas de jitomate cuentan con un ortólogo de BAK1, la sobreexpresión del mismo en las plantas transgénicas también es importante, ya que se ha demostrado que dicha proteína es el blanco al cual atacan algunos efectores bacterianos, tales como

AvrPto/AvrPtoB de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, para eludir la inmunidad innata.

- 4) El transformar con un casete multigénico. El transformar con un casete de locus sencillo, que contiene los dos genes de PRRs y el gen del correceptor BAK1, separados uno de otro por monómeros de ubiquitina, y bajo el control de un mismo promotor, ofrece ventajas sobre la opción de cotransformaciones independientes. Por un lado, al usar monómeros de ubiquitina se facilita el procesamiento de las proteínas, ya que se usan proteasas endógenas. Por otro lado, al estar controladas por un mismo promotor, se promueve la expresión a niveles similares de todas las proteínas incluidas en el casete y se disminuye el riesgo de silenciamiento postraducciona. Por último, al estar dentro de un solo casete, se evitan los problemas de deriva génica que podrían distribuir de manera independiente a los diferentes genes en subsiguientes generaciones.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Generar resistencia antibacteriana en plantas de *S. lycopersicum*, mediante la transformación genética con los genes heterólogos de *Arabidopsis thaliana* *EFR*, *BAK1* y *FLS2*, codificantes de PRRs involucrados en la inmunidad innata vegetal.

Objetivos particulares

1. Aislar y clonar los genes *EFR*, *FLS2* y *BAK1* a partir de *A. thaliana* y generar la construcción *EFR-UB-BAK1-UB-FLS2*.
2. Generar plantas de *S. lycopersicum* que lleven la construcción *EFR-UB-BAK1-UB-FLS2*, vía *A. tumefaciens*.
3. Comprobar la integración de los transgenes en el genoma de las plantas mediante pruebas histoquímicas y moleculares (GUS, PCR, RT-PCR).
4. Demostrar la resistencia antibacteriana en las plantas transgénicas por medio de ensayos de inoculación con bacterias fitopatógenas.

III. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES

Material vegetal

Se emplearon semillas de jitomate (*S. lycopersicum*, L.) cultivar TA234 donadas por Steve Tanksley de la Universidad de Cornell. Se ha reportado que dicha variedad presenta una de las más altas tasas de transformación y regeneración comparada con otras líneas experimentales (Fillatti *et al.*, 1987). Las semillas fueron conservadas a 4°C hasta su utilización.

Origen de los elementos componentes del vector empleado

Para la transformación de las plantas de jitomate en el presente trabajo, se utilizó un vector construido a partir de los siguientes materiales (los pasos seguidos para la construcción del vector se detallan en la sección de resultados):

- Vector LJMS (**figura 1**): Se trata de un vector para expresión en plantas, con una versión potenciada del promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor. Fue creado en nuestro laboratorio a partir del plásmido pCAMBIA-2301.
- Gen *EFR*: Gen que codifica para el receptor (PRR) del factor de elongación Tu bacteriano (EF-Tu). Aislado a partir de una biblioteca de cADN de *A. thaliana* ecotipo Columbia, donada por el Dr. Stefan de Folter.
- Gen *FLS2*: Gen que codifica para el receptor (PRR) de la flagelina bacteriana. Aislado a partir de una biblioteca de cADN referida anteriormente.
- Gen *BAK1*: Gen que codifica para la proteína BAK1, la cual funciona como correceptor de los receptores EFR y FLS2. Aislado a partir de la biblioteca de cADN referida anteriormente.
- Enlazador *EFR-UB-BAK1*: Monómero de ubiquitina de *N. tabacum*. La porción terminal del gen *EFR* y la porción inicial del gen *BAK1* se encuentran adjuntas a ambos extremos del monómero de ubiquitina, esto para permitir su ligación entre los dos genes mencionados. Este enlazador fue sintetizado por la casa comercial Sigma-Aldrich.
- Enlazador *BAK1-UB-FLS2*: Monómero de ubiquitina de *N. tabacum*. La porción terminal del gen *BAK1* y la porción inicial del gen *FLS2* se encuentran adjuntas

a ambos extremos del monómero de ubiquitina, esto para permitir su ligación entre los dos genes mencionados. Este enlazador fue sintetizado por la casa comercial Sigma-Aldrich.

Los genes aislados a partir del cADN de *A. thaliana* se amplificaron por PCR usando los siguientes oligonucleótidos: *EFR*: 5'-ATCGGGTACCATGAAAGCTGTCCTTTT CACTTG-3' y 5'-ATCGGCATGCCATAGTATGCATGTCCGTATTTAAC-3'; *FLS2*: 5'-ACTGGICGACATGAAGTTACTCTCAAAGAC-3' y 5'-ATCGGGATCCAACTTCTCGATCCTCGTTA CG-3'; *BAK1*: 5'-ACTGTCTAGAAATGGAACGAAGATTAATGATC-3' y 5'-ATCGCTCGAGTCT TGGACCCGAGGGGTATTC-3', en donde los nucleótidos subrayados indican sitios de restricción añadidos para el subsecuente clonado de los genes. Las condiciones de amplificación por PCR que se emplearon fueron: 1 ciclo a 95°C durante 2 min, seguido de 25 ciclos a 95°C por 45 s, 58°C por 45 s, 55°C por 30 s y 72°C por 90 s. Finalmente un ciclo de 72°C por 5 min. Los productos de la amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 1.0% teñidos con bromuro de etidio.

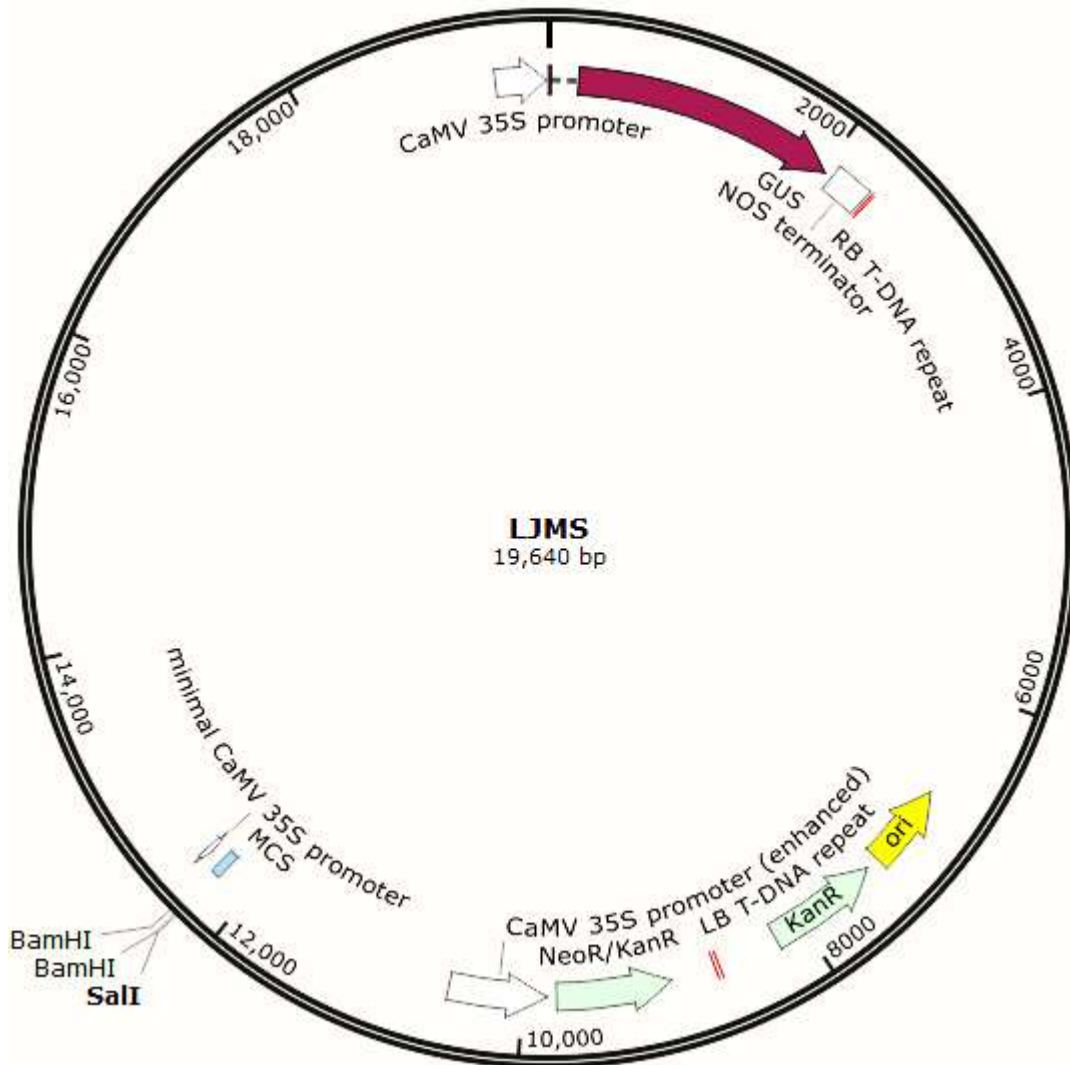


Figura 1. Vector LIMS. Mapa del vector LIMS, el cual es un vector de alta expresión en plantas que fue construido en nuestro laboratorio a partir del vector pCAMBIA-2301. CaMV 35S promoter: promotor constitutivo 35S del virus del mosaico de la coliflor; GUS: gen de la β-glucuronidasa; NOS terminator: terminador y señal poli(A) de la nopalina sintasa; RB T-DNA repeat: borde derecho del T-DNA del plásmido C58 de nopalina; ori: origen de replicación de alto número de copias; KanR: gen de la aminoglucósido fosfotransferasa, confiere resistencia a kanamicina; LB T-DNA repeat: borde izquierdo del T-DNA del plásmido C58 de nopalina; NeoR/ KanR: gen de la aminoglucósido fosfotransferasa del transposón Tn5, confiere resistencia a kanamicina; CaMV 35S promoter (enhanced): promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor con una región potenciadora duplicada; MCS: sitio de clonación múltiple del plásmido pUC18/ 19; minimal CaMV 35S promoter: promotor 35S mínimo del virus del mosaico de la coliflor.

Transformación de bacterias

E. coli. Se empleó la cepa DH5 α , la cual fue transformada por electroporación (Sambrook *et al.*, 2002), en el sistema Micro Pulser de Bio-Rad siguiendo las instrucciones del fabricante.

A. tumefaciens. Se empleó la cepa LBA-4404, la cual también fue transformada por electroporación. La preparación de células electrocompetentes y el protocolo de electroporación fue el reportado por Jhy-Jhu (1994). Las condiciones de electroporación y los tipos de celda empleados fueron las descritas en el manual del electoporador (Bio-Rad).

Transformación de plantas de jitomate

La metodología que se siguió para la transformación genética de jitomate fue la que ya se tiene bien estandarizada en el laboratorio y que ha demostrado ser efectiva en repetidas ocasiones (Gutiérrez-Ortega *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2007; Carrillo-Landell *et al.*, 2008; De la Rosa *et al.*, 2009).

Ensayo histoquímico de la β -glucuronidasa (GUS)

Para los ensayos de GUS con la β -glucuronidasa, los tejidos fueron heridos varias veces en ambas caras con una aguja de jeringa de 1 mL, posteriormente fueron incubados en buffer de X-gluc (fosfato de sodio 100 mM pH 7.0, tritón X-100 0.1%, ácido ascórbico 50 mM y 5-bromo-4-cloro-3-indolil β - δ -glucuronido (X-gluc) 1 mM). Las muestras fueron incubadas toda la noche a 37°C en la oscuridad. Posteriormente fueron clareadas, lavando en varias ocasiones con una solución de acetona: metanol 1: 3 vol/ vol, y preservadas en glicerol al 50%. Los ensayos de GUS se llevaron a cabo en plantas de las generaciones F1-F4 de las líneas transgénicas generadas.

Extracción de ADN total para PCR y amplificación

El ADN genómico para PCR se extrajo de hojas jóvenes, utilizando el reactivo Plant DNAzol (Invitrogen), y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Se llevó a cabo PCR en dichos ADN genómicos, usando los mismos oligonucleótidos que

empleamos para amplificar los genes *EFR*, *BAK1* y *FLS2* de la biblioteca de cADN de *A. thaliana*. Las condiciones de amplificación por PCR que se emplearon fueron: 1 ciclo a 95°C durante 5 min, seguido de 30 ciclos a 95°C por 45 s, 55°C por 90 s y 72°C por 160 s. Finalmente, un ciclo de 72°C por 10 min. Los productos de la amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 1.0%, teñidos con bromuro de etidio.

Los tamaños que se esperaban obtener de la amplificación correspondieron a los de los genes íntegros, es decir: 3,093 pb, para *EFR*; 1,845 pb, para *BAK1*, y 3,519 pb, para *FLS2*.

Extracción de ARN total para RT-PCR y amplificación

Se extrajo ARN total de hojas jóvenes, usando el reactivo PureLink Plant RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific), y se sintetizó cADN a partir del ARN extraído, utilizando la enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). La PCR por transcripción inversa (RT-PCR), fue llevada a cabo en el cADN usando los siguientes oligonucleótidos: *EFR*: 5'-GGCGATTATAACCTCCACAG-3' y 5'-TACTGCTTCATCCGTTCTCA-3'; *FLS2*: 5'-ACGCCTCTGATCTAATGGG-3' y 5'-GGATGACTCTGGTTCTCTTCG-3'; *BAK1*: 5'-TGACGCTACAAGTTCTGGAT-3' y 5'-ATGGCGGTGTAGGAGAGATA-3'; *EF- α* 5'-TACTG GTGGTTTTGAAGCTG-3' y 5'-AACTTCCTTCACGATTCATCATA-3'. Las condiciones de amplificación por PCR que se emplearon fueron: 1 ciclo a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 45 s, 55°C por 45 s y 72°C por 30 s. Finalmente, un ciclo de 72°C por 10 min. Los productos de la amplificación fueron analizados en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio.

Los tamaños que se esperaban obtener de los fragmentos amplificados son los siguientes: 162 pb, para *EFR*; 156 pb, para *BAK1*; 111 pb, para *FLS2*, y 246 pb para *EF- α* .

Preparación de los inóculos e inoculación de las plantas

Para los ensayos de los retos con patógenos bacterianos, se tomaron semillas de la F1 a la F4 de las líneas transgénicas generadas, se germinaron, y se crecieron a razón de una planta por maceta a 22°C, con un fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad.

Se utilizaron dos patovares de *Pseudomonas*: *P. syringae* pv. *syringae* B728a (donada por el Dr. José Abel López Buenfil del cepario del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria -Senasica-, SAGARPA), y *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (donada por el Dr. John Delano Frier del Cinvestav Irapuato). Ambas bacterias fueron crecidas en medio manitol glutamato (MG) líquido (manitol 10 g/ L, ácido L-glutámico 2 g/ L, KH_2PO_4 0.5 g/ L, NaCl 0.2 g/ L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/ L, pH 7.0), a 28°C. Se tomaron 30 μL del cultivo, se sembraron en medio MG con agar, y se dejaron incubando a 28°C toda la noche. Posteriormente, se tomaron las cajas Petri con los cultivos, y se añadieron 2 mL de buffer de fosfato estéril (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH 7.4), para resuspender la bacteria. La bacteria resuspendida se pasó a un tubo Falcon de 50 mL, y se ajustó a 1×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC)/ mL ($\text{DO}_{600} = 0.0002$), en PBS. Para la inoculación, se utilizaron plantas de jitomate de tres semanas de edad, con tres a cuatro hojas verdaderas. Las suspensiones bacterianas se infiltraron en las hojas con una jeringa hipodérmica sin aguja. Como control, se inocularon plantas de la misma manera pero con PBS en lugar de la suspensión bacteriana. En los días 2, 4, 6, 8 y 10 después de la infección, se monitoreó el crecimiento bacteriano dentro del tejido foliar cortando foliolos infiltrados, y desinfectándolos superficialmente con agua destilada estéril y etanol al 70%. Posteriormente se cortaron seis discos foliares (de 0.6 cm^2 de diámetro), por muestra, se pesaron dentro de un tubo de 1.5 mL, y se homogenizó el tejido con 2 volúmenes de PBS. A partir del tejido homogenizado se hicieron 8 diluciones seriales 1: 10, y se sembraron 10 mL de cada dilución en medio King B (KB) (peptona 20 g/ L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/ L, K_2HPO_4 1.5 g/ L, glicerina 15 mL/ L, pH 7.2), con 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido nalidíxico a 28°C, toda la noche, para posteriormente determinar el número de UFC/ mL. Cada experimento se repitió tres veces, de manera independiente, en cada generación de plantas.

Para el caso de *Clavibacter*, se utilizó la cepa *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, donada por la Dra. Laila Partida Martínez del Cinvestav Irapuato. La preparación de los cultivos bacterianos y las inoculaciones, se llevaron a cabo como lo describen Louws *et al.* (1998). La bacteria se creció en medio de caldo nutritivo y extracto de levadura (NBY) líquido (caldo nutritivo 8 g/ L, extracto de levadura 2 g/ L, K_2HPO_4 2 g/ L, KH_2PO_4 0.5 g/ L, glucosa 5 g/ L, pH 7.0), a 27°C por 48 h. Del cultivo se tomaron 30 μL y se sembraron en NBY con agar, a 27°C durante 48 a 72 h, hasta que se observó la presencia de crecimiento bacteriano. Se tomó la caja Petri con el cultivo bacteriano, y se le añadieron 2 mL de PBS para resuspender la bacteria. Se tomó 1 mL

de la suspensión bacteriana, se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL, y se ajustó con PBS a 2×10^8 UFC/ mL ($DO_{600} = 0.16$). Para la inoculación, se utilizaron plantas de jitomate de tres semanas de edad con tres a cuatro hojas verdaderas. Para inocularlas, se inyectaron 20 μ L de la suspensión bacteriana en el tallo de la planta, entre los dos cotiledones, y se cortó el pecíolo de la primera hoja verdadera con una navaja humedecida en la suspensión bacteriana. Como control, se inocularon plantas de la misma manera pero con PBS en lugar de la suspensión bacteriana. En los días 20, 25, 30, 35 y 40 después de la infección, se monitoreó el crecimiento bacteriano dentro del tejido vegetal, cortando un segmento de tallo de 1 cm de longitud, a una altura de 10 cm por arriba del sitio de inoculación. Cada segmento de tallo se pesó en un tubo de 1.5 mL, y se homogenizó en dos volúmenes de PBS. La suspensión resultante se sometió a 8 diluciones seriales 1: 10, de cada dilución se sembraron 10 μ L en NBY sin glucosa a 28°C por 3 días, para posteriormente determinar el número de UFC/ mL. Cada experimento se repitió tres veces, de manera independiente, en cada generación de plantas.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo una prueba t de Student, tomando en cuenta el número de UFC formadas por los patógenos bacterianos en cada línea transgénica, a los diferentes días de medición.

IV. RESULTADOS

IV.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y AISLAMIENTO DE LOS GENES *EFR*, *BAK1* Y *FLS2*

Como la intención de este proyecto era transferir a plantas de jitomate, la capacidad de reconocimiento de bacterias que le confieren los genes *EFR*, *BAK1* y *FLS2* a *A. thaliana*, lo primero que se hizo fue buscar la secuencia de dichos genes en la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). A partir de la secuencia de cada gen, se diseñaron oligonucleótidos que hibridaran con los extremos 5' y 3', añadiéndole a cada oligonucleótido una secuencia para crear un sitio de restricción, el cual serviría para clonar los genes en las etapas subsiguientes de la construcción del casete. En la **figura 2** se muestran el mapa de los tres genes con los sitios de restricción añadidos al inicio y al final de cada uno, además de algunos otros sitios de restricción importantes para la construcción del casete.

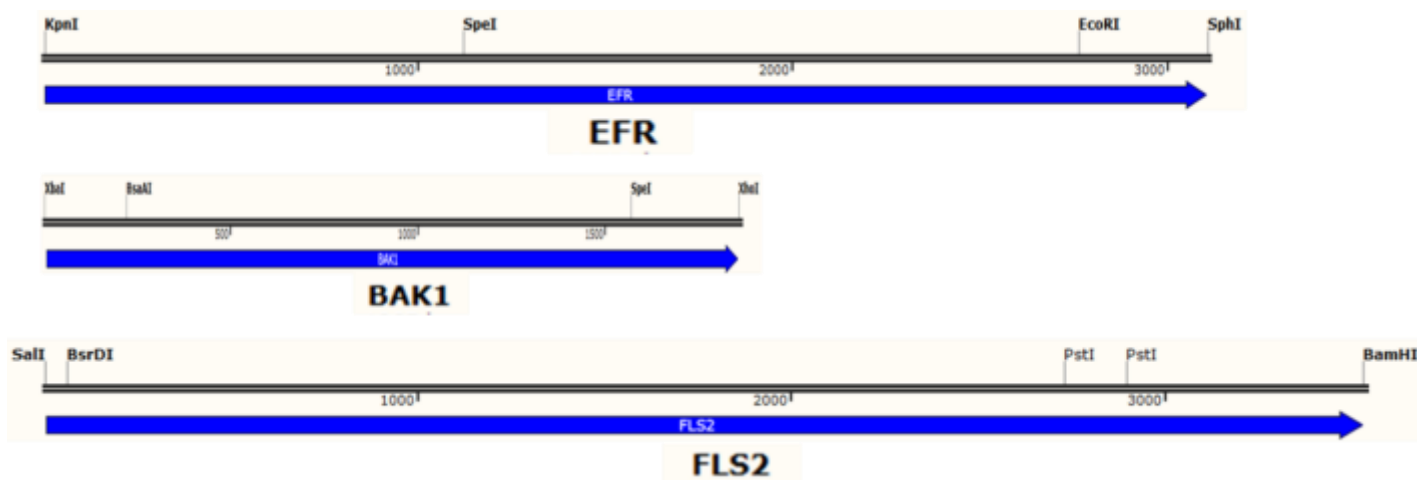


Figura 2. Mapa de los genes *EFR*, *BAK1* y *FLS2*. La figura superior corresponde al gen *EFR*, el cual consta de 3,093 pares de bases; se señalan los sitios *KpnI* y *SphI*, añadidos en los extremos del gen para su clonación, así como los sitios *EcoRI* y *SpeI*, los cuales fueron importantes durante la construcción del casete. La figura del medio corresponde al gen *BAK1*, el cual consta de 1,845 pares de bases; se señalan los sitios *XbaI* y *XhoI*, añadidos en los extremos del gen para su clonación, así como los sitios *BsaAI* y *SpeI*, los cuales fueron importantes durante la construcción del casete. La figura inferior corresponde al gen *FLS2*, el cual consta de 3,519 pares de bases; se señalan los sitios *Sall* y *BamHI*, añadidos en los extremos del gen para su clonación; así como los sitios *BsrDI* y *PstI*, los cuales fueron importantes durante la construcción del casete.

Con los oligonucleótidos sintetizados, se llevó a cabo una PCR sobre una muestra de cADN de *A. thaliana* y de esta manera se lograron aislar y amplificar los tres genes. La banda amplificada en el caso del gen *BAK1* fue suficientemente intensa. Sin embargo, para los genes *EFR* y *FLS2*, las bandas amplificadas fueron tenues (**figura 3**, panel izquierdo). Por este motivo, se decidió recuperar y purificar el ADN de dichas bandas y hacer una segunda PCR usando como molde dicho ADN. De esta manera se logró obtener bandas intensas para los tres genes de interés (**figura 3**, panel derecho). Esto permitió tener suficiente material para llevar a cabo los siguientes pasos en la construcción del casete.

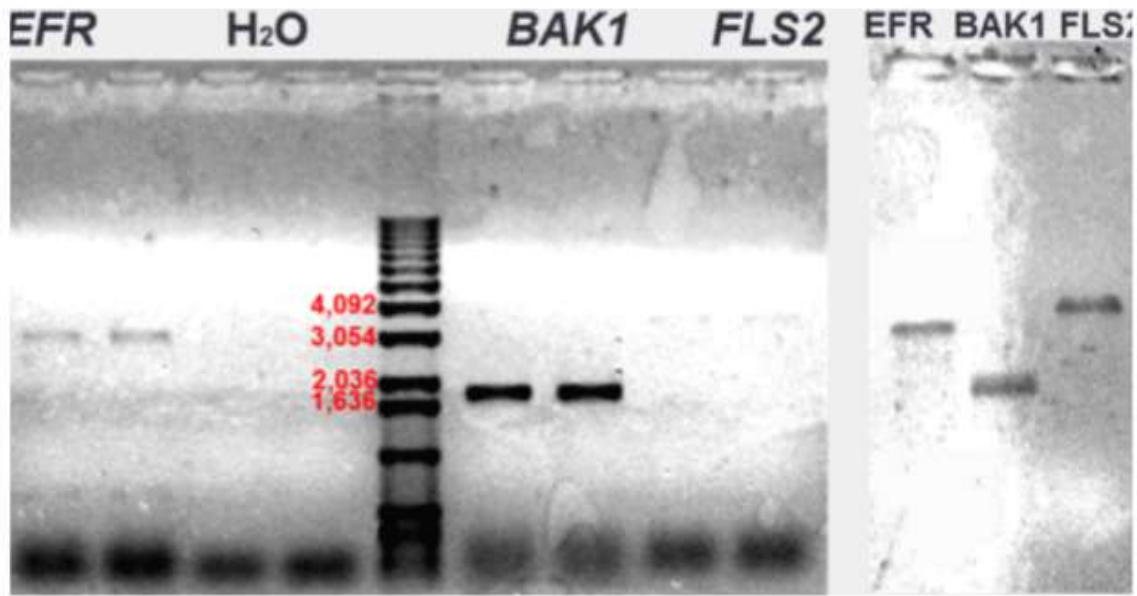


Figura 3. Amplificación de los genes *EFR*, *BAK1* y *FLS2*. A partir de una muestra de cADN de *Arabidopsis thaliana*, y utilizando los oligonucleótidos diseñados específicamente para cada gen, se logró el aislamiento de los tres genes por medio de PCR. En el panel de la izquierda se cargó cada gen por duplicado, en el carril central se corrió el marcador de peso molecular, se indican los pesos moleculares de las bandas cercanas a los pesos de los genes amplificados. En el panel de la derecha se muestran las bandas obtenidas tras la reamplificación de los genes, a partir del ADN amplificado y recuperado previamente.

IV.2. CLONACIÓN DE LOS GENES *EFR*, *BAK1* Y *FLS2* EN CÉLULAS DE *E. coli*

Se recuperó el ADN correspondiente a cada uno de los tres genes, y se utilizó para su clonación en los vectores. Los genes *BAK1* y *FLS2* se clonaron de manera independiente en el vector pBlueScript SK (+), utilizando los sitios *Xba*I y *Xho*I para el caso de *BAK1* (**figura 4**), y los sitios *Sal*I y *Bam*HI para el caso de *FLS2* (**figura 4**). Ambos vectores, conteniendo cada uno de los dos genes, fueron introducidos en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α mediante electroporación. También se intentó la clonación del gen *EFR* dentro del vector pBlueScript SK (+). Sin embargo, ésta no se logró tras varios intentos. Se buscó entonces otra estrategia para clonar este gen, y se optó por utilizar el sistema CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas), el cual permite clonar directamente un producto de PCR en el sitio *Eco*RV dentro del vector pJET1.2. De esta manera, se logró clonar el gen *EFR* (**figura 4**), y al igual que con los otros dos genes, el vector conteniendo al gen fue introducido en células de *E. coli* DH5 α mediante electroporación.



Figura 4. Genes *BAK1*, *FLS2* y *EFR* clonados en *E. coli*. Los tres genes fueron clonados en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α . En el caso de los genes *BAK1* y *FLS2*, éstos fueron clonados en el vector pBlueScript SK (+); en el caso de *EFR*, el gen fue clonado en el vector pJET1.2.

IV.3. CONSTRUCCIÓN DEL CASETE UTILIZADO EN LA TRANSFORMACIÓN DE PLANTAS

Una vez que se tuvieron los tres genes clonados en *E. coli*, se realizó la construcción del casete, para lo cual se sintetizaron dos enlazadores, uno que uniera al gen *EFR* con el gen *BAK1*, y otro que uniera al gen *BAK1* con el gen *FLS2*. Cada enlazador contenía la secuencia de un monómero de ubiquitina de tabaco, el cual está constituido por 228 pares de bases (pb), flanqueado por el extremo final de uno de los genes que iba a unir y el extremo inicial del otro gen. Así pues, el enlazador que serviría para unir los genes *EFR* y *BAK1*, estaba formado por la porción terminal de 341 pb del gen *EFR* a partir del sitio *EcoRI*, el monómero de ubiquitina de 228 pb, y el fragmento inicial de 217 pb del gen *BAK1* hasta el sitio *BsaAI*, dando un total de 786 pb (**figura 5**). Por su parte, el enlazador que serviría para unir los genes *BAK1* y *FLS2*, estaba formado por la porción terminal de 286 pb de *BAK1* a partir del sitio *SpeI*, el monómero de ubiquitina de 228 pb, y el fragmento inicial de 62 pb de *FLS2* hasta el sitio *BsrDI*, dando un total de 576 pb (**figura 5**).

Ambos enlazadores fueron proporcionados por la empresa que los sintetizó, clonados en el sitio *EcoRV* del vector comercial pUC57 (**figura 5**).

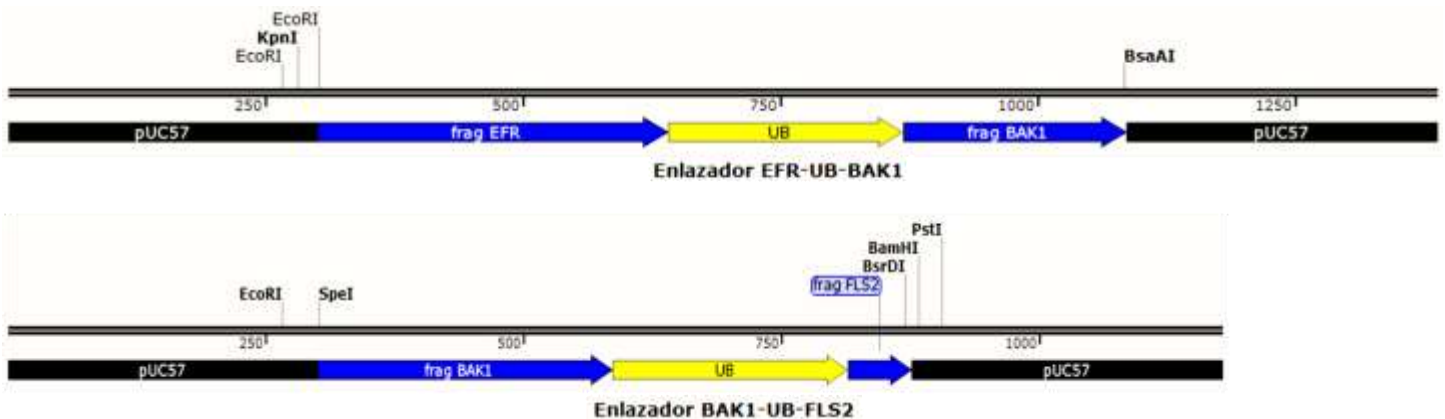


Figura 5. Enlazadores génicos. Segmentos de ADN sintetizados para facilitar la ligación de los genes *EFR*, *BAK1* y *FLS2*. Cada enlazador está conformado por la porción final de uno de los genes, un monómero de ubiquitina de tabaco (UB), y el fragmento inicial del segundo gen a unir.

La primera estrategia que se siguió para intentar la construcción del casete completo, fue la de ligar todos los fragmentos en un solo paso dentro del vector

pUC57, para posteriormente transferir el casete completo al vector de expresión en plantas LIMS. En la **tabla 1** se muestran los detalles de los fragmentos que se intentaron ligar con esta primera estrategia.

Tabla 1. Detalles de la primera estrategia que se siguió para la construcción del casete. Se intentó ligar todos los fragmentos en un solo paso, usando a pUC57 como vector. El tamaño total del casete sería de 8,931 pb, que sumados a las 2,687 pb del pUC57, daban un total de 11,618 pb.

Elemento del casete	Enzimas usadas para su digestión	Tamaño del fragmento obtenido (pb)
Vector pUC57	<i>Bam</i> HI <i>Kpn</i> I	2,687
pJET1.2/ <i>EFR</i>	<i>Kpn</i> I <i>Eco</i> RI	2,760
pUC57/ enlazador <i>EFR-UB-BAK1</i>	<i>Eco</i> RI <i>Bsa</i> AI	782
pBlueScript SK (+)/ <i>BAK1</i>	<i>Bsa</i> AI <i>Spe</i> I	1,350
pUC57/enlazador <i>BAK1-UB-FLS2</i>	<i>Spe</i> I <i>Bsr</i> DI	569
pBlueScript SK (+)/ <i>FLS2</i>	<i>Bsr</i> DI <i>Bam</i> HI	3,470
		Total: 11,618

No se tuvo éxito. Al momento de electroporar la reacción de ligación crecían muchísimas colonias que, al ser analizadas, solamente contenían al vector pUC57 religado. Teniendo en cuenta estos resultados se optó por intentar una nueva estrategia.

Viendo que el problema probablemente era la religación del vector, en la segunda estrategia se intentó ligar nuevamente los cinco fragmentos en un solo paso, pero usando en esta ocasión al plásmido pBlueScript SK (+) como vector de clonación. En la **tabla 2** se muestran los detalles de los fragmentos que se intentaron ligar con esta segunda estrategia.

Tabla 2. Detalles de la segunda estrategia que se siguió para la construcción del casete. Se intentó ligar todos los fragmentos en un solo paso, usando a pBlueScript SK (+) como vector. El tamaño total del casete sería de 8,931 pb, que sumados a las 2,896 pb del pBlueScript SK (+), daban un total de 11,827 pb.

Elemento del casete	Enzimas usadas para su digestión	Tamaño del fragmento obtenido (pb)
Vector pBlueScript SK (+)	<i>Bam</i> HI <i>Kpn</i> I	2,896
pJET1.2/ <i>EFR</i>	<i>Kpn</i> I <i>Eco</i> RI	2,760
pUC57/ enlazador <i>EFR-UB-BAK1</i>	<i>Eco</i> RI <i>Bsa</i> AI	782
pBlueScript SK (+)/ <i>BAK1</i>	<i>Bsa</i> AI <i>Spe</i> I	1,350
pUC57/enlazador <i>BAK1-UB-FLS2</i>	<i>Spe</i> I <i>Bsr</i> DI	569
pBlueScript SK (+)/ <i>FLS2</i>	<i>Bsr</i> DI <i>Bam</i> HI	3,470
		Total: 11,827

Con esta segunda estrategia se obtuvieron los mismos resultados negativos que se habían obtenido con el vector pUC57. Al parecer, el plásmido pBlueScript SK (+) también se estaba religando, lo cual impedía que se llevara a cabo exitosamente la ligación de los 6 fragmentos.

Teniendo en cuenta estos resultados negativos, se abandonó la estrategia de hacer la construcción del casete ligando todos los fragmentos en un solo paso, y se optó por una nueva estrategia. En esta ocasión se intentó ligar, por un lado al gen *BAK1* con el enlazador *EFR-UB-BAK1* dentro del vector pBlueScript SK (+), y por el otro, al gen *FLS2* con el enlazador *BAK1-UB-FLS2* dentro del vector pBlueScript SK (+), para posteriormente intentar añadir al gen *EFR* al casete.

El plásmido pBlueScript SK (+)-*BAK1* (**figura 4**), fue digerido con *Bsa*A1 y *Xho*I para liberar un fragmento de 1,632 pb, que va del punto de unión con el enlazador hasta el final del gen *BAK1*; el plásmido pUC57-enlazador *EFR-UB-BAK1* (EUB) (**figura**

5), fue digerido con *Bsa*AI y *Kpn*I para liberar un fragmento de 1,386 pb, que incluye la totalidad del enlazador EUB más un pequeño fragmento de 20 pb del vector pUC57. Ambos fragmentos se ligaron y se clonaron entre los sitios *Kpn*I y *Xho*I del vector pBlueScript SK (+), dando como resultado el plásmido pBlueScript SK (+)-enlazador EUB-BAK1 (figura 6).

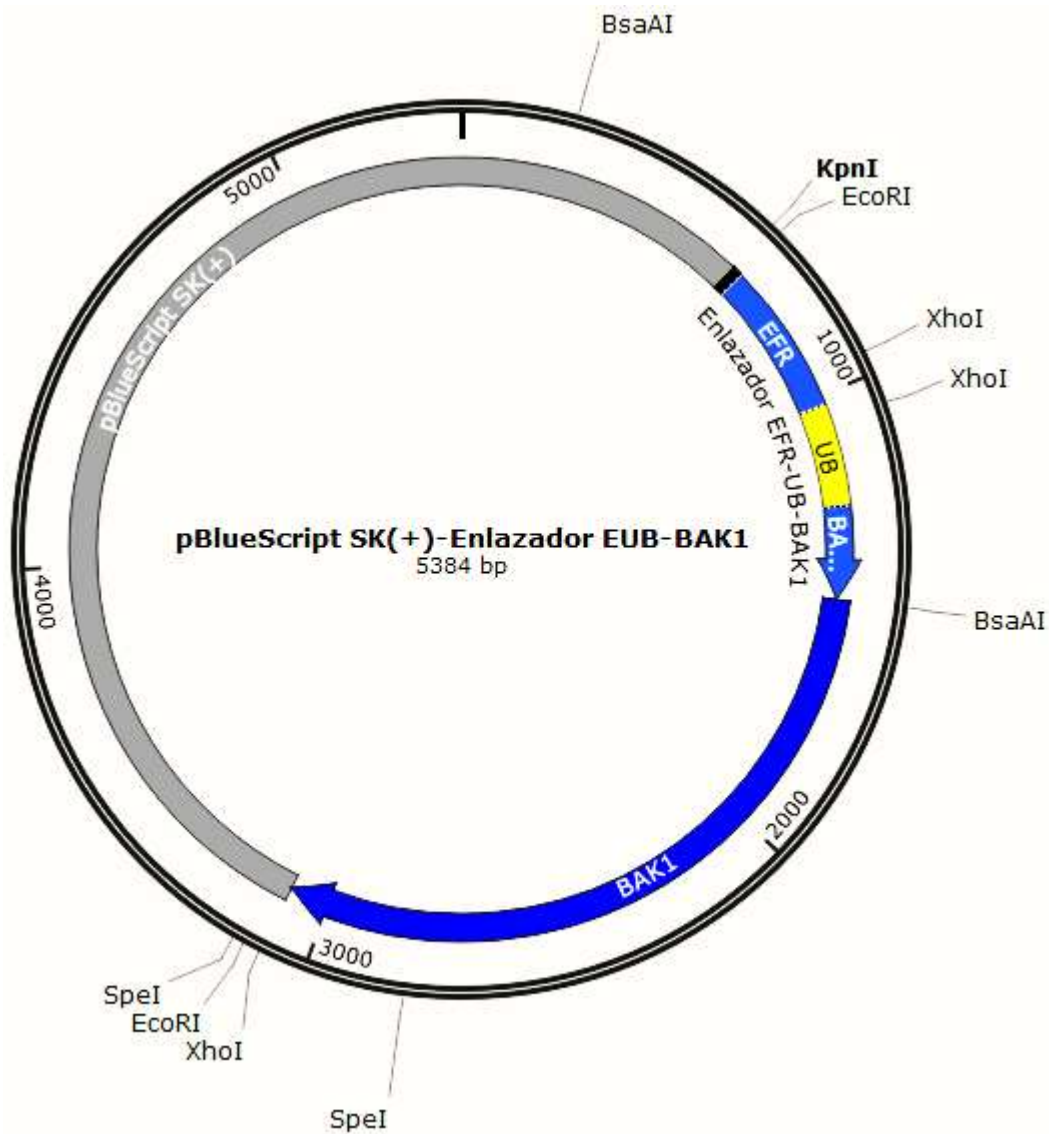


Figura 6. Plásmido pBlueScript SK (+)-enlazador EUB-BAK1. Ligación del enlazador *EFR-UB-BAK1* con el gen *BAK1*. Nótese que el enlazador EUB se ligó incluyendo un pequeño fragmento del vector pUC57 (en color negro), para incluir al sitio *Eco*RI, el cual se utilizaría posteriormente para ligarlo al gen *EFR*.

El plásmido pBlueScript SK (+)-*FLS2* (figura 4), fue digerido con *BsrDI* y *NotI* para liberar un fragmento de 3,487 pb, que va del punto de unión con el enlazador hasta el final del gen *FLS2*; el plásmido pUC57-enlazador *BAK1-UB-FLS2* (BUF) (figura 5), fue digerido con *BsrDI* y *EcoRI* para liberar un fragmento de 605 pb, que incluye la totalidad del enlazador BUF más un pequeño fragmento de 36 pb del vector pUC57. Ambos fragmentos se ligaron y se clonaron entre los sitios *NotI* y *EcoRI* del vector pBlueScript SK (+), dando como resultado el plásmido pBlueScript SK (+)-enlazador BUF-*FLS2* (figura 7).

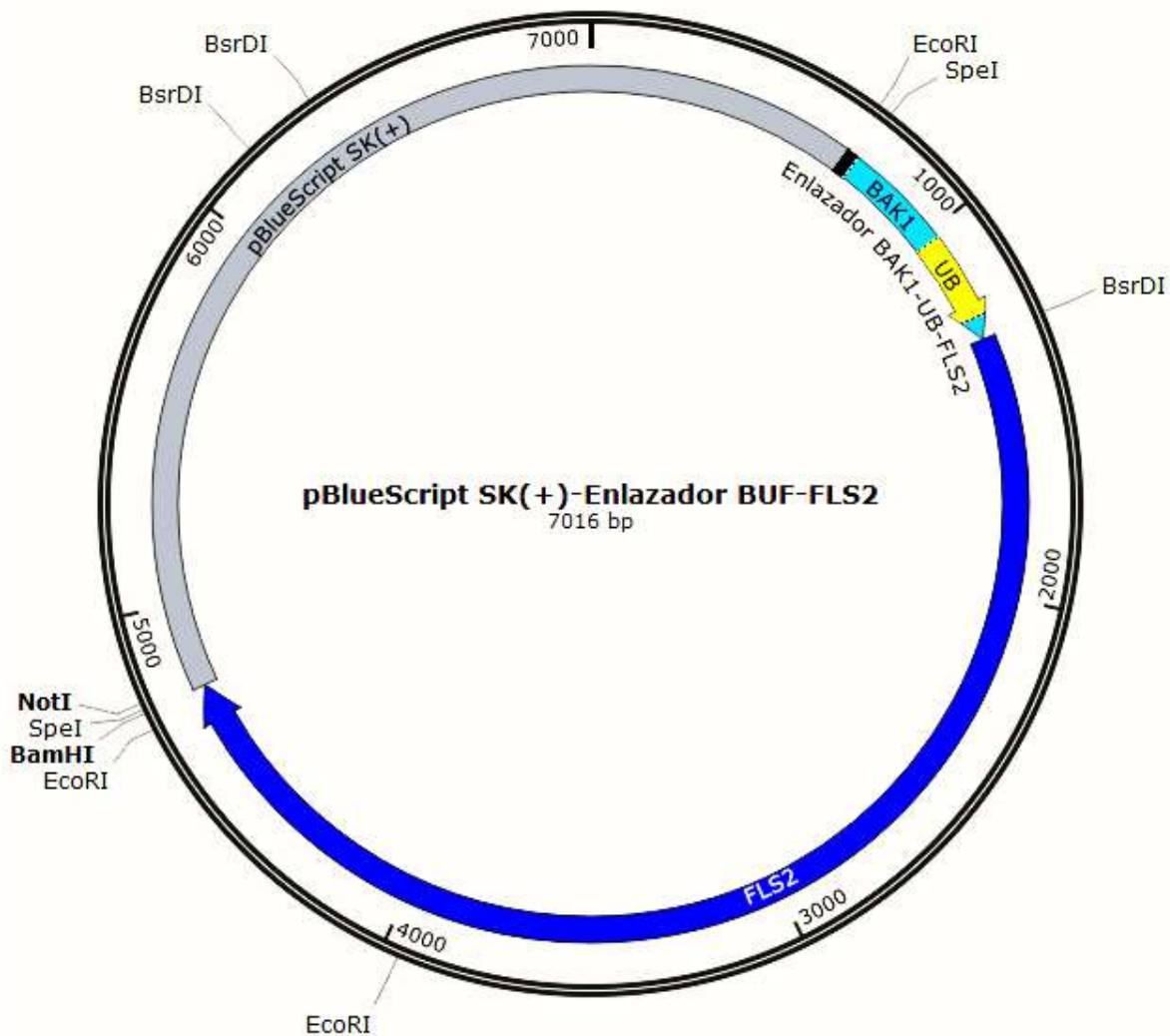


Figura 7. Plásmido pBlueScript SK (+)-enlazador BUF-*FLS2*. Ligación del enlazador *BAK1-UB-FLS2* con el gen *FLS2*. Nótese que el enlazador BUF se ligó incluyendo un pequeño fragmento del vector pUC57 (en color negro), para incluir al sitio *SpeI*, el cual se usaría posteriormente para ligarlo al resto del casete.

Posteriormente, y ya con los enlazadores ligados a uno de sus respectivos genes, se intentó completar la construcción del casete ligando los fragmentos EUB-BAK1, BUF-FLS2 y EFR, dentro del vector pUC19 para, posteriormente, transferir el casete al vector de expresión en plantas LJMS. En la **tabla 3** se muestran los detalles de los fragmentos que se intentaron ligar con esta estrategia.

Tabla 3. Detalles de la tercera estrategia que se siguió para la construcción del casete. Se intentó completar la construcción del casete, usando a pUC19 como vector. El tamaño total del casete sería de 8,931 pb, que sumados a las 2,681 pb del pUC19, daban un total de 11,612 pb.

Elemento del casete	Enzimas usadas para su digestión	Tamaño del fragmento obtenido (pb)
Vector pUC19	<i>Bam</i> HI <i>Kpn</i> I	2,681
pJET1.2/ EFR	<i>Kpn</i> I <i>Eco</i> RI	2,760
pBlueScript SK (+)/enlazador EUB-BAK1	<i>Eco</i> RI <i>Spe</i> I	2,138
pBlueScript SK (+)/enlazador BUF-FLS2	<i>Spe</i> I <i>Bam</i> HI	4,033
		Total: 11,612

Después de varios intentos para completar la construcción del casete por medio de esta estrategia, se pensó que la razón por la cual no se estaba llevando a cabo la ligación era que los sitios *Kpn*I y *Bam*HI en el vector pUC19 se encuentran muy cerca uno del otro, a tan solo 6 pb de distancia, lo que podría estar impidiendo que las enzimas se anclaran al ADN para realizar los cortes y las ligaciones. Por este motivo se decidió usar una estrategia más.

La nueva estrategia consistía en tratar de completar la construcción del casete directamente dentro del vector de expresión en plantas LJMS. Sin embargo, los sitios que permitirían llevar a cabo dicha ligación en ese vector eran *Bam*HI y *Sal*I, los cuales no estaban presentes en los extremos del casete que se deseaba construir. De modo que se mandaron sintetizar dos pequeños parches de ADN (**figura 8**), que

correspondían a la parte inicial del primer gen del casete (*EFR*), con un sitio *Bam*HI añadido antes de este, y a la parte final del último gen del casete (*FLS2*), con un sitio *Sal*I añadido después de este.



Figura 8. Parches para añadir sitios de restricción al inicio y al final de la construcción. El primer parche consiste en la parte inicial del gen *EFR*, desde su inicio hasta el sitio *Spe*I, con un sitio *Bam*HI (en rojo) añadido antes del inicio del gen. El segundo parche consiste en la parte final del gen *FLS2*, desde el sitio *Pst*I hasta el final del mismo, con un sitio *Sal*I (en rojo) añadido después del final del gen.

De manera que utilizando los parches de la **figura 8**, se sustituyó la parte inicial del gen *EFR* en el plásmido pJET1.2-*EFR* (**figura 4**, panel inferior), mediante los sitios *Kpn*I y *Spe*I; y la parte final del gen *FLS2* en el plásmido pBlueScript SK (+)-*FLS2* (**figura 4**, panel central), mediante los sitios *Pst*I y *Bam*HI, dando como resultado los plásmidos que se muestran en las **figuras 9 y 10**.

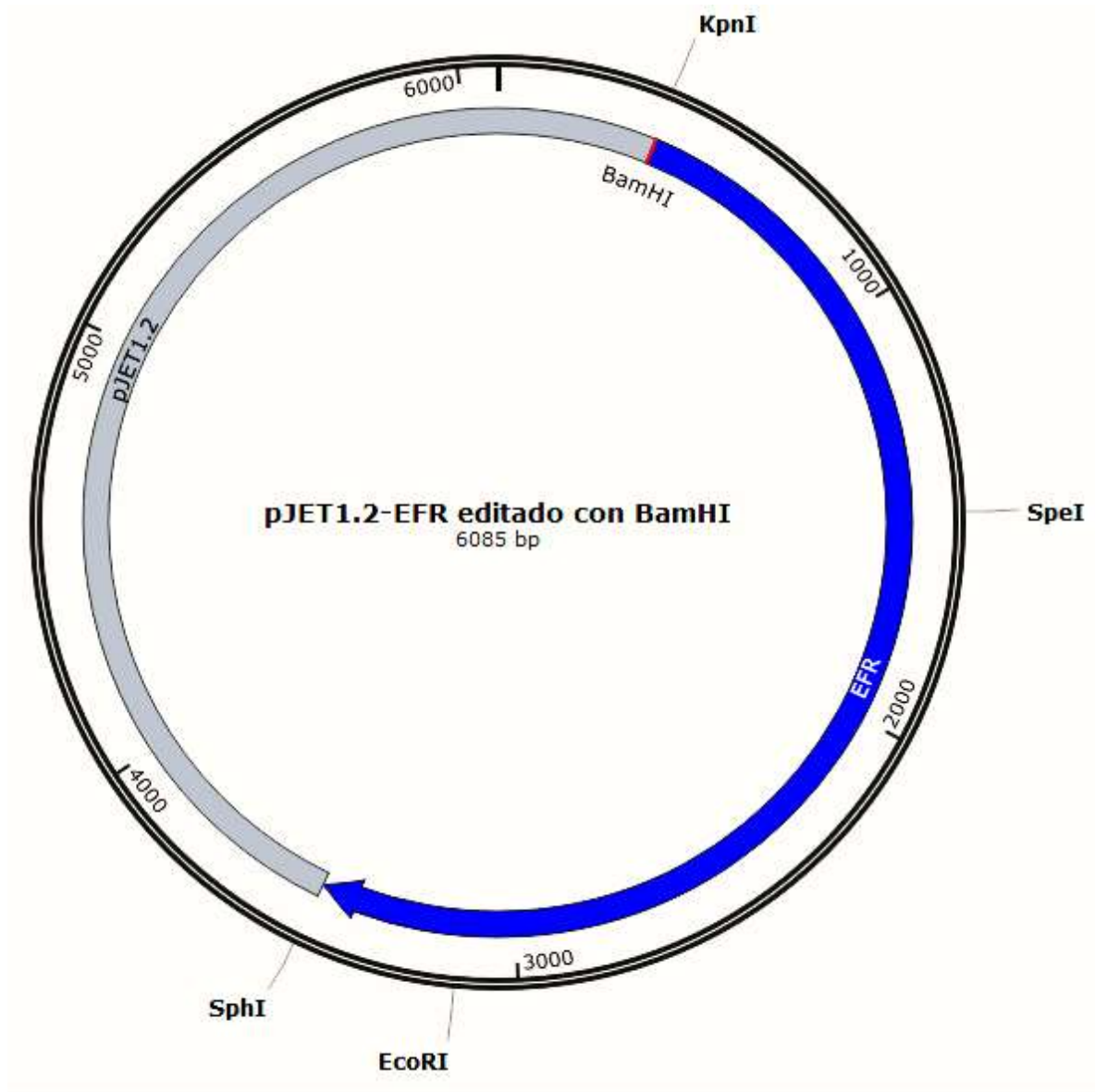


Figura 9. Plásmido pJET1.2 conteniendo el gen *EFR* editado con *Bam*HI. Utilizando el parche que se sintetizó, fue posible reemplazar la parte inicial del gen *EFR* para incorporar un sitio *Bam*HI (en rojo), el cual sería utilizado para ligarlo en el vector LIMS.

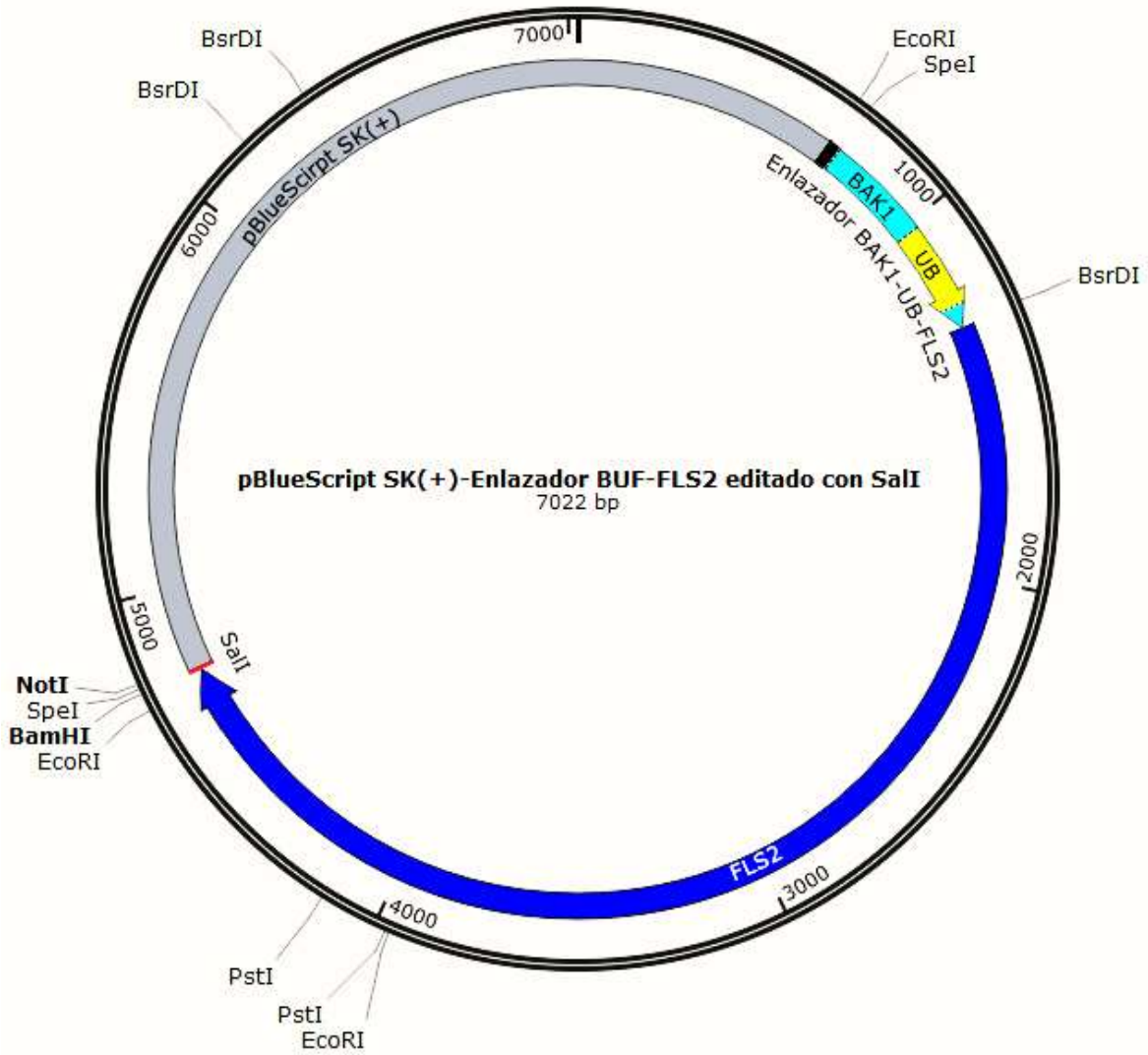


Figura 10. Plásmido pBlueScript SK(+) conteniendo el enlazador BUF y el gen *FLS2* editado con *SalI*. Utilizando el parche sintetizado, fue posible remplazar la parte final del gen *FLS2* para incorporar un sitio *SalI* (en rojo), el cual sería utilizado para ligarlo en el vector LIMS.

Finalmente, se procedió a construir el casete completo ligándolo directamente dentro del vector LIMS. En la **tabla 4** se detalla el origen de los elementos que se utilizaron para la construcción del casete, así como las enzimas con las que fueron cortados los fragmentos para su ligación.

Tabla 4. Detalles de la estrategia que se siguió para la construcción final del casete dentro del vector LJMS. Se completó la construcción del casete, usando a LJMS como el vector final de expresión en plantas. El tamaño total del casete fue de 8,931 pb, que sumados a las 19,595 pb del LJMS, dieron un total de 28,526 pb.

Elemento del casete	Enzimas usadas para su digestión	Tamaño del fragmento obtenido (pb)
Vector LJMS (figura 1)	<i>Sall</i> <i>BamHI</i>	19,595
pJET1.2/ <i>EFR</i> editado con <i>BamHI</i> (figura 9)	<i>BamHI</i> <i>EcoRI</i>	2,758
pBlueScript SK (+)/ enlazador EUB- <i>BAK1</i> (figura 6)	<i>EcoRI</i> <i>SpeI</i>	2,138
pBlueScript SK (+)/ enlazador BUF- <i>FLS2</i> editado con <i>Sall</i> (figura 10)	<i>SpeI</i> <i>Sall</i>	4,035
		Total: 28,526

De esta manera, quedó finalmente construido el casete completo con los genes *EFR*, *BAK1* y *FLS2*, en ese orden y separados cada uno de otro por un monómero de ubiquitina de tabaco para facilitar el procesamiento del polipéptido traducido *in planta*. El fragmento completo fue clonado dentro del vector de expresión en plantas LJMS. En la figura 11 se muestra el aspecto de la construcción final.

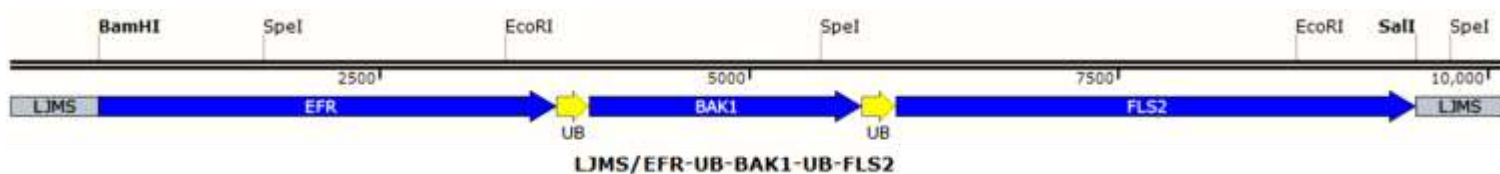


Figura 11. Construcción completa del casete usado para la transformación de las plantas. Los genes *EFR*, *BAK1* y *FLS2* quedaron clonados en ese orden dentro del vector de expresión en plantas LJMS, separado uno de otro por un monómero de ubiquitina (UB) de tabaco. Se señalan las enzimas utilizadas para la ligación de todos los fragmentos.

La construcción final fue comprobada mediante un análisis de mapeo por restricción (**figura 12**), así como también por secuenciación de la misma.

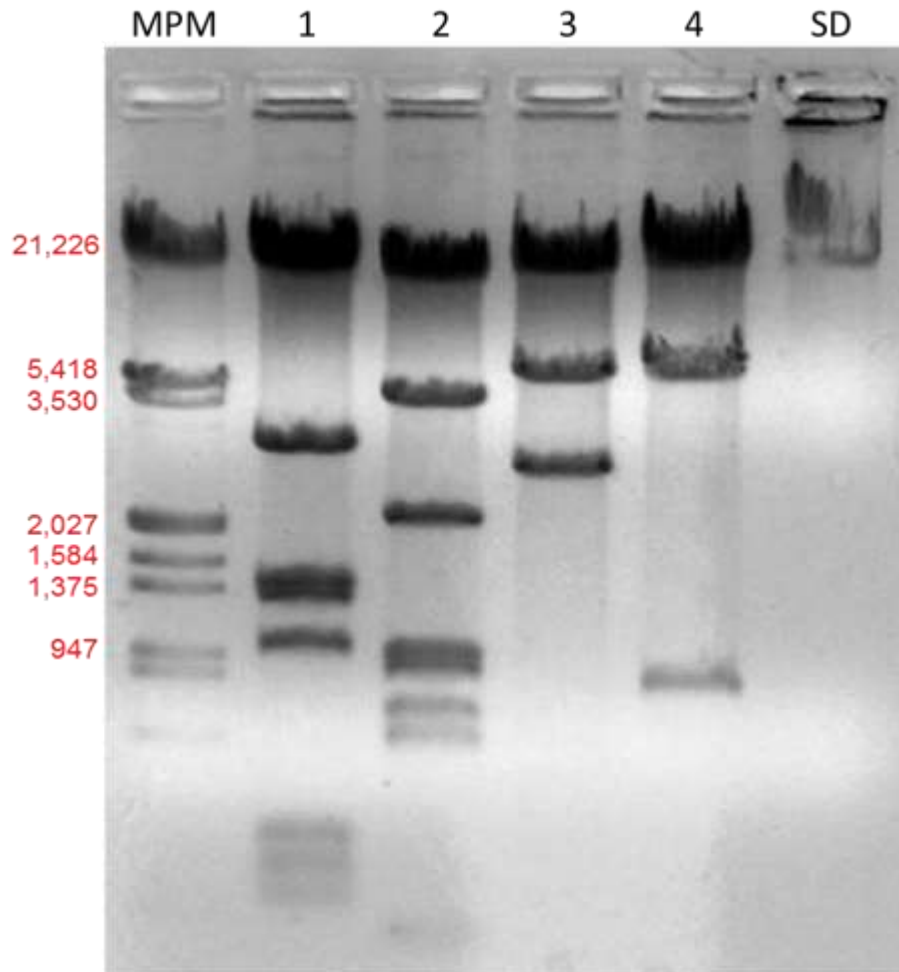


Figura 12. Análisis de mapeo por restricción del casete *EFR-UB-BAK1-UB-FLS2*, clonado dentro del vector *LJMS*. MPM: marcador de peso molecular correspondiente al ADN del bacteriófago λ digerido con *HindIII* y *EcoRI*; **1: construcción digerida con *HindIII*, bandas esperadas 20,827 pb, 3,235 pb, 1,437 pb, 1,336 pb, 1,015 pb, 288 pb, 224 pb y 164 pb; **2**: construcción digerida con *XhoI*, bandas esperadas 18,700 pb, 4,501 pb, 2,075 pb, 976 pb, 880 pb, 698 pb, 592 pb y 104 pb; **3**: construcción digerida con *EcoRI* y *BamHI*, bandas esperadas 20,409 pb, 5,355 pb y 2,762 pb; **4**: construcción digerida con *EcoRI* y *Sall*, bandas esperadas 22,357 pb, 5,355 pb y 814 pb; **SD**: construcción sin digerir.**

La construcción completa fue electroporada en *E. coli* y una vez que se tuvo comprobada la secuencia de la misma, se transfirió a *A. tumefaciens* LBA4404, igualmente por electroporación.

IV.4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE JITOMATE

Se iniciaron los experimentos de transformación empleando la construcción LJMS/*EFR-UB-BAK1-UB-FLS2*. Se obtuvieron brotes sanos y verdes, con una buena velocidad de crecimiento (**figura 13**). La generación de brotes se dio en un promedio de 4 a 5 semanas después de la transformación. Fue posible llevar a cabo una selección visual del material posiblemente transformado ya que, en el subcultivo con medio de enraizamiento, el material no transformado tendía a desarrollar gran cantidad de raíces adventicias que no penetraban en el medio de cultivo, mientras que el material transformado desarrollaba casi exclusivamente raíces no adventicias que sí penetraban en el medio de cultivo (**figura 13**). Después de los primeros tres subcultivos y cuando los brotes ya tenían desarrolladas algunas hojas, se realizaron los ensayos de tinción de GUS (ver más adelante). Las plantas enraizadas y que mostraban un resultado positivo en los ensayos de GUS fueron transferidas a suelo en la cámara de crecimiento.



El fenotipo de las plantas transgénicas fue normal en todos los aspectos, salvo ligeras alteraciones. Los frutos de las plantas transgénicas presentaban un menor número de semillas en comparación con las plantas silvestres, en una relación promedio de 7 a 10. Asimismo, las semillas de las plantas transgénicas tardaban más tiempo en germinar; mientras que las semillas de las plantas silvestres germinaban en promedio en 5-7 días, las de las plantas transgénicas lo hacían en un promedio de 9-12 días.

Figura 13. Proceso de transformación y regeneración de las plantas de jitomate. A: explantes cotiledonarios 10 días después de la infección con *A. tumefaciens*, desarrollándose en medio 2Z adicionado con kanamicina. **B:** plántula regenerada de jitomate de 40 días post infección (dpi) en medio 1Z. Obsérvense las raíces adventicias que no entran en contacto con el medio de cultivo, un indicio de que se trataba de una plántula no transgénica. **C:** plántula regenerada de jitomate de 60 dpi en medio 1Z. Nótese que no presenta raíces adventicias que estén fuera del medio de cultivo, un indicio de que se trataba de una plántula transgénica. **D:** planta transgénica de jitomate 75 dpi, creciendo en suelo.

IV.5. PRUEBAS MOLECULARES

Ensayos de tinción de GUS en plantas de jitomate

Los ensayos histoquímicos de actividad de la β -glucuronidasa, se realizaron como parte de un segundo escrutinio para la selección de posibles plantas transgénicas (el primer escrutinio fue la selección de las plántulas regeneradas en presencia del antibiótico de selección). Dado el hecho de que, en el plásmido utilizado para transformar las plantas de jitomate, tanto el gen *GUS*, como el casete que contenía los genes de PRRs estaban bajo el control del promotor constitutivo 35S, se esperaba poder monitorear eficientemente la actividad del gen *GUS* en cualquier tejido y en cualquier etapa del desarrollo de las plantas. Para el escrutinio inicial de las plantas, se tomaron pequeñas partes de tejido (raíz u hoja), y se tiñieron de acuerdo al método ya mencionado (**figura 14**). Cabe mencionar que este parámetro de selección resultó muy útil, al revelar la presencia de algunos brotes quiméricos, los que evidentemente no son deseables cuando se busca generar plantas transformadas de manera estable y homogénea. Al tener brotes quiméricos regenerados, las regiones transformadas permiten el crecimiento del brote en el medio de cultivo que contiene el antibiótico de selección, logrando escapar a este primer escrutinio como si se tratara de un brote transformado homogéneamente. Es importante hacer notar que la presencia de dichos brotes quiméricos fue mínima, ya que la gran mayoría de los brotes regenerados resultaron estar transformados de manera homogénea. Una vez que las plantas superaron el escrutinio de la tinción de GUS, y mostraron evidencias claras de ser transformantes homogéneas y no quiméricas, fueron transferidas a suelo donde continuaron su desarrollo hasta dar frutos, a los cuales se les realizó la prueba de GUS una vez más (**figura 14**), para corroborar que se trataba realmente de plantas transgénicas.

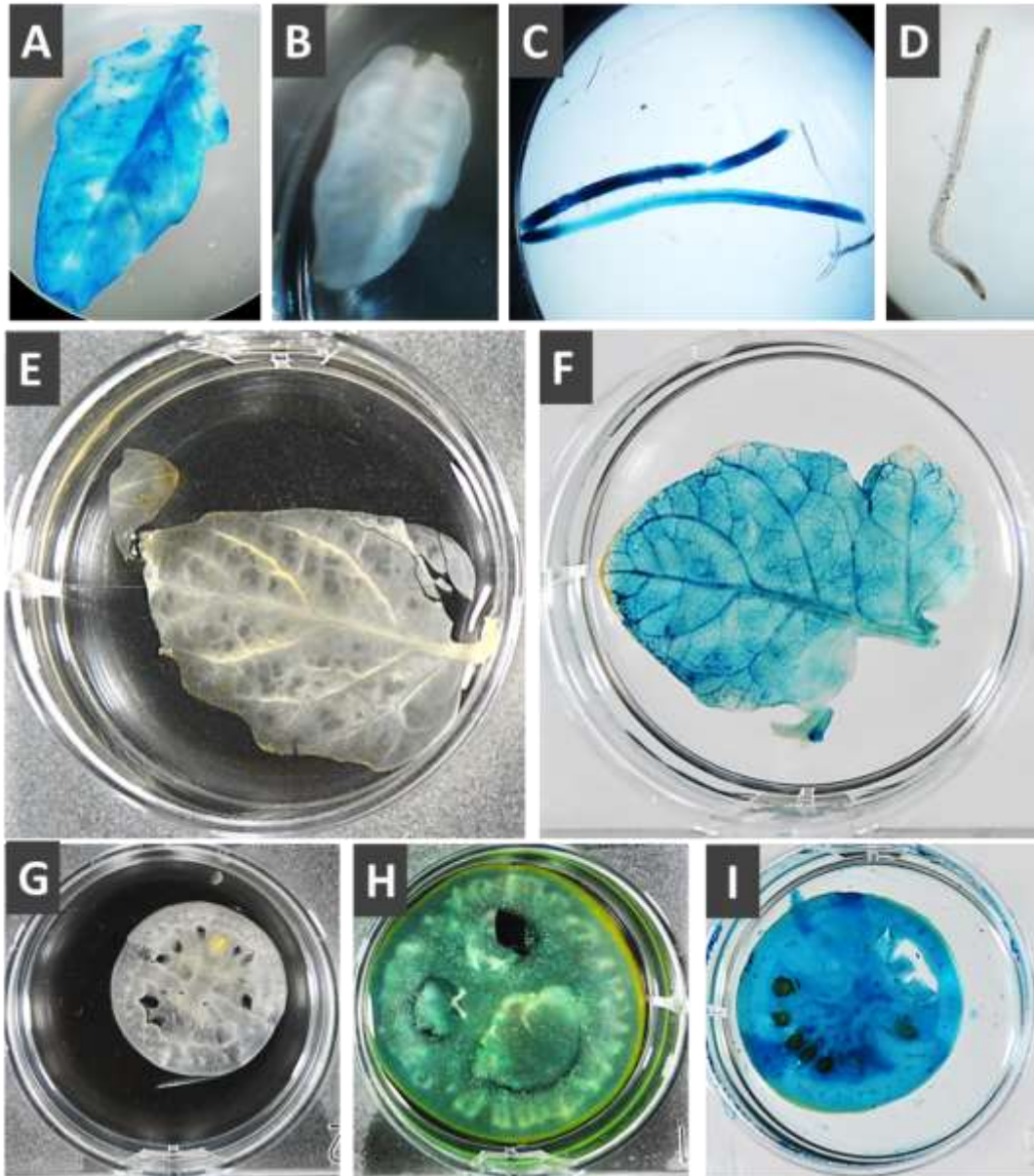
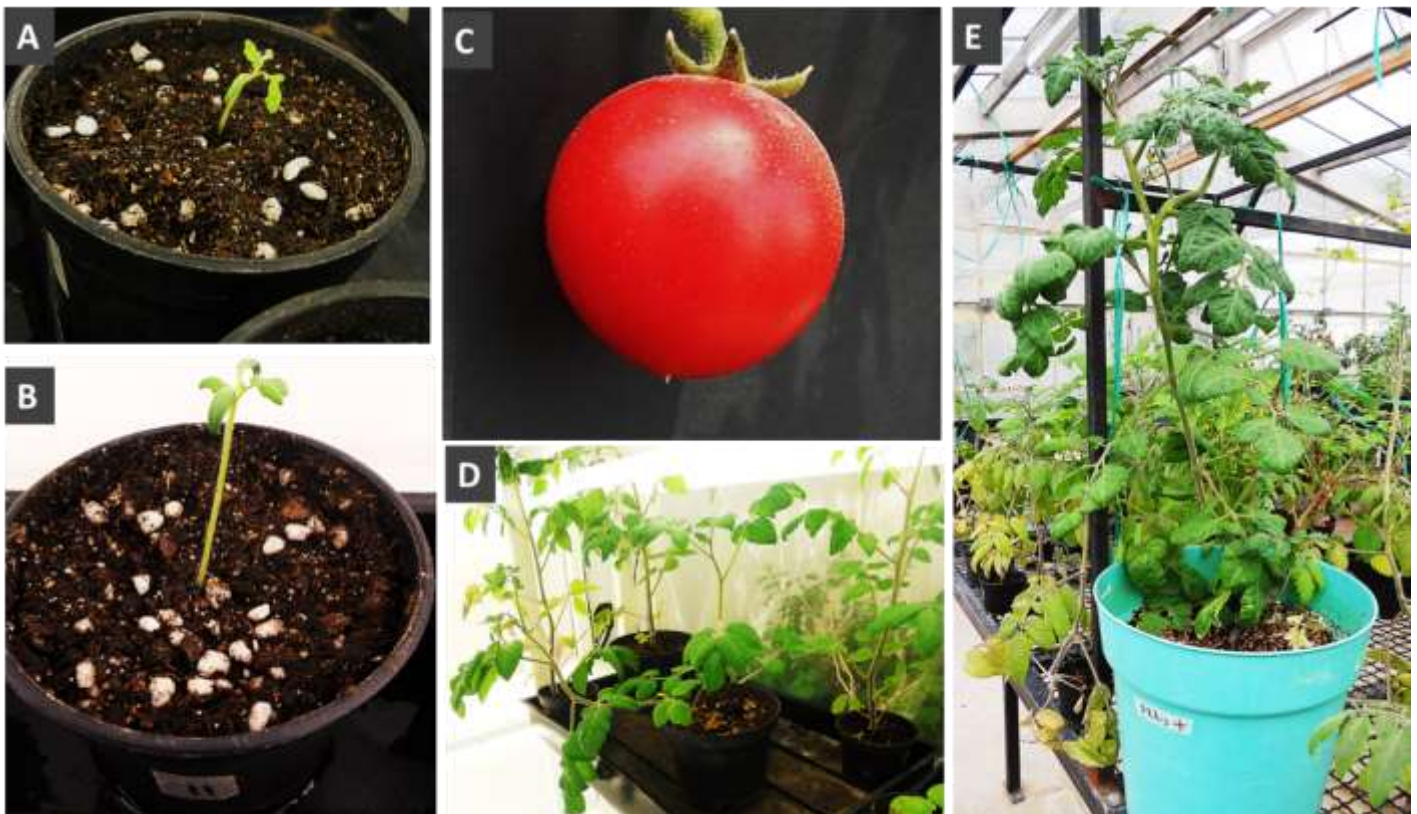


Figura 14. Ensayos de GUS en tejidos de jitomate para evaluar plantas transformadas. Fotografías representativas en las que se muestran ensayos de tinción histoquímica de la β -glucuronidasa/X gluc en hojas, raíces y frutos de jitomate transformado y no transformado. **A y B:** tinción en hojas de plántulas jóvenes realizadas como un segundo escrutinio de las plantas transgénicas antes de ser pasadas a suelo. Compárese una hoja positiva para GUS (**A**), contra una negativa (**B**). **C y D:** tinción en raíces de plantas jóvenes, realizada al momento de ser pasadas del medio de cultivo *in vitro* al suelo. Nótese la diferencia entre una raíz de una planta positiva (**C**) y de una negativa (**D**). **E y F:** tinción en hojas de plantas adultas ya creciendo en suelo. Compárese la hoja de una planta silvestre (**E**), contra la hoja de una planta transgénica (**F**). **G-I:** tinción en frutos inmaduros y maduros. Compárese el fruto inmaduro de una planta silvestre (**G**), contra el fruto inmaduro de una planta transgénica (**I**). En el fruto maduro de la planta transgénica se observa tinción de GUS más tenue debido a la presencia de licopeno (**H**).

De esta manera, se lograron obtener cuatro líneas independientes de plantas transgénicas, las cuales se permitió que se desarrollaran hasta que dieran frutos, cuyas semillas se germinaron directamente en tierra (**figura 15**). Con las plantas germinadas de dichas semillas se repitió el proceso, y así se siguió sucesivamente hasta obtener plantas de la cuarta generación (F4). Es importante mencionar que, al total de plantas de cada generación que germinaban y crecían, se escrutaban nuevamente mediante el ensayo de GUS. De manera interesante, el porcentaje de plantas que resultaron ser positivas para dicho ensayo, aumentó sucesivamente en cada generación, de tal manera que en la F1 el 85% de las plantas germinadas resultaron positivas, en la F2 fue un 91%, en la F3 un 94% y en la F4 un 97%. Esto es importante, ya que indicó que los transgenes realmente se habían integrado al genoma de las plantas, que se estaban heredando de manera estable y que las líneas de plantas transgénicas estaban tendiendo hacia la homocigosidad.



Análisis por PCR de las líneas transgénicas de jitomate

Una vez que las plantas regeneradas habían sido analizadas por selección en cultivo y por ensayos de GUS, el siguiente escrutinio para la comprobación de la integración de los transgenes, consistió en la realización de análisis por PCR. Siguiendo los protocolos y usando los mismos oligonucleótidos que se utilizaron para aislar y amplificar los genes *EFR*, *BAK1* y *FLS2* originalmente a partir de una biblioteca de cADN de *A. thaliana*, se realizaron ampliaciones empleando ADN de hojas jóvenes de las diferentes líneas de plantas transgénicas de la F1 a la F4. Tras la realización de los ensayos pertinentes, bandas del tamaño esperado aparecieron en las plantas de jitomate transgénicas (**figura 16**). Se obtuvieron consistentemente bandas amplificadas de los tamaños esperados en todos los casos. Es importante mencionar que, cuando se llevó a cabo el análisis por PCR usando ADN de plantas no transgénicas, los oligonucleótidos específicos para los genes *FLS2* y *BAK1* amplificaron una banda del tamaño correspondiente, esto se debe a que la planta de jitomate posee ortólogos para dichos genes, y que el grado de identidad es tal, que permite la amplificación de los mismos utilizando los oligonucleótidos diseñados para amplificar los genes de *Arabidopsis*. Sin embargo, para el caso del gen *EFR*, el cual es exclusivo de la familia Brassicaceae, no se obtuvo ninguna banda amplificada en las plantas no transgénicas (**figura 16**).

Figura 15. Germinación y desarrollo de plantas transgénicas de jitomate F1-F4. Fotografías representativas, en las que se muestran los diferentes estadios del desarrollo de las diferentes generaciones de las líneas transgénicas de jitomate. **A:** plántula de la F1 de la línea transgénica 4, a los 6 días de edad, desarrollándose en la cámara de crecimiento. **B:** plántula de la F2 de la línea transgénica 11, a los 10 días de edad, desarrollándose en la cámara de crecimiento. **C:** fruto maduro de la F2 de la línea transgénica 7, desarrollándose in planta en el invernadero. **D:** lote de la F3 de la línea transgénica 3, a los 25 días de edad, desarrollándose en la cámara de crecimiento. **E:** planta de la F4 de la línea transgénica 7, a los 85 días de edad, desarrollándose en invernadero.

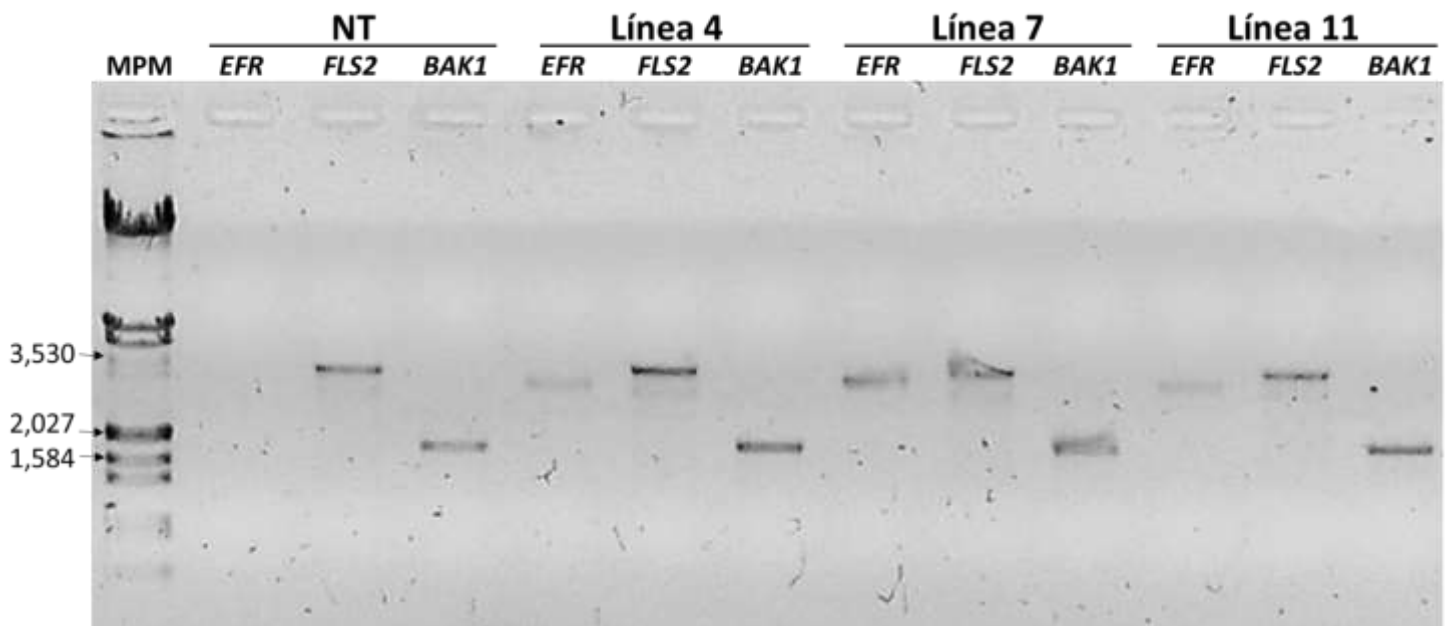


Figura 16. Evidencia molecular de la transformación de jitomate con el casete de genes de resistencia. Resultados representativos de PCR en los que se muestran amplificaciones específicas de los genes *EFR*, *FLS2* y *BAK1*, a partir de ADN genómico total, aislado de plantas transgénicas de jitomate. Tinción de bromuro de etidio de un gel de agarosa en el que se muestran los productos de amplificación por PCR de tres diferentes líneas transgénicas de plantas de jitomate de la generación F3, y de una línea no transgénica (NT). En el caso de la línea no transgénica se observa amplificación de los genes *FLS2* y *BAK1*, como resultado de la presencia de genes endógenos ortólogos en el genoma del jitomate. Como marcador de peso molecular (MPM), se utilizó ADN del bacteriófago λ digerido con *HindIII* y *EcoRI*.

IV.6. RETOS CON BACTERIAS FITOPATÓGENAS

Una vez que se comprobó, a través del crecimiento y desarrollo en el medio de selección, de los ensayos histoquímicos de GUS, y del análisis molecular por PCR, que las líneas de plantas generadas eran realmente transgénicas, se realizó el reto con bacterias fitopatógenas para comprobar la resistencia adquirida por la expresión de los transgenes. Se utilizaron tres patovares de bacterias fitopatógenas para los retos: *P. syringae* pv. *syringae* B728a, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (figura 17).

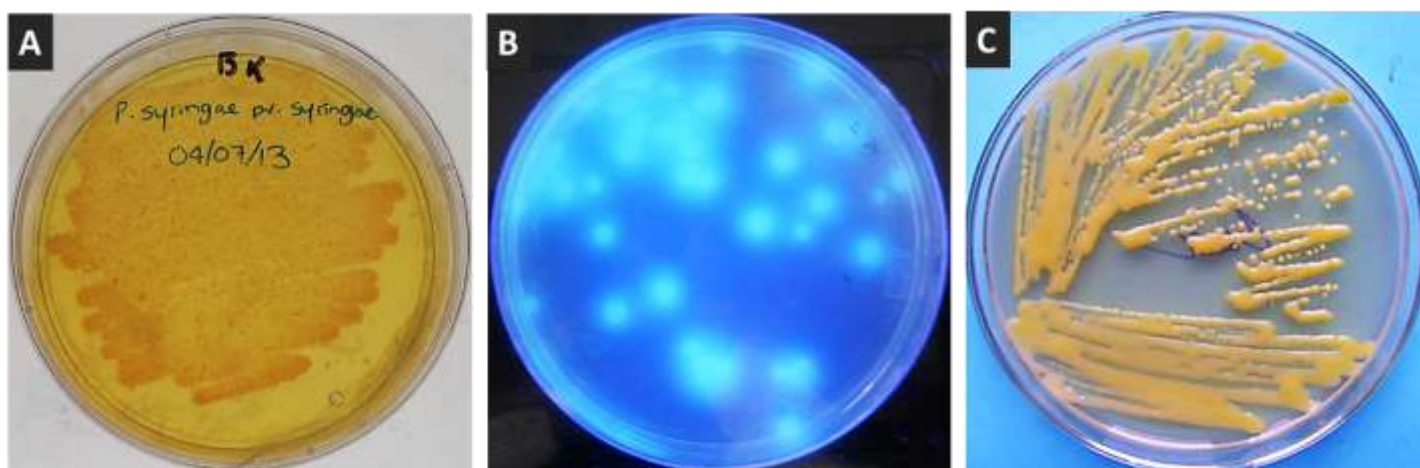


Figura 17. Cepas bacterianas utilizadas para los retos a las plantas transgénicas. Fotografías de las diferentes cepas de bacterias usadas para los retos, creciendo *in vitro* sobre medios de cultivo. **A:** cultivo de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a creciendo en medio King B. **B:** cultivo de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 creciendo en medio King B y visto bajo exposición a luz UV, emitiendo fluorescencia. **C:** cultivo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* creciendo en medio NBY.

Para cada cepa bacteriana probada, se usaron plantas jóvenes de jitomate de las diferentes generaciones de cada una de las líneas transgénicas generadas. La preparación de los inóculos y la inoculación de las plantas, se llevaron a cabo como se describe en la sección de Métodos.

Retos con P. syringae pv. syringae

A los 10 días después de haber realizado la infección, la diferencia en el desarrollo de síntomas entre las plantas no transgénicas y las diferentes líneas de plantas transgénicas era muy notable. Los síntomas se manifestaron principalmente como manchas cloróticas alrededor de los sitios de infección, volviéndose necróticas con el paso del tiempo. De las cuatro líneas de plantas transgénicas generadas, una (línea 3), mostró un desarrollo de síntomas severo, casi comparable con los de las plantas no transgénicas. Las líneas 4 y 11 mostraron un desarrollo de síntomas ligeramente menor (sobre todo en la línea 11). La línea 7, sin embargo, mostró un desarrollo de síntomas muy ligero y apenas perceptible, siendo esta línea la que mejores resultados demostró (**figura 18**).

Figura 18. Desarrollo de síntomas ante la infección con *P. syringae pv. syringae*. Fotografías representativas del desarrollo de síntomas, 10 días después de la infección con *P. syringae pv. syringae*, en las diferentes líneas transgénicas, en plantas de la F2. **A:** planta no transgénica. **B:** planta de la línea 3. **C:** planta de la línea 4. **D:** planta de la línea 7. **E:** planta de la línea 11. **F:** planta no transgénica utilizada como control, inoculada con PBS sin bacteria.



A los 2, 4, 6, 8 y 10 días después de realizada la infección, se realizaron conteos bacterianos como se detalla en el apartado de estrategias experimentales. En los días 2 y 4, los conteos bacterianos no mostraron diferencia significativa entre las líneas transgénicas y la no transgénica. Sin embargo, a partir del día 6 se comenzaron a observar ligeras diferencias entre las diferentes líneas, haciéndose éstas más notorias y estadísticamente significativas a partir del día 8. Coincidiendo con lo registrado visualmente mediante el desarrollo de síntomas, la línea 3 mostró un crecimiento bacteriano comparable con la línea no transgénica. En el día 4, las líneas 4 y 11 mostraron un crecimiento bacteriano similar entre ellas dos, y menor a la línea 3 y a la no transgénica. Sin embargo, para el día 8 el conteo de bacterias entre las líneas 4 y 11 fue estadísticamente diferente, siendo ligeramente menor para esta última. La línea 7 mostró diferencia estadísticamente significativa desde el día 8, alcanzando en el día 10 únicamente el 40% del crecimiento bacteriano que presentó la línea no transgénica (**figura 19**).

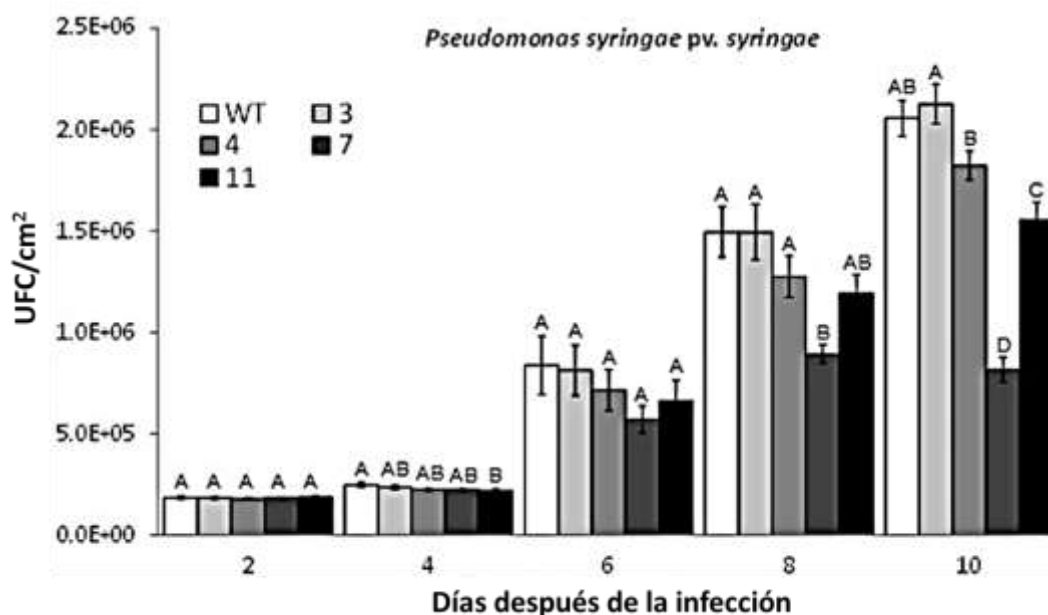


Figura 19. Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) a través del tiempo en diferentes plantas transgénicas de jitomate retadas con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Se muestra el número de UFC, en plantas de la F3 de las diferentes líneas transgénicas de jitomate (indicadas mediante barras con diferentes tonos de gris, excepto las barras blancas que representan plantas control, [WT]), después de la infección con *P. syringae* pv. *syringae*. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de la media. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (t de Student, $P < 0.05$).

Retos con Pseudomonas syringae pv. tomato

Al igual que como había sucedido con *P. syringae pv. syringae*, a los 10 días después de haber realizado la infección con *P. syringae pv. tomato*, la diferencia en el desarrollo de síntomas entre las plantas no transgénicas y las diferentes líneas de plantas transgénicas era muy notable. Igualmente, los síntomas se manifestaron principalmente como manchas cloróticas alrededor de los sitios de infección, volviéndose necróticas con el paso del tiempo. De las cuatro líneas de plantas transgénicas generadas, una vez más, la línea 3 mostró un desarrollo de síntomas severo, casi comparable con los de las plantas no transgénicas. Las líneas 4 y 11 mostraron un desarrollo de síntomas ligeramente menor. La línea 7 volvió a mostrar un desarrollo de síntomas muy ligero y apenas perceptible, siendo esta línea, una vez más, la que mejores resultados mostró (**figura 20**).

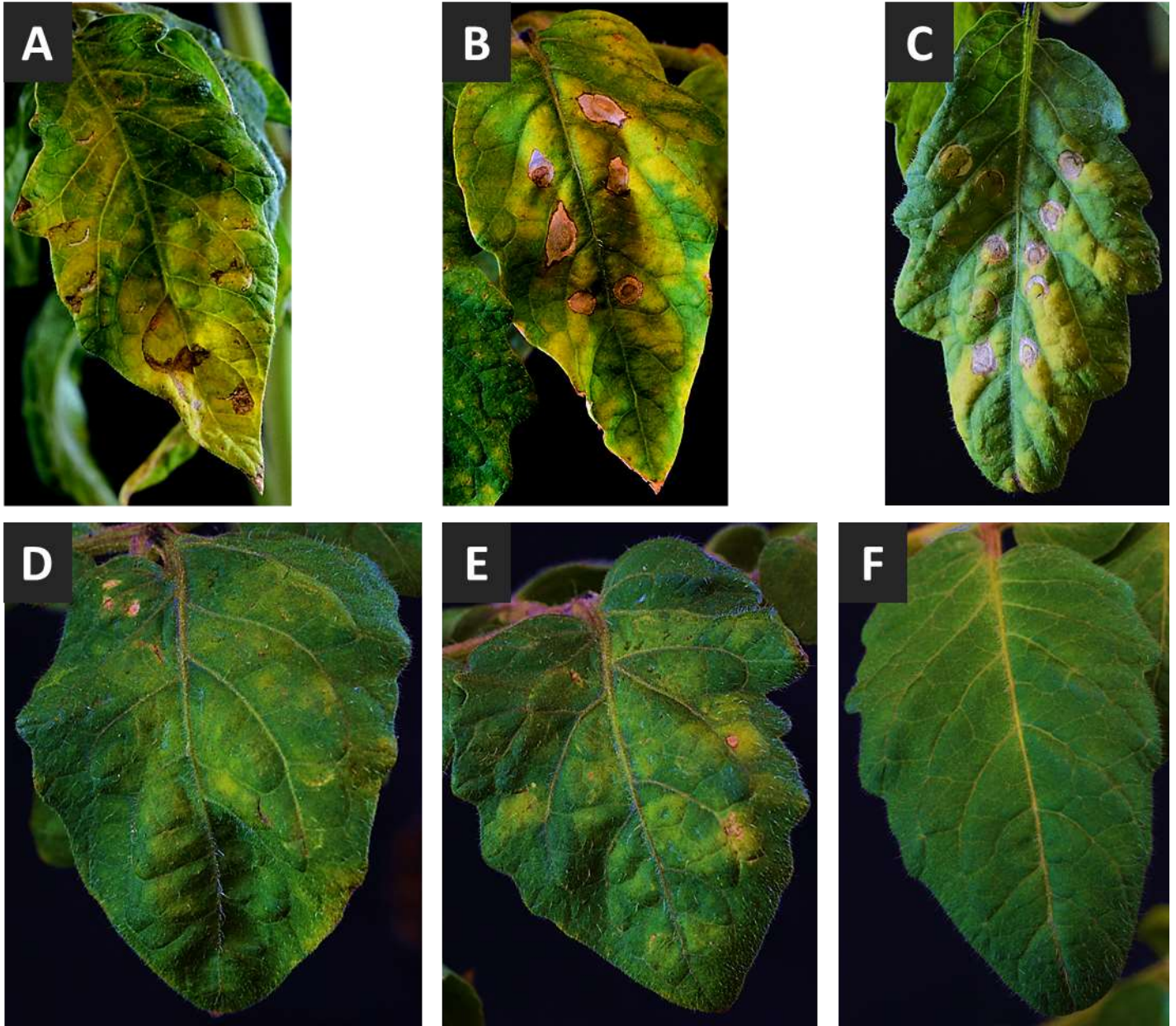


Figura 20. Desarrollo de síntomas ante la infección con *P. syringae* pv. *tomato*. Fotografías representativas del desarrollo de síntomas, 10 días después de la infección con *P. syringae* pv. *tomato*, en las diferentes líneas transgénicas en plantas de la F2. **A:** planta no transgénica. **B:** planta de la línea 3. **C:** planta de la línea 4. **D:** planta de la línea 7. **E:** planta de la línea 11. **F:** planta no transgénica utilizada como control, inoculada con PBS sin bacteria.

A los 2, 4, 6, 8 y 10 días después de realizada la infección, se realizaron conteos bacterianos como se detalla en el apartado de estrategias experimentales. En el día 2, los conteos bacterianos no mostraron diferencia significativa entre las líneas

transgénicas y la no transgénica. Sin embargo, a partir del día 4 se comenzaron a observar diferencias significativas distinguiéndose tres grupos diferentes, coincidiendo nuevamente con lo registrado visualmente por medio del desarrollo de síntomas: la línea no transgénica y la línea 3 presentaron los niveles más altos de UFC, las líneas 4 y 11 con niveles de UFC intermedios y similares entre ellas dos, y la línea 7 con el menor nivel de UFC. Pasados los días, las diferencias entre estos tres grupos se fueron acentuando cada vez más, hasta el punto que para el día 10, la línea 7 presentaba solo cerca del 27% del crecimiento bacteriano que presentó la línea no transgénica (**figura 21**).

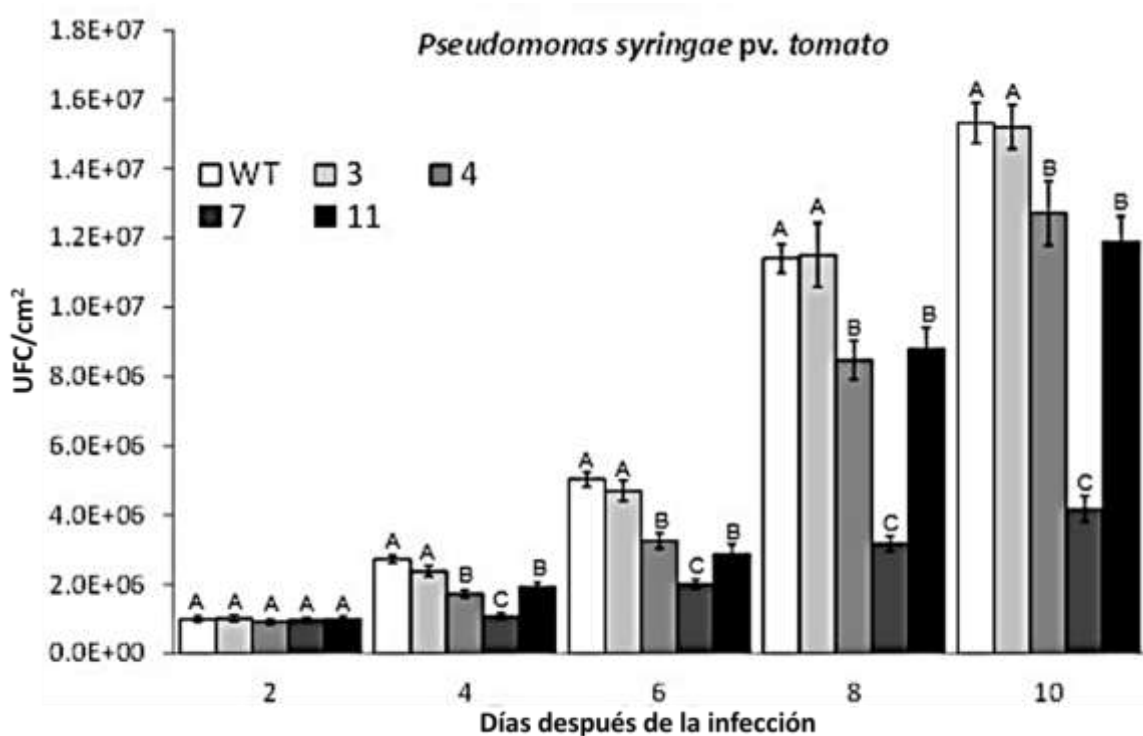


Figura 21. Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) para la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Gráfica que representa el número de UFC, en plantas de la F3 de las diferentes líneas transgénicas de jitomate (indicadas mediante barras con diferentes tonos de gris, excepto las barras blancas que representan plantas control, [WT]), después de la infección con *P. syringae* pv. *tomato*. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de la media. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (t de Student, $P < 0.05$).

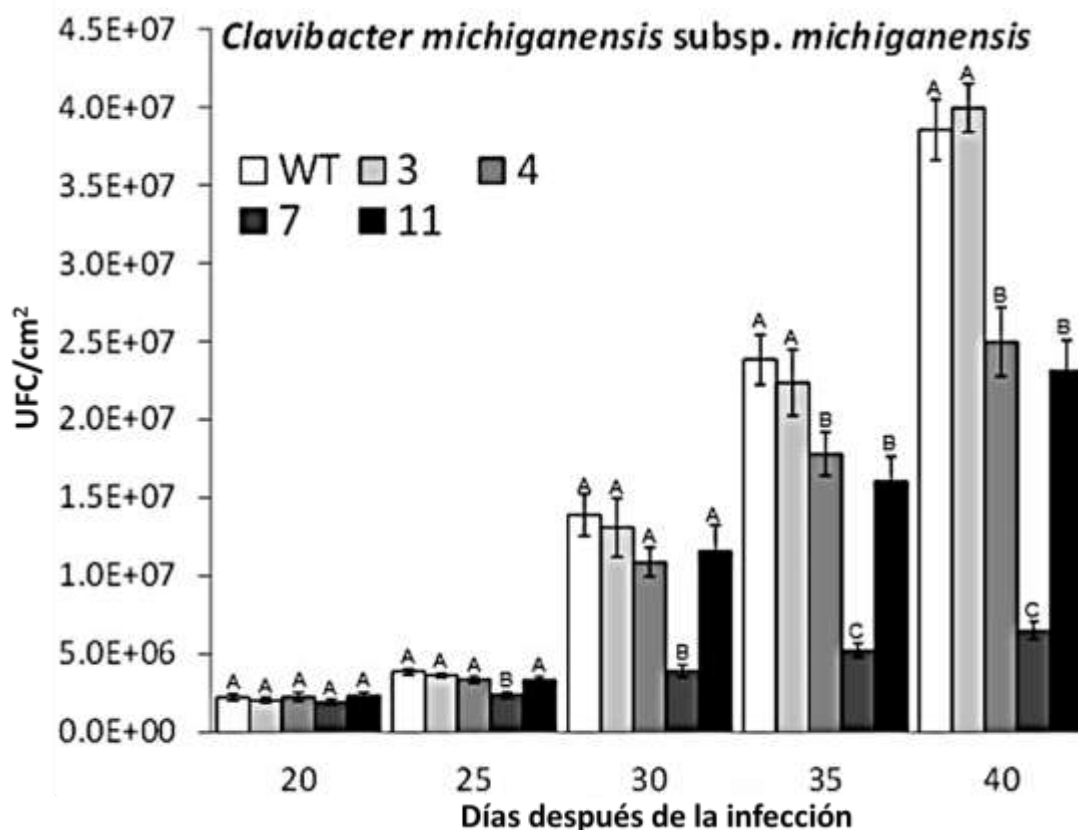
Retos con Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis

En el caso de las infecciones con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, los síntomas tardaron más días en manifestarse, comenzando a aparecer en promedio en el día 25 después de la infección. Los síntomas se manifestaron, principalmente, como necrosis marginal de las hojas, marchitamiento general de la planta y presencia de cáncer en el tallo. El síntoma del ojo de pájaro en el fruto no se presentó en ningún caso. Al igual que como había sucedido con las infecciones con *Pseudomonas*, se observaron diferencias importantes con respecto a la manifestación de síntomas en las diferentes líneas transgénicas, y en la línea no transgénica. Una vez más, la línea 3 mostró síntomas muy intensos, comparables con aquellos desarrollados en la línea no transgénica. Las líneas 4 y 11 mostraron un desarrollo de síntomas moderado, mientras que la línea 7 destacó de manera importante, al ser la que menos síntomas desarrolló, como se puede apreciar en la **figura 22**.

Figura 22. Desarrollo de síntomas ante la infección con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Fotografías representativas del desarrollo de síntomas 35 días después de la infección en plantas de la F2 de la línea 7 y de la línea no transgénica. **A-C**, planta no transgénica. **A**, aspecto global de la planta, observándose marchitamiento general. **B**, detalle de una hoja, observándose la necrosis marginal. **C**, detalle del tallo, observándose el cáncer en estado muy avanzado, al grado de abrir el tallo en parte importante de su longitud. **D-F**, planta de la línea 7. **D**, aspecto global de la planta; se alcanza a apreciar un marchitamiento muy leve. **E**, detalle de una hoja; la necrosis marginal sólo se presenta en una parte localizada de la hoja. **F**, detalle del tallo; sólo se aprecia una lesión muy localizada en el punto donde se realizó la infección. **G-I**, planta control inoculada con PBS sin bacteria. **G**, aspecto global de la planta; no se observa marchitamiento alguno. **H**, detalle de una hoja; ausencia total de necrosis marginal. **I**, detalle del tallo; sólo se observa un pequeño punto de lesión en el lugar donde se hizo la inoculación.



A los 20, 25, 30, 35 y 40 días después de realizada la infección, se realizaron conteos bacterianos como se detalla en el apartado de estrategias experimentales. En el día 20, los conteos bacterianos no mostraron diferencia significativa entre las líneas transgénicas y la no transgénica. Sin embargo, para el día 25 la línea 7 ya mostraba un número de UFC significativamente menor que el resto de las líneas. Para el día 30, las líneas 4 y 11 mostraban una disminución en el número de UFC con respecto a la línea 3 y a la no transgénica. Sin embargo esta diferencia aún no fue estadísticamente significativa. Para el día 35, la diferencia en el número de UFC entre las líneas 4 y 11, y las líneas 3 y no transgénica, fue de importancia estadística, mientras que la línea 7 presentó consistentemente un número de UFC considerablemente inferior a todas las demás líneas. Para el día 40, fue muy clara la existencia de tres grupos diferentes: por un lado, la línea no transgénica y la línea 3 con el mayor número de UFC, sin diferencias estadísticas entre ellas; las líneas 4 y 11 con un número intermedio de UFC, sin diferencias estadísticas entre ellas y por último la línea 7 con tan sólo el 17% del crecimiento bacteriano que presentó la línea no transgénica (**figura 23**).



IV.7. ANÁLISIS POR PCR CON TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR)

Una vez culminados los experimentos de reto a las plantas transgénicas con bacterias fitopatógenas, se decidió llevar a cabo un análisis por PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), en un intento por tratar de explicar los diferentes grados de resistencia observados en las figuras anteriores, ya sea por la apreciación visual de la sintomatología, o el conteo de UFC en las distintas líneas de plantas transgénicas.

Empleando hojas de plantas jóvenes de la F4 de las diferentes líneas transgénicas, se realizaron extracciones de ARN total. Los ARN fueron empleados para la realización de ensayos de RT-PCR, con el propósito de detectar los niveles de acumulación de transcrito de los transgenes, utilizando al gen endógeno del jitomate *EF-a*, correspondiente a un factor de transcripción, como control para la comparación de los niveles de transcripción de los transgenes (**figura 24**).

En el caso de los genes *BAK1* y *FLS2*, como era de esperarse por los resultados del análisis de PCR realizado anteriormente, se amplificó una banda incluso en la línea no transgénica, debida a la presencia de los genes ortólogos en las plantas de jitomate. Sin embargo, claramente se puede apreciar que la banda es más intensa en las líneas transgénicas, especialmente en la línea 7 (**figura 24**), indicando una mayor acumulación de los transcritos de estos genes, como resultado de la sobreexpresión de los mismos. Por otro lado, en el caso del gen *EFR* no se amplificó ninguna banda en la línea no transgénica, indicando la ausencia total de este gen en el genoma del jitomate. Como era de esperarse, en todas las líneas transgénicas analizadas se amplificó una banda correspondiente a este gen. Sin embargo, y coincidiendo con los resultados vistos mediante la sintomatología de las plantas y el conteo de las UFC, la línea 3 fue la que presentó la menor acumulación de transcrito, mientras que la línea 7 presentó la mayor acumulación del mismo (**figura 24**).

Figura 23. Conteo de unidades formadoras de colonia para la infección con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Gráfica que representa el número de unidades formadoras de colonia (UFC), en plantas de la F3 de las diferentes líneas transgénicas de jitomate (indicadas mediante barras con diferentes tonos de gris, excepto las barras blancas que representan plantas control, [WT]), después de la infección con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de la media. Las barras con la misma letra no son significativamente diferentes (t de Student, $P < 0.05$).

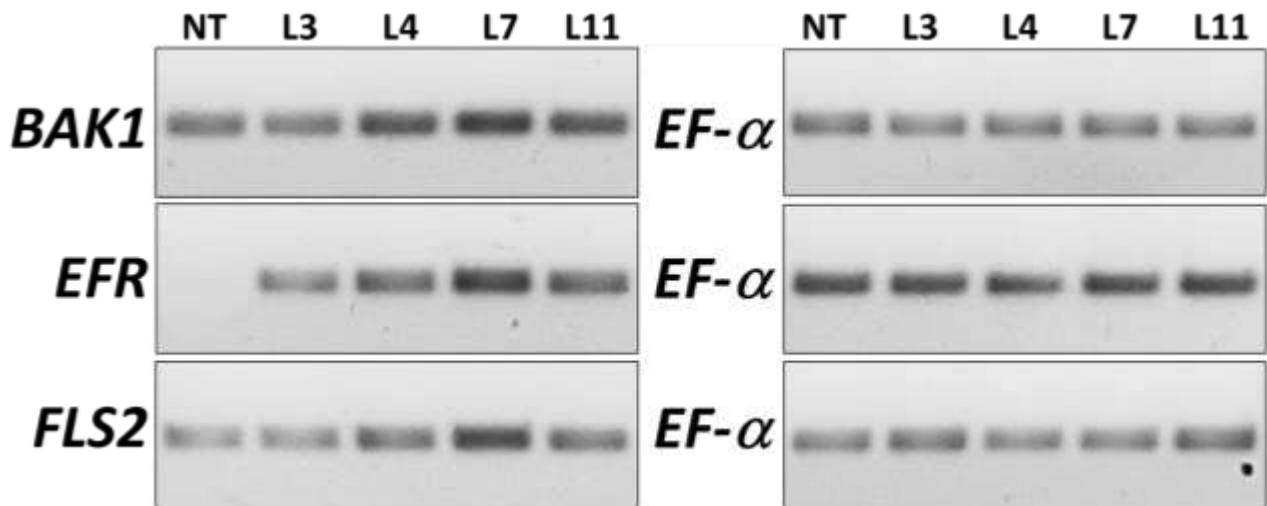


Figura 24. Análisis por PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) de las líneas transgénicas de jitomate. Se analizó la acumulación de transcritos de los transgenes *BAK1*, *EFR* y *FLS2*. La RT-PCR control, realizada con el gen endógeno de jitomate *EF-α*, indica una carga similar en los carriles. NT: línea no transgénica; L3: línea 3; L4: línea 4; L7: línea 7; L11: línea 11.

V. DISCUSIÓN

La mayor parte de los proyectos de ingeniería genética enfocados a conferir resistencia a enfermedades en cultivos importantes, se ha enfocado a las enfermedades ocasionadas por factores ambientales, virus y hongos. Son pocos los trabajos desarrollados con el fin de conferir resistencia a enfermedades bacterianas por medio de ingeniería genética. Así pues, el presente trabajo representa un aporte importante en dicho aspecto, ya que presenta algunas particularidades de interés científico. Por un lado, en este proyecto se ha optado por utilizar el sistema inmune innato de las plantas para conferir la resistencia. Es decir, se utilizaron los genes codificantes de ciertos PRRs que detectan MAMPs presentes en un amplio rango de bacterias, en vez de utilizar los clásicos genes *R*, que hasta hace poco se habían venido utilizando como única forma de conferir resistencia ante microorganismos. Por otro lado, se optó por utilizar dos genes codificantes de PRRs y un tercer gen codificante de un correceptor de dichos PRRs con el fin de que la resistencia generada sea de mayor espectro y más duradera. Asimismo, otra peculiaridad del presente trabajo fue la utilización de un casete multigénico, que aprovechó el sistema de procesamiento de proteínas por medio de ubiquitina, presente de manera endógena en todas las plantas superiores. A continuación, se discutirán más a fondo algunas particularidades de la estrategia experimental, así como la relevancia que podrían tener los resultados aquí presentados en el desarrollo futuro de proyectos de este tipo.

La resistencia específica generada por la acción de genes importantes, es el tipo de resistencia más fácil de incorporar en programas de mejoramiento tradicional, y usualmente se considera como un tipo de resistencia de gen por gen. Desafortunadamente, para el caso de muchos patógenos, este tipo de resistencia cualitativa a menudo no es duradera, debido a que los patógenos mutan rápidamente. Por este motivo, en los últimos años se ha puesto mayor atención en la acumulación de genes importantes de resistencia en plantas de cultivo. Muchas publicaciones han reportado que para las enfermedades bacterianas, tales como el tizón, se puede lograr una mayor resistencia de amplio espectro apilando más de dos genes de resistencia bacteriana en una sola línea, cuando se compara con líneas que solo tienen un gen de resistencia (Suh *et al.*, 2009). El apilamiento de genes es muy

difícil de conseguir mediante métodos convencionales de mejoramiento, debido a los efectos de dominancia y epistasia de los genes que gobiernan la resistencia a enfermedades y por la inevitable pérdida de caracteres valiosos durante el proceso (Suh *et al.*, 2013). Por esta razón, en este trabajo se eligió utilizar a la ingeniería genética para el apilamiento de los genes.

Es importante hacer notar que, aunque existen reportes previos de plantas transformadas con un gen codificante de PRR (Chinchilla *et al.*, 2006; Lacombe *et al.*, 2010), esta es la primera vez que se transforman plantas con un casete multigénico que incluye dos genes codificantes de PRRs (*EFR* y *FLS2*), además de un gen que codifica para un correceptor de los mismos (*BAK1*). De esta manera se buscó que la resistencia generada fuera más difícil de superar por los patógenos y, por lo tanto, más duradera. Es un hecho bien conocido que cuando la resistencia de una planta a cierto patógeno, depende de un sólo gen, es rápidamente superada por el patógeno al seleccionar especímenes mutantes, recombinantes o inmigrantes que estén mejor adaptados a la variedad resistente.

La transformación genética del jitomate es un procedimiento de rutina en nuestro laboratorio y está bien estandarizado (Gutiérrez-Ortega *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2007), y para el presente estudio se utilizaron cinco evidencias para verificar la naturaleza transgénica de las plantas: 1) el crecimiento y desarrollo de las mismas en el medio de selección con antibiótico; 2) los ensayos colorimétricos de expresión de GUS; 3) la detección de los transgenes por amplificación con PCR, utilizando oligonucleótidos específicos; 4) la detección de los niveles de transcrito de los transgenes por medio de RT-PCR, y 5) la resistencia contra infecciones de bacterias fitopatógenas como resultado de la expresión de los transgenes.

Fue posible generar varias líneas de plantas transgénicas de jitomate, de las cuales, se seleccionaron cuatro que mostraron actividad del gen GUS en todos los tejidos analizados (hojas, frutos y raíces). Se extrajo ADN total de tejido foliar de las cuatro líneas de plantas transgénicas, y usando dicho ADN como templado, se llevaron a cabo pruebas de PCR para determinar si los transgenes estaban presentes. El gen *EFR* amplificó en las líneas transgénicas, pero no en la no transgénica (NT). Esto era de esperar, ya que la planta de jitomate no cuenta con un ortólogo para dicho gen. Sin embargo, los genes *FLS2* y *BAK1* amplificaron no sólo en las líneas transgénicas, sino también en la NT, indicando que los ortólogos del jitomate para

dichos genes, son lo suficientemente similares a los de *Arabidopsis*, como para poder ser amplificados utilizando el mismo par de oligonucleótidos.

Se permitió que las cuatro líneas transgénicas de jitomate se autopolinizaran para originar las generaciones F1 a F4. En cada generación de planta, se llevaron a cabo ensayos de GUS y amplificaciones de los genes por PCR. Cada generación consecutiva mostró un incremento en el porcentaje de ensayos GUS positivos, lo cual indica que los transgenes se integraron en el genoma de las plantas y que se heredaban de manera estable, y que de esta forma, las líneas transgénicas de jitomate estaban tendiendo hacia la homocigosidad con respecto a los transgenes.

Se decidió transformar a las plantas con un vector que contenía un sólo casete, en el cual los tres genes estaban separados uno de otro por un enlazador consistente de un monómero de ubiquitina de tabaco, y bajo el control de un mismo promotor constitutivo 35S. La razón de este enfoque se basó en las varias ventajas que confiere. En primer lugar, el uso de un sólo promotor hace posible la expresión coordinada y equimolar de las diferentes proteínas (Walker y Vierstra, 2007). En segundo lugar, la ubiquitina es procesada rápida y adecuadamente *in vivo* por las enzimas desubiquitinizantes, las cuales liberan formas libres y funcionales de las proteínas previamente unidas a estos enlazadores. En tercer lugar, al usar un solo promotor, se reduce la posibilidad de silenciamiento de los transgenes, lo cual podría ser un problema si se empleara más de un promotor.

Es importante hacer notar que aunque la PTI parece estar conservada a todo lo largo del reino vegetal y de las muchas similitudes observadas a lo largo del mismo, existen diferencias en la naturaleza de las respuestas de PTI entre las diferentes especies de plantas (Nguyen *et al.*, 2010). Esto es lo que hace posible que, al transferir los PRRs entre familias vegetales, se puedan conferir nuevas capacidades de resistencia contra bacterias. De hecho, ya se ha demostrado que los principales genes de resistencia retienen su función cuando son transferidos entre especies vegetales. Por ejemplo, la expresión de *EFR* en el tabaco silvestre *N. benthamiana*, que normalmente no es responsivo a EF-Tu, resultó en el reconocimiento del efector elf18 y en la activación de las defensas basales típicas (Zipfel *et al.*, 2006). Más aún, plantas transgénicas de la familia Solanaceae, que se manipularon genéticamente para expresar el gen *EFR*, mostraron una resistencia significativamente más alta a múltiples bacterias patógenas (Lacombe *et al.*, 2010).

La flagelina, que constituye el bloque constructor del flagelo de las bacterias verdaderas, es reconocida en casi todas las especies vegetales por FLS2, su receptor propuesto. Sin embargo, el dominio que es reconocido dentro de la flagelina no es necesariamente el mismo para todas las especies de plantas. Por ejemplo, es sabido que la sensibilidad a diferentes péptidos de esta proteína varía entre miembros tanto de la familia Brassicaceae como de la Solanaceae que son capaces de percibir la flagelina (Robatzek *et al.*, 2007). En este sentido, se han aislado receptores FLS2 de jitomate, tabaco y arroz (Robatzek *et al.*, 2007) y todos ellos muestran altos niveles de identidad a nivel de aminoácidos con respecto al receptor FLS2 de *Arabidopsis* y también median la percepción de flagelina. Sin embargo, enfoques computacionales y filogenéticos han indicado que estos receptores emplean diferentes aminoácidos para la unión del ligando (Boller y Felix, 2009; Albert *et al.*, 2010). Considerando lo anterior, se decidió expresar en plantas de jitomate el receptor FLS2 de *Arabidopsis*, esperando que esto le conferiría a las plantas, un sitio adicional de reconocimiento a un epítotope de la flagelina.

Retar a las plantas transgénicas con bacterias fitopatógenas, es el método establecido para probar la resistencia o susceptibilidad de un genotipo vegetal dado a un patovar específico (Zhao *et al.*, 2003). Por ello, se decidió retar a las líneas transgénicas con *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, ya que estas bacterias son patógenos importantes del jitomate y se tienen bien caracterizadas en el laboratorio.

Como se esperaba, algunas de las líneas transgénicas mostraron resistencia contra las infecciones bacterianas, aun cuando el inóculo utilizado para los retos contenía una concentración de bacteria mucho más alta que la que puede presentarse en una infección natural. La línea 7 fue particularmente resistente a la infección con *P. syringae* pv. *syringae* y *P. syringae* pv. *tomato*, ya que mostró cerca del 40 y 27% respectivamente, del número de UFC detectadas en la línea NT a los 10 días después de la infección (ddi). Dichas diferencias en el número de UFC también se vieron reflejadas en la apariencia general de las plantas, ya que los síntomas de enfermedad en las plantas de la línea 7 fueron mucho menos severos que aquellos presentes en las plantas NT.

Normalmente el jitomate es susceptible a infecciones por *P. syringae* pv. *tomato*, ya que varios aislados de esta bacteria muestran polimorfismos de aminoácidos dentro de la flagelina, lo cual enmascara su reconocimiento por el

jitomate (Cai *et al.*, 2011). Estudios previos han mostrado que la expresión en jitomate del receptor FLS2 de *Arabidopsis*, es suficiente para transferirle el sistema de percepción de flagelina de *Arabidopsis* (Chinchilla *et al.*, 2006). Esto es importante, ya que algunos estudios han sugerido que el receptor FLS2 de *Arabidopsis* posee una capacidad de reconocimiento más amplia que la que se había anticipado inicialmente. Por ejemplo, péptidos derivados de la proteína Ax21 de *X. oryzae* pv. *oryzae*, activan la inmunidad mediada por FLS2 en *Arabidopsis*, aun cuando el receptor FLS2 de arroz parece no percibir a la proteína Ax21, ni a sus péptidos derivados. Esto es, las plantas de arroz que carecen del receptor XA21 (pero que aún llevan el receptor FLS2 de arroz), no responden con una resistencia medible a los péptidos derivados de Ax21 (Danna *et al.*, 2011). Esto puede ser una posible explicación a la resistencia a *Pseudomonas* observada en las líneas transgénicas de jitomate en el presente estudio, ya que la expresión heteróloga del receptor FLS2 de *Arabidopsis* posiblemente activó la inmunidad vegetal al reconocer, no sólo a flg22, sino a otro(s) MAMP de *Pseudomonas*.

Una evidencia adicional que apoya estos resultados es que las mutantes *fls2* de *Arabidopsis*, muestran una potenciada susceptibilidad a *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Zipfel *et al.*, 2006), demostrando que el receptor FLS2 de *Arabidopsis*, de alguna forma, percibe un MAMP de *P. syringae* pv. *tomato*, activando así la inmunidad vegetal. Con los resultados del presente trabajo, se hipotetiza que la mayor parte de la resistencia a *Pseudomonas* mostrada por las plantas transgénicas de jitomate, fue debida a la expresión del receptor FLS2 de *Arabidopsis*, y no a la del receptor EFR, ya que se ha reportado con anterioridad que la flagelina de *P. syringae* es más activa desencadenando la PTI mediada por FLS2 en *Arabidopsis*, en comparación con la flagelina de *A. tumefaciens* o de *Sinorhizobium meliloti* (Felix *et al.*, 1999). Más aún, la proteína EF-Tu de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, es mucho menos activa desencadenando la PTI en *Arabidopsis* que lo que lo es la proteína EF-Tu de *Agrobacterium* (Kunze *et al.*, 2004).

Es importante hacer notar que aunque las plantas transgénicas mostraron niveles de crecimiento bacteriano y de síntomas de enfermedad reducidos, hubo un menor grado de infección, pero aún detectable, aún en la línea 7 que fue la que mostró los mejores resultados. Esto indica que la resistencia conferida no fue absoluta. Una posible explicación para este comportamiento puede ser la presencia de los efectores AvrPto/ AvrPtoB en *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, los cuales son

conocidos por ser fuertes supresores de la PTI (He *et al.*, 2006). De hecho, se ha demostrado que, cuando son introducidos a niveles naturales por *P. syringae* pv. *tomato*, AvrPto y AvrPtoB atacan a BAK1 y bloquean la formación de los complejos MAMP-receptor inducida por ligandos, impidiendo así, de manera efectiva, la iniciación de múltiples señalizaciones por MAMP (Shan *et al.*, 2008). Por lo tanto, la transformación de plantas de jitomate con un gen *BAK1* de *Arabidopsis*, aun cuando el jitomate posee un ortólogo endógeno (Peng y Kaloshian, 2014), podría haber resultado en la sobreexpresión de la RLK BAK1, lo cual podría haber contrarrestado el ataque de los efectores AvrPto/ AvrPtoB, y así permitir la formación de los complejos MAMP-receptor, a pesar de la presencia de dichos efectores.

El mismo patrón se observó para las infecciones con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, a pesar de que, igualmente a lo realizado con *Pseudomonas*, se usaron inóculos mucho más concentrados que los que la planta podría encontrar en la naturaleza. A pesar de ello algunas de las líneas transgénicas mostraron cierto grado de resistencia a la bacteria. Una vez más, los mejores resultados se encontraron en plantas de la línea 7, la cual sólo presentó cerca del 17% del número de UFC de *C. michiganensis*, comparada con las que presentaron las plantas de jitomate NT a 40 ddi. El decremento en el número de UFC también se vio reflejado en la apariencia general de las plantas, especialmente en las de la línea 7, en las que los síntomas del cáncer bacteriano fueron mucho más leves que los de las plantas NT.

Debido a que *Clavibacter* se caracteriza por no presentar movilidad y, por lo tanto, no tener estructuras flagelares, es posible hipotetizar que la resistencia mostrada por las líneas de jitomate transgénicas en el presente estudio, no se debió a la expresión heteróloga del gen *FLS2* de *Arabidopsis*, sino más bien a la expresión del gen *EFR* de *Arabidopsis*. El MAMP reconocido por el receptor EFR es el factor de traducción procariótico EF-Tu, el cual es la proteína más abundante y una de las más conservadas en células bacterianas (Walters, 2015). A pesar de esto, la percepción del EF-Tu bacteriano se encuentra únicamente en miembros de la familia Brassicaceae, ya que todas las plantas no pertenecientes a esta familia que han sido analizadas hasta ahora, incluyendo a algunas solanáceas, han sido incapaces de mostrar la característica ráfaga de especies reactivas de oxígeno que se activa cuando las plantas que tienen este receptor son retadas con EF-Tu, o con su péptido inductor activo (elf18) (Zipfel *et al.*, 2006). Esto indica que, al expresar el receptor EFR en una solanácea (como el jitomate en este caso), se confiere a la planta una herramienta

novedosa para reconocer patógenos potenciales, y para activar su inmunidad basal para combatirlos, y tener así, una mayor habilidad para resistir enfermedades bacterianas, como ha sido demostrado con los resultados de este estudio.

Con el fin de encontrar una explicación a las diferencias en los niveles de resistencia mostrados por las diferentes líneas transgénicas, se sintetizó cADN a partir de ARN total extraído de hojas jóvenes. Utilizando dicho cADN, se realizó un análisis por RT-PCR para identificar los niveles de acumulación de transcrito de los transgenes. Aunque la acumulación del transcrito de los genes *FLS2* y *BAK1* fue detectable en las plantas NT (debido a los genes ortólogos del jitomate), las líneas 4 y 11, pero especialmente la línea 7, mostraron una mayor acumulación de transcrito, indicando una sobreexpresión de dichos genes como resultado de la expresión heteróloga bajo el control de un promotor constitutivo de los genes de *Arabidopsis*.

La línea 3 no mostró una mayor acumulación de transcritos comparada con las plantas NT. Dicho resultado explica en cierta medida la falta de resistencia a las infecciones bacterianas que mostró esta línea. No obstante, la línea 3 mostró acumulación de transcrito del gen *EFR* (si bien fue poca), indicando que las plantas de la línea 3 eran de hecho transgénicas, pero sin una expresión óptima de los transgenes. Como era de esperarse, las plantas NT no mostraron ninguna acumulación de transcrito para el gen *EFR*, ya que este gen está restringido a las plantas de la familia Brassicaceae (Zipfel *et al.*, 2006). A su vez, la línea 7 mostró la mayor acumulación de estos transcritos, lo que sugiere una explicación plausible a la mayor resistencia a patógenos bacterianos mostrada por las plantas de esta línea, las cuales tuvieron los conteos más bajos de UFC y mostraron los síntomas de infección más leves.

VI. CONCLUSIONES

Se construyó el plásmido LJMS/*EFR-UB-BAK1-UB-FLS2*, usando como base el vector de expresión en plantas LJMS, el cual contiene una versión potenciada del promotor constitutivo 35S, proveniente del virus del mosaico de la coliflor. Además, el vector contiene el gen de la aminoglucósido fosfotransferasa del transposón Tn5, el cual confiere resistencia a kanamicina y del gen de la β -glucuronidasa, como gen reportero. Dicho plásmido contiene, además, el casete multigénico *EFR-UB-BAK1-UB-FLS2*, el cual porta los genes *EFR* y *FLS2* de *Arabidopsis thaliana*, que codifican para receptores de reconocimiento de patrones, y el gen *BAK1*, que codifica para un correceptor de dichos receptores, también proveniente de *A. thaliana*. En dicho casete, cada uno de estos tres genes está unido al gen contiguo por un monómero de ubiquitina de tabaco.

Con el plásmido mencionado en el párrafo anterior, se transformaron plantas de jitomate de manera estable. La transformación de las plantas se llevó a cabo por medio de *A. tumefaciens*, utilizando cotiledones de plantas jóvenes como explantes.

Se lograron generar 4 líneas transgénicas de jitomate. La naturaleza transgénica de dichas líneas se comprobó por medio de 5 evidencias: 1) el crecimiento y desarrollo de las plántulas en medio de selección con antibiótico; 2) la respuesta colorimétrica positiva de los tejidos analizados al ensayo histoquímico de GUS; 3) la detección de los transgenes por medio de PCR; 4) la resistencia a infecciones de bacterias fitopatógenas, y 5) la detección por medio de RT-PCR, de los niveles de transcrito de los transgenes.

Se permitió que cada línea transgénica se autopolinizara para producir las generaciones F1 a F4. En cada generación, se repitieron las pruebas para verificar la naturaleza transgénica de las plantas y comprobar así, que los transgenes se habían incorporado al genoma de las plantas y se heredaban de manera estable.

Se retaron a las 4 líneas transgénicas con infecciones de las bacterias fitopatógenas de jitomate *P. syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Los niveles de resistencia o susceptibilidad se determinaron por apreciación visual del desarrollo de síntomas, y por conteos de unidades formadoras de colonias en los tejidos infectados.

De las 4 líneas transgénicas, una (la línea 3), no mostró prácticamente ningún nivel de resistencia ante las infecciones bacterianas, al compararla con las plantas no transgénicas. Las líneas 4 y 11 mostraron una resistencia moderada, mientras que la línea 7 fue la que presentó el mayor grado de resistencia ante las infecciones.

Los análisis por RT-PCR mostraron que la línea 3, si bien era transgénica, presentaba los niveles más bajos de acumulación de transcrito, mientras que las líneas 4 y 11 mostraban un nivel intermedio de acumulación, y la línea 7 presentaba la máxima acumulación de transcrito de los transgenes. Estos resultados coincidieron con lo observado por medio de la sintomatología y de los conteos bacterianos, y ayudaron a explicar los diferentes grados de resistencia registrados en las distintas líneas transgénicas.

Analizados de manera conjunta, los resultados anteriores sugieren que existe una clara correlación entre la expresión de los transgenes y el grado de resistencia a las infecciones de bacterias fitopatógenas. Los análisis por RT-PCR revelaron que una mayor acumulación de transcrito de los transgenes se correspondía claramente con un mayor nivel de resistencia en las diferentes líneas de plantas transgénicas. Así pues, es posible afirmar con cierto grado de certeza, que la resistencia a las infecciones bacterianas mostrada por las plantas transgénicas, se debe a la expresión heteróloga de los genes de *Arabidopsis thaliana*, *EFR*, *FLS2* y *BAK1*, involucrados en la inmunidad innata en dicha planta.

VII. PERSPECTIVAS

El crecimiento desmedido de la población mundial en las últimas décadas ha ocasionado que la demanda de alimentos sea cada vez mayor. Prácticamente todos los cultivos de importancia alimenticia son atacados por enfermedades bacterianas que, en ocasiones, pueden llegar a ocasionar grandes pérdidas, no sólo económicas sino también alimenticias.

La tecnología desarrollada en el presente trabajo ofrece una interesante gama de perspectivas para posibles aplicaciones en el futuro. Debido a que la estrategia usada en este proyecto para generar resistencia contra bacterias, se basa en el reconocimiento de patrones moleculares que son esenciales para la supervivencia de los microorganismos, y que están presentes no en grupo específico de bacterias, sino en un amplio rango de ellas. Es plausible suponer que la resistencia que se generó en las plantas de jitomate es efectiva, no sólo contra las tres especies de bacterias fitopatógenas analizadas en el estudio, sino también contra otras bacterias que causan enfermedades en el jitomate, tales como *Ralstonia solanacearum*, *E. carotovora*, *X. campestris* pv. *vesicatoria* y *P. corrugata*.

Más aun, como los sucesos moleculares que suceden río abajo después del reconocimiento MAMP-PRR, y que son los responsables de la activación de las defensas y, en última instancia, de la resistencia de la planta, están conservados en prácticamente todas las plantas superiores, y como el sistema endógeno de procesamiento de polipéptidos por medio de ubiquitinas y enzimas desubiquitinizantes también se encuentra presente en todas las especies vegetales, es de esperar que la transformación de otras plantas con el casete multigénico desarrollado en este trabajo tenga como resultado la generación de resistencia antibacteriana en dichas plantas.

Así pues, se propone que esta tecnología puede ser fácilmente transferible a otros cultivos de importancia agrícola que son afectados de manera importante por enfermedades bacterianas. El único prerrequisito necesario, sería que los protocolos para la transformación genética de dichas plantas, ya fuera por medio de *A. tumefaciens* o por otros métodos, estuvieran ya desarrollados de antemano.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que, ya que los receptores PRR reconocen patrones moleculares conservados en un amplio rango de microorganismos, los cuales no necesariamente han de ser patógenos, es posible que la resistencia generada por medio de esta tecnología, también tenga algunos efectos en detrimento de microorganismos benéficos para la planta. Sería necesario pues, llevar a cabo estudios en este sentido, con el fin de poder tomar las medidas necesarias para evitar que la actividad de los microorganismos benéficos sea afectada.

Es importante hacer notar que el proyecto descrito en el presente documento no culmina aquí, sino que aún quedan algunos experimentos y análisis por realizar, los cuales complementarán el estudio y ayudarán a explicar de una manera más detallada los resultados aquí presentados.

Entre los experimentos que se planean llevar a cabo en un futuro próximo están:

1. Determinar el número de copias de los transgenes por medio de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), en las diferentes líneas transgénicas. Esto nos permitirá establecer, de manera más precisa y directa, la relación que exista entre los niveles de expresión de los transgenes y el grado de resistencia a las infecciones bacterianas.
2. Medir los niveles de acumulación de proteínas de los transgenes por medio de inmunoensayos. Esto complementará los resultados del análisis por qRT-PCR, y nos dará una mejor idea de la importancia del papel que juegan los receptores EFR, FLS2 y el correceptor BAK1 en la inmunidad de las plantas ante bacterias fitopatógenas.
3. Retar a las líneas de plantas transgénicas generadas con otras cepas de bacterias patógenas de jitomate como las ya mencionadas anteriormente: *P. corrugata*, *E. carotovora*, *X. campestris* pv. *vesicatoria* y *R. solanacearum*. Esto permitirá demostrar de manera más contundente que la resistencia bacteriana generada mediante la expresión heteróloga de PRRs es de amplio espectro.

4. Transformar con el casete multigénico desarrollado, otras plantas de interés agrícola que también sean atacadas por enfermedades de origen bacteriano, y retarlas posteriormente con bacterias fitopatógenas propias de cada planta, para comprobar que la resistencia generada por los PRRs puede transferirse fácilmente a otras especies vegetales.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abramovitch RB, Anderson JC y Martin GB (2006) **Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity**. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 601-611.

Agrios GN (2005) **Plant pathology**. 5a edición. *Elsevier Academic Press*. EUA. 922 pp.

Akira S, Uematsu S y Takeuchi O (2006) **Pathogen recognition and innate immunity**. *Cell.* 124: 783-801.

Albert M, Jehle AK, Lipschis M, Mueller K, Zeng Y y Felix G (2010) **Regulation of cell behaviour by plant receptor kinases: pattern recognition receptors as prototypical models**. *Eur J Cell Biol.* 89: 200-207.

Allefs SJHM, de Jong ER, Florack DEA, Hoogendoorn C y Stiekema WJ (1996) **Erwinia soft rot resistance of potato cultivars expressing antimicrobial peptide tachypleisin I**. *Mol Breed.* 2: 97-105.

Alper S, McBride SJ, Lackford B, Freedman JH y Schwartz DA (2007) **Specificity and complexity of the *Caenorhabditis elegans* innate immune response**. *Mol Cell Biol.* 27: 5544-5553.

Altenburger P, Kampfer P, Akimov VN, Lubitz W y Busse HJ (1997) **Polyamine distribution in actinomycetes with group B peptidoglycan and species of the genera *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, and *Tsukamurella***. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 270-277.

Anzai H, Yoneyama K y Yamaguchi I (1989) **Transgenic tobacco resistant to a bacterial disease by the detoxification of a pathogenic toxin**. *Mol Gen Genet.* 219: 492-494.

Ausubel FM (2005) **Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?** *Nat Immunol.* 6: 973-979.

Baer D y Gudmestad NC (1995) **In vitro cellulolytic activity of the plant pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.** *Can J Microbiol.* 41: 877-888.

Bednarek POA (2009) **Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense.** *Science.* 324: 746-748.

Beimen A, Bermpohl A, Meletzus D, Eichenlaub R y Barz W (1992) **Accumulation of phenolic compounds in leaves of tomato plants after infection with *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* strains differing in virulence.** *Z Naturforsch.* 47C: 898-909.

Bent AF y Mackey D (2007) **Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions.** *Annu Rev Phytopathol.* 45: 399-436.

Boller T (1995) **Chemoperception of microbial signals in plant cells.** *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 46: 189-214.

Boller T y Felix G (2009) **A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors.** *Annu Rev Plant Biol.* 60: 379-406.

Bonn WG y Gitaitis RD (1987) **Ice nucleation and disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in tomato transplants.** *Phytopathology.* 77:1729.

Brown JF y Ogle HJ (1997) **Plant pathogens and plant diseases.** *Rockvale Publications, Armidale, Australia.* 556 pp.

Cai R, Lewis J, Yan S, Liu H, Clarke CR, Campanile F, Almeida NF, Studholme DJ, Lindeberg M, Schneider D, Zaccardelli M, Setubal JC, Morales-Lizcano NP, Bernal A, Coaker G, Baker C, Bender CL, Leman S y Vinatzer BA (2011) **The plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* is genetically monomorphic and under strong selection to evade tomato immunity.** *PLoS Pathog.* 7:e1002130.

Cao H, Li X y Dong XN (1998) **Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 6531-6536.

Caplan J, Padmanabhan M y Dinesh-Kumar SP (2008) **Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming.** *Cell Host Microbe.* 3: 126-135.

Carmona MJ, Molina A, Fernández JA, López-Fando J y Garcia-Olmedo F (1993) **Expression of the α -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens.** *Plant J.* 3: 457-462.

Carrillo-Landell FG, Rivera GG, Olivera-Flores TJ, Martínez MB, Orozco-Orozco E y Gómez-Lim MA (2008) **Expression and functional analysis of an *Entamoeba histolytica* truncated adhesin in tomato plants.** *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 94: 1-9.

Chinchilla D, Bauer Z, Regenass M, Boller T y Felix G (2006) **The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception.** *Plant Cell.* 18: 465-476.

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

Chisholm ST, Coaker G, Day B y Staskawicz BJ (2006) **Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response.** *Cell.* 124: 803-814.

Danna CH, Millet YA, Koller T, Han SW, Bent AF, Ronald PC y Ausubel FM (2011) **The *Arabidopsis* flagellin receptor FLS2 mediates the perception of *Xanthomonas* Ax21 secreted peptides.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 108: 9286-9291.

Dardick C y Ronald P (2006) **Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases.** *PLoS Pathog*. 2: 14-28.

Darvill AG y Albersheim P (1984) **Phytoalexins and their elicitors – a defense against microbial infection in plants.** *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 35: 243-275.

de Felipe P, Luke GA, Hughes LE, Gani D, Halpin C y Ryan MD (2006) **E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein.** *Trends Biotechnol*. 24: 68-75.

De la Rosa GP, Monroy-García A, Mora-García ML, Reynaga-Peña CG, Hernández-Montes J, Weiss-Steider B y Gómez-Lim MA (2009) **An HPV 16 L1-based chimeric human papilloma virus-like particles containing a string of epitopes produced in plants is able to elicit humoral and cytotoxic T-cell activity in mice.** *Virology*. 6: 1-11.

Dong YH, Wang L, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF y Zhang LH (2001) **Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase.** *Nature*. 411: 813-817.

Düring K, Porsch P, Fladung M y Lörz H (1993) **Transgenic potato plants resistant to the phytopathogenic bacterium *Erwinia carotovora*.** *Plant J*. 3: 587-598.

Eichenlaub R, Gartemann KH y Burger A (2006) ***Clavibacter michiganensis*, a group of gram-positive phytopathogenic bacteria.** En: *Plant-associated Bacteria*. SS Gnanamanickam (eds.). Dordrecht: Springer, Países Bajos. 385-421.

Ellis JG, Dodds PN y Lawrence GJ (2007) **Flax rust resistance gene specificity is based on direct resistance-avirulence protein interactions.** *Annu Rev Phytopathol.* 45: 289-306.

Felix G, Duran JD, Volko S y Boller T (1999) **Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin.** *Plant J.* 18: 265-276.

Fillatti JJ, Kiser J, Ronald R y Comai L (1987) **Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector.** *Biotechnology.* 5: 726-730.

Flor HH (1971) **Current status of the gene-for-gene concept.** *Annu Rev Phytopathol.* 9: 275-296.

Frank GD (1999) **Persistence and latency of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in fieldgrown seed potatoes.** *Plant Dis.* 83: 247-250.

Fu ZQ y Dong X (2013) **Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense.** *Annu Rev Plant Biol.* 64: 839-863.

Gitaitis RD (1991a) **Bacterial canker.** En: *Compendium of tomato diseases.* JB Jones, JP Jones, RE Stall, TA Zitter (eds.). APS Press, EUA. 25-26.

Gitaitis RD (1991b) **Syringae leaf spot.** En: *Compendium of tomato diseases.* JB Jones, JP Jones, RE Stall, TA Zitter (eds.). APS Press, EUA. 29-30.

Gómez-Gómez L y 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.

Gómez-Gómez L, Felix G y Boller T (1999) **A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant J.* 18: 277-284.

Goto M (2012) **Fundamentals of bacterial plant pathology.** *Academic Press.* EUA. 342 pp.

Gutiérrez-Ortega A, Sandoval-Montes C, de Olivera-Flores TJ, Santos-Argumedo L y Gómez-Lim MA (2005) **Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants.** *Transgenic Res.* 14: 877-885.

Hann DR y Rathjen JP (2007) **Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*.** *Plant J.* 49: 607-618.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM y Aderem A (2001) **The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5.** *Nature.* 410: 1099-1103.

He P, Shan L, Lin NC, Martin GB, Kemmerling B, Nürnberger T y Sheen J (2006) **Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity.** *Cell.* 125: 563-575.

Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AME, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC y Rathjen JP (2007) **The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 104: 12217-12222.

Heitefuss R y Williams P (2012) **Physiological plant pathology.** Volumen 4. *Springer-Verlag.* EUA. 890 pp.

Herrera-Estrella L y Simpson J (1995) **Genetically engineered resistance to bacterial and fungal pathogens.** *World J Microbiol Biotechnol.* 11: 383-392.

Hondred D, Walker JM, Mathews DE y Vierstra RD (1999) **Use of ubiquitin fusions to augment protein expression in transgenic plants.** *Plant Physiol.* 119: 713-724.

Horsfall JG y Cowling EB (2012) **Plant disease: An advanced treatise: How plants suffer from disease.** Volumen 3. *Academic Press.* EUA. 506 pp.

Huang Y, Nordeen RO, Di M, Owens LD y McBeath JH (1997) **Expression of an engineered cecropin gene cassette in transgenic tobacco plants confers disease resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*.** *Phytopathology.* 87: 494-499.

Jhy-Jhu L (1994) **A new expression medium for *Agrobacterium tumefaciens* using electroporation.** *FOCUS* 16: 18-19.

Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H y Lee JO (2007) **Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide.** *Cell.* 130: 1071-1082.

Jones JB (1991) **Bacterial speck.** En: *Compendium of tomato diseases.* JB Jones, JP Jones, RE Stall, TA Zitter (eds.). APS Press, EUA. 26-27.

Jones JD y Dangl JL (2006) **The plant immune system.** *Nature.* 444: 323-329.

Jones JB, Gitaitis RD y McCarter SM (1986) **Fluorescence on single-carbon sources for separation on *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *P. syringae* pv. *tomato*, and *P. viridiflava* on tomato transplants.** *Plant Dis.* 70: 151-153.

Jones JB, Stall RE y Zitter TA (2001) **Plagas y enfermedades del tomate.** *Ediciones MundiPrensa.* México. 74 pp.

Keen NT (2000) **A century of plant pathology: A retrospective view on understanding host-parasite interactions.** *Annu Rev Phytopathol.* 38: 31-48.

Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T y Felix G (2004) **The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants.** *Plant Cell*. 16: 3496-3507.

Lacombe S, Rougon-Cardoso A, Sherwood E, Peeters N, Dahlbeck D, van Esse HP, Smoker M, Rallapalli G, Thomma BPHJ, Staskawicz B, Jones JDG y Zipfel C (2010) **Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance.** *Nat Biotechnol*. 28: 365-369.

Laurila J, Metzler MC, Ishimaru CA y Rokka VM (2003) **Infection of plant material derived from *Solanum acaule* with *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*: temperature as a determining factor in immunity of *S. acaule* to bacterial ring rot.** *Plant Pathol*. 52: 496-504.

Lee SW, Han SW, Bartley LE y Ronald PC (2006) **Unique characteristics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* AvrXa21 and implications for plant innate immunity.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 103: 18395-18400.

Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal wDM y Davies DR (2008) **Structural basis of Toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA.** *Science*. 320:379-381.

Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, DeVera ME, Liang X, Tör M y Billiard T (2007) **The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity.** *Immunol Rev*. 220: 60-81.

Louws FJ, Bell J, Medina-Mora CM, Smart CD, Opgenorth D, Ishimaru CA, Hausbeck MK, de Bruijn FJ y Fulbright DW (1998) **rep-PCR-mediated genomic fingerprinting: a rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*.** *Phytopathology*. 88: 862-868.

Lucas JA (2009) **Plant pathology and plant pathogens**. 3a edición. *Wiley-Blackwell*. EUA. 288 pp.

Madden LV y Wheelis M (2003) **The threat of plant pathogens as weapons against U.S. crops**. *Annu Rev Phytopathol*. 41: 155-176.

Martin GB, Bogdanove AJ y Sessa G (2003) **Understanding the functions of plant disease resistance proteins**. *Annu Rev Plant Biol*. 54: 23-61.

McCarter SM, Jones JB, Gitaitis RD y Smitley DR (1983) **Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue, and epiphytic weed hosts in Georgia**. *Phytopathology* 73: 1393-1398.

McDowell JM y Simon SA (2008) **Molecular diversity at the plant-pathogen interface**. *Dev Comp Immunol*. 32: 736-744.

Mentag R, Luckevich M, Morency MJ y Seguin A (2003) **Bacterial disease resistance of transgenic hybrid poplar expressing the synthetic antimicrobial peptide D4E1**. *Tree Physiol*. 23: 405-411.

Mitra A y Zhang Z (1994) **Expression of a human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein (s)**. *Plant Physiol*. 106: 977-981.

Mittler R, Shulaev V y Lam E (1995) **Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump**. *Plant Cell*. 7: 29-42.

Nawrath C, Poirier Y y Somerville C (1994) **Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation**. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 12760-12764.

Nguyen HP, Chakravarthy S, Velásquez AC, McLane HL, Zeng L, Nakayashiki H, Park D, Collmer A y Martin GB (2010) **Methods to study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana***. *Mol Plant Microbe Interact.* 23: 991-999.

Park YH, Suzuki KI, Yim DG, Lee KC, Kim E, Yoon JS, Kim SJ, Kho YH, Goodfellow M, y Komogata K (1993) **Suprageneric classification of peptidoglycan group B actinomycetes by nucleotide sequencing of 5S ribosomal RNA**. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 64: 307-313.

Peng HC y Kaloshian I (2014) **The tomato leucine-rich repeat receptor-like kinases *SISERK3A* and *SISERK3B* have overlapping functions in bacterial and nematode innate immunity**. *PLoS One.* 9: e93302.

Pernezny K, Roberts PD, Murphy JF y Goldberg NP (2003) **Compendium of pepper diseases**. *The American Phytopathological Society.* EUA. 63 pp.

Pieterse CMJ y Dicke M (2007) **Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology**. *Trends Plant Sci.* 12: 564-569.

Ramírez YJP, Tasciotti E, Gutierrez-Ortega A, Donayre-Torres AJ, Olivera Flores MT, Giacca M y Gómez Lim MA (2007) **Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 Tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice**. *Clin Vaccine Immunol.* 14: 685-692.

Rick CM (1978) **The tomato**. *Sci Am.* 239: 76-87.

Robatzek S, Bittel P, Chinchilla D, Köchner P, Felix G, Shiu SH y Boller T (2007) **Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor *LeFLS2*, an orthologue of *Arabidopsis* *FLS2* exhibiting characteristically different perception specificities**. *Plant Mol Biol.* 64: 539-547.

Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (2002) **Molecular cloning: A laboratory manual. Third Edition.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*

Schaad NW, Frederick RD, Shaw J, Schneider WL, Hickson R, Petrillo MD y Luster DG (2003) **Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues.** *Annu Rev Phytopathol.* 41: 305-324.

Shah DM (1997) **Genetic engineering for fungal and bacterial diseases.** *Curr Opin Biotechnol.* 8: 208-214.

Shan L, He P, Li J, Heese A, Peck SC, Nürnberger T, Martin GB y Sheen J (2008) **Bacterial effectors target BAK1 to disrupt MAMP receptor signaling complexes and impede plant innate immunity.** *Cell Host Microbe.* 4: 17-27.

Shiu SH y Bleecker AB (2003) **Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*.** *Plant Physiol.* 132: 530-543.

Smalle J y Vierstra RD (2004) **The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway.** *Annu Rev Plant Biol.* 55: 555-590.

Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Rassouljian Barrett SL, Cookson BT y Aderem A (2003) **Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility.** *Nat Immunol.* 4: 1247-1253.

Song WY, Wang GL, Chen LL, Kim HS, Pi LY, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai WX, Zhu LH, Fauquet C y Ronald P (1995) **A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21.** *Science.* 270: 1804-1806.

Stoger E, Sack M, Fischer R y Christou P (2002) **Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks.** *Curr Opin Biotechnol.* 13: 161-166.

Strider DL (1969) **Bacterial canker of tomato caused by *Corynebacterium michiganense*. A literature review and bibliography.** *North Carolina Agric. Exp. Stn., Tech. Bull.*, 193.

Suh JP, Jeung JU, Noh TH, Cho YC, Park SH, Park HS, Shin MS, Kim CK y Jena KK (2013) **Development of breeding lines with three pyramided resistance genes that confer broad-spectrum bacterial blight resistance and their molecular analysis in rice.** *Rice* 6: 5.

Suh JP, Noh TH, Kim KY, Kim JJ, Kim YG y Jena KK (2009) **Expression levels of three bacterial blight resistance genes against K3a race of Korea by molecular and phenotype analysis in japonica rice (*O. sativa* L.).** *J Crop Sci Biotechnol.* 12: 103-108.

Takai R, Isogai A, Seiji S y Che FS (2008) **Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice.** *Mol Plant-Microbe Interact.* 12: 1635-1642.

Takemoto D, Hardham AR y Jones DA (2005) **Differences in cell death induction by phytophthora elicitors are determined by signal components downstream of MAP kinase kinase in different species of nicotiana and cultivars of *Brassica rapa* and *Raphanus sativus*.** *Plant Physiol.* 138: 1491-1504.

Tang XY, Xie MT, Kim YJ, Zhou JM, Klessig DF y Martin GB (1999) **Overexpression of Pto activates defense responses and confers broad resistance.** *Plant Cell.* 11: 15-29.

Taylor IB (1986) **Biosystematics of the tomato.** En: *The tomato crop: a scientific basis for improvement.* JG Atherton, J Rudich (eds.). Chapman and Hall, EUA. 1-34.

Tigchelaar EC (1991) **Botany and culture.** En: *Compendium of tomato diseases.* JB Jones, JP Jones, RE Stall, TA Zitter (eds.). APS Press, EUA. 2-8.

Walker JM y Vierstra RD (2007) **A ubiquitin-based vector for the co-ordinated synthesis of multiple proteins in plants.** *Plant Biotechnol J.* 5: 413-421.

Walters M (2015) **The plant innate immune system.** *Endocytobiosis Cell Res.* 26: 8-12.

Wang GL, Song WY, Ruan DL, Sideris S y Ronald PC (2007) **The cloned gene, Xa21, confers resistance to multiple *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates in transgenic plants.** *Mol Plant-Microbe Interact.* 9: 855.

Wegener C, Bartling S, Olsen O, Weber J y Vonwettstein D (1996) **Pectate lyase in transgenic potatoes confers pre-activation of defence against *Erwinia carotovora*.** *Physiol Mol Plant Pathol.* 49: 359-376.

Wenzel G (2006) **Molecular plant breeding: achievements in green biotechnology and future perspectives.** *Appl Microbiol Biotechnol.* 70: 642-650.

Wilkinson KD (2000) **Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome.** *Semin Cell Dev Biol.* 11: 141-148.

Wise RP, Moscou MJ, Bogdanove AJ y Whitham SA (2007) **Transcript profiling in host-pathogen interactions.** *Annu Rev Phytopathol.* 45: 329-369.

Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmons KC y Shah DM (1995) **Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants.** *Plant Cell.* 7: 1357-1368.

Xiang T, Zong N, Zou Y, Wu Y, Zhang J, Xing W, Li Y, Tang X, Zhu L, Chai J y Zhou JM (2008) ***Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases.** *Curr Biol.* 18: 74-80.

Xing W, Zou Y, Liu Q, Liu J, Luo X, Huang Q, Chen S, Zhu L, Bi R, Hao Q, Wu JW, Zhou JM y Chai J (2007) **The structural basis for activation of plant immunity by bacterial effector protein AvrPto.** *Nature*. 449: 243-247.

Ye X, Al-Babili S, Klott A, Zhang J, Lucca P, Beyer P y Potrykus I (2000) **Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm.** *Science*. 287: 303-305.

Zhao Y, Thilmony R, Bender CL, Schaller A, He SY y Howe GA (2003) **Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway.** *Plant J*. 36: 485-499.

Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T y Felix G (2006) **Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation.** *Cell*. 125: 749-760.